

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

HỌC VIỆN QUÂN Y



NGÔ THỊ MỸ BÌNH

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH VÀ TÁC DỤNG
CHỐNG BÉO PHÌ, HẠ LIPID MÁU
TRÊN THỰC NGHIỆM CỦA CAO KHÔ LÁ CÂY
TRÀ HOA VÀNG (*CAMELLIA HAKODAE* NINH)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2025

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

HỌC VIỆN QUÂN Y

NGÔ THỊ MỸ BÌNH

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH VÀ TÁC DỤNG
CHỐNG BÉO PHÌ, HẠ LIPID MÁU
TRÊN THỰC NGHIỆM CỦA CAO KHÔ LÁ CÂY
TRÀ HOA VÀNG (*CAMELLIA HAKODAE NINH*)**

Ngành : Dược lý và độc chất

Mã số : 9720118

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

- 1. PGS.TS. Nguyễn Hoàng Ngân**
- 2. TS. Nguyễn Hồng Hạnh**

HÀ NỘI, NĂM 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan :

Luận án: **“Nghiên cứu độc tính và tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu trên thực nghiệm của cao khô lá cây Trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh)”** là công trình nghiên cứu của tôi với sự hướng dẫn khoa học của tập thể cán bộ hướng dẫn.

Các kết quả được trình bày trong luận án là trung thực và được công bố một phần trong các bài báo khoa học của nhóm nghiên cứu. Luận án chưa từng được công bố, không trùng lặp với luận văn, luận án hoặc các công trình nghiên cứu khoa học của các tác giả khác.

Nếu có điều gì sai tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Tác giả

Ngô Thị Mỹ Bình

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin trân trọng bày tỏ lòng biết ơn tới **Đảng ủy, Ban giám đốc Học viện Quân y, Phòng Sau Đại học và Viện Đào tạo Dược** đã tạo điều kiện cho tôi được học tập, rèn luyện trong môi trường chuyên nghiệp, kỷ luật và khoa học trong suốt thời gian học nghiên cứu sinh. Chân thành cảm ơn **Đảng ủy, Ban giám hiệu Trường Đại học Y Dược, Đại học Thái Nguyên, Khoa Dược và Bộ môn Dược lý** đã tạo điều kiện thuận lợi về thời gian và công tác chuyên môn để tôi hoàn thành nhiệm vụ học tập tại Học viện.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **PGS.TS. Nguyễn Hoàng Ngân**, Chủ nhiệm Bộ môn Dược lý, Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân y và **TS. Nguyễn Hồng Hạnh**, Trưởng khoa Lão khoa, Bệnh viện E – là hai thầy cô hướng dẫn khoa học đã luôn tận tình chỉ bảo, định hướng chuyên môn và đồng hành cùng tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn các anh chị em giảng viên, kỹ thuật viên **Bộ môn Dược lý, Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân y**; các anh chị em đồng nghiệp tại **Phòng Nghiên cứu Hóa lý và Dược, Trường ĐHY Dược, Đại học Thái Nguyên** đã luôn tận tình chia sẻ kinh nghiệm, tư vấn chuyên môn, tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong quá trình triển khai các nội dung nghiên cứu.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến các đơn vị phối hợp: **Khoa Xét nghiệm (Bệnh viện Bổng Quốc gia Lê Hữu Trác); Khoa Giải phẫu bệnh (Bệnh viện Quân y 103)** đã hỗ trợ tôi hoàn thiện các nội dung nghiên cứu của luận án.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới **bố mẹ hai bên, tới chồng, và hai con, tới những người thân trong gia đình** đã luôn tin tưởng, động viên, và là điểm tựa tinh thần vững chắc giúp đỡ tôi vượt qua mọi khó khăn. Cảm ơn **các anh chị em, bạn bè và đồng nghiệp** đã luôn đồng hành cùng tôi, động viên, chia sẻ và hỗ trợ tôi về mọi mặt trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Trân trọng và biết ơn rất nhiều !

Hà Nội, ngày 20 tháng 05 năm 2025

Ngô Thị Mỹ Bình

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN

LỜI CẢM ƠN

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC CÁC BẢNG

DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ

DANH MỤC CÁC HÌNH

ĐẶT VẤN ĐỀ 1

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN..... 3

1.1. Tổng quan về béo phì và rối loạn lipid máu 3

1.1.1. Béo phì 3

1.1.2. Rối loạn lipid máu..... 7

1.2. Một số mô hình nghiên cứu tác dụng chống béo phì và hạ lipid máu.. 15

1.2.1. Các mô hình gây béo phì trên *in vivo* 15

1.2.2. Các mô hình gây tăng lipid máu trên *in vivo*..... 18

1.2.3. Các mô hình nghiên cứu cơ chế tác dụng trên *in vitro*..... 22

1.3. Một số dược liệu có tác dụng chống béo phì và hạ lipid máu..... 26

1.4. Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh và cao khô lá Trà hoa vàng 29

1.4.1. Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh..... 29

1.4.2. Cao khô lá Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh 34

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 38

2.1. Đối tượng nghiên cứu 38

2.1.1. Vật liệu nghiên cứu 38

2.1.2. Động vật nghiên cứu 38

2.1.3. Thiết bị nghiên cứu 39

2.1.4. Thuốc, hóa chất..... 39

2.2. Phương pháp nghiên cứu 40

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu độc tính cấp 41

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu độc tính bán trường diễn..... 43

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu tác dụng chống béo phì *in vivo* 45

2.2.4. Phương pháp nghiên cứu tác dụng hạ lipid máu in vivo	49
2.2.5. Phương pháp nghiên cứu cơ chế tác dụng trên in vitro	53
2.3. Địa điểm nghiên cứu.....	59
2.4. Phương pháp xử lý số liệu	59
2.5. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu.....	60
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	61
3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính.....	61
3.1.1. Độc tính cấp	61
3.1.2. Độc tính bán trường diễn.....	62
3.2. Kết quả nghiên cứu tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu	71
3.2.1. Nghiên cứu tác dụng chống béo phì in vivo.....	71
3.2.2. Nghiên cứu tác dụng hạ lipid máu in vivo	84
3.2.3. Nghiên cứu cơ chế tác dụng trên in vitro	90
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN.....	96
4.1. Bàn luận về nghiên cứu độc tính	96
4.1.1. Về độc tính cấp.....	96
4.1.2. Về độc tính bán trường diễn	99
4.2. Bàn luận về tác dụng chống béo phì và hạ lipid máu.....	106
4.2.1. Về tác dụng chống béo phì in vivo	106
4.2.2. Về tác dụng hạ lipid máu in vivo	118
4.2.3. Về cơ chế tác dụng in vitro	126
4.2.4. Bàn luận chung về tác dụng và cơ chế tác dụng của CKL-THV ..	134
4.3. Tính ứng dụng và hạn chế của luận án	137
4.4. Đóng góp mới của luận án.....	138
KẾT LUẬN	141
KIẾN NGHỊ.....	143
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ	ĐÃ
CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

TT	Phần viết tắt	Phần viết đầy đủ
1	AACE	American Association of Clinical Endocrinology (Hiệp hội Bác sĩ Nội tiết Hoa Kỳ)
2	Abs	Absorbance (Độ hấp thụ)
3	ACC	American College of Cardiology (Trường Cao đẳng Tim mạch Hoa Kỳ)
4	ACE	American College of Endocrinology (Trường Cao đẳng Nội tiết Hoa Kỳ)
5	AGA	American Gastroenterological Association (Hiệp hội Tiêu hóa Hoa Kỳ)
6	AHA	American Heart Association (Hiệp hội Tim mạch Hoa Kỳ)
7	ALT	Alanin amino transferase
8	AST	Aspartat amino transferase
9	Ator	Atorvastatin
10	BMI	Body Mass Index (Chỉ số khối cơ thể)
11	CKL-THV	Cao khô lá Trà hoa vàng
12	EAS	European Atherosclerosis Society (Hội xơ vữa động mạch châu Âu)
13	EMA	European Medicines Agency (Cơ quan quản lý Dược phẩm Châu Âu)
14	ESC	European Society of Cardiology (Hiệp hội Tim mạch Châu Âu)
15	FDA	Food and Drug Administration (Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ)
16	HDL, HDL-C	High density lipoprotein cholesterol (Lipoprotein tỉ trọng cao)
17	HFD	High fat diet (Chế độ ăn giàu chất béo)

18	HMG-CoA	Hydroxylmethylglutaryl-CoA
19	HMG-CoAR	HMG-CoA reductase
20	IDL	Intermediate density lipoprotein (Lipoprotein tỉ trọng trung bình)
21	LCAT	Lecithin cholesterol acyl transferase
22	LDL, LDL-C	Low density lipoprotein cholesterol (Lipoprotein tỉ trọng thấp)
23	LDL-R	LDL receptor
24	Lp (a)	Lipoprotein (a)
25	LPL	Lipoprotein lipase
26	NCEP	National Cholesterol Education Program (Chương trình Giáo dục cholesterol quốc gia Hoa Kỳ)
27	NADPH	Nicotinamid adenine dinucleotide phosphate
28	OECD	Organization for Economic Cooperation and Development (Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế)
29	P-407	Poloxamer 407
30	PCSK9	Protein Convertase Subtilisin/Kexin type 9
31	p-NPB	p-nitrophenyl butyrat
32	PTU	Propylthiouracil
33	Pravas	Pravastatin
34	TC	Total cholesterol (Cholesterol toàn phần)
35	TG	Triglycerid
36	RLLPM	Rối loạn lipid máu
37	VNHA	Vietnam National Heart Association (Hội Tim mạch học Việt Nam)
38	VLDL	Very low density lipoprotein (Lipoprotein tỉ trọng rất thấp)
39	WHO	World Health Organization (Tổ chức Y tế thế giới)

DANH MỤC CÁC BẢNG

TT	Tên bảng	Trang
Bảng 1. 1.	Phân loại mức độ béo phì	3
Bảng 1. 2.	Các thuốc được chấp thuận trong điều trị béo phì.....	5
Bảng 1. 3.	Đích điều trị LDL-C, non HDL-C và apolipoprotein B	9
Bảng 1. 4.	Một số mô hình gây động vật béo phì do di truyền.....	17
Bảng 1. 5.	Một số nghiên cứu đánh giá tác dụng ức chế enzym cholesterol esterase	25
Bảng 1. 6.	Một số dược liệu có tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu.....	27
Bảng 1. 7.	Một số chỉ tiêu chất lượng của cao khô lá Trà hoa vàng.....	36
Bảng 2. 1.	Động vật thí nghiệm sử dụng trong các nghiên cứu.....	38
Bảng 2. 2.	Các thuốc, hóa chất sử dụng trong nghiên cứu	39
Bảng 2. 3.	Thành phần dinh dưỡng trong chế độ ăn HFD giàu chất béo	45
Bảng 2. 4.	Giá trị năng lượng tương đối của chế độ ăn HFD	46
Bảng 2. 5.	Công thức thành phần hỗn hợp dầu cholesterol	52
Bảng 2. 6.	Thành phần các dung dịch trong hỗn hợp phản ứng thủy phân HMG-CoA trong thử nghiệm in vitro	54
Bảng 2. 7.	Thành phần các dung dịch trong hỗn hợp phản ứng thủy phân pNPB trong thử nghiệm in vitro	58
Bảng 3. 1.	Kết quả theo dõi chuột trong thử nghiệm độc tính cấp	61
Bảng 3. 2.	Ảnh hưởng của CKL-THV đến trọng lượng chuột	62
Bảng 3. 3.	Ảnh hưởng của CKL-THV đến số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố	63
Bảng 3. 4.	Ảnh hưởng của CKL-THV đến chỉ số hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu.....	63

Bảng 3. 5. Ảnh hưởng của CKL-THV đến số lượng bạch cầu và tiểu cầu	64
Bảng 3. 6. Ảnh hưởng của CKL-THV đến hoạt độ AST, ALT.....	65
Bảng 3. 7. Ảnh hưởng của CKL-THV đến chỉ số albumin, cholesterol toàn phần và triglycerid	66
Bảng 3. 8. Ảnh hưởng của CKL-THV đến chỉ số creatinin.....	67
Bảng 3. 9. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học gan chuột.....	68
Bảng 3. 10. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học lách chuột.....	69
Bảng 3. 11. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học thận chuột	70
Bảng 3. 12. Trọng lượng, chiều dài, vòng bụng và chỉ số Lee của chuột ở các lô tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm chính thức	72
Bảng 3. 13. Trọng lượng tuyệt đối các tạng chuột ở các lô nghiên cứu	79
Bảng 3. 14. Trọng lượng tương đối các tạng chuột ở các lô nghiên cứu.....	80
Bảng 3. 15. Kết quả gây mô hình tăng lipid máu nội sinh bằng P407	84
Bảng 3. 16. Ảnh hưởng của CKL-THV lên các chỉ số lipid máu chuột.....	84
Bảng 3. 17. Phần trăm ức chế enzym HMG-CoA reductase của CKL-THV .	92
Bảng 3. 18. Phần trăm ức chế enzym cholesterol esterase của CKL-THV	94

DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ

TT	Tên biểu đồ	Trang
Biểu đồ 3. 1.	Sự thay đổi trọng lượng chuột ở các lô nghiên cứu	73
Biểu đồ 3. 2.	Trọng lượng chuột ở các lô nghiên cứu sau 8 tuần	73
Biểu đồ 3. 3.	Sự thay đổi vòng bụng chuột ở các lô nghiên cứu	74
Biểu đồ 3. 4.	Vòng vụng chuột ở các lô nghiên cứu sau 8 tuần	75
Biểu đồ 3. 5.	Sự thay đổi chỉ số béo phì Lee ở các lô nghiên cứu.....	76
Biểu đồ 3. 6.	Chỉ số béo phì Lee ở các lô nghiên cứu sau 8 tuần	76
Biểu đồ 3. 7.	Trọng lượng mỡ ở các lô nghiên cứu sau 8 tuần.....	77
Biểu đồ 3. 8.	Chỉ số mỡ ở các lô nghiên cứu sau 8 tuần.....	78
Biểu đồ 3. 9.	Nồng độ cholesterol toàn phần và triglycerid sau 8 tuần	81
Biểu đồ 3. 10.	Nồng độ HDL-C ở các lô nghiên cứu sau 8 tuần	82
Biểu đồ 3. 11.	Nồng độ LDL-C và non HDL-C sau 8 tuần	83
Biểu đồ 3. 12.	Nồng độ cholesterol toàn phần ở các lô theo thời gian	86
Biểu đồ 3. 13.	Nồng độ triglycerid ở các lô nghiên cứu theo thời gian.....	87
Biểu đồ 3. 14.	Nồng độ HDL-C ở các lô nghiên cứu theo thời gian	88
Biểu đồ 3. 15.	Nồng độ LDL-C ở các lô nghiên cứu theo thời gian.....	89
Biểu đồ 3. 16.	Nồng độ non HDL-C ở các lô nghiên cứu theo thời gian	90
Biểu đồ 3. 17.	Hoạt độ enzym HMG-CoA reductase và mức giảm độ hấp thụ của dung dịch phản ứng trong thử nghiệm in vitro	91
Biểu đồ 3. 18.	Đường tuyến tính biểu thị mối tương quan giữa nồng độ CKL- THV và phần trăm ức chế HMG-CoA reductase	92
Biểu đồ 3. 19.	Độ hấp thụ trung bình của p-nitrophenolat khi sử dụng CKL- THV với các nồng độ khác nhau	93
Biểu đồ 3. 20.	Đường tuyến tính biểu thị mối tương quan giữa nồng độ CKL- THV và phần trăm ức chế cholesterol esterase	94

DANH MỤC CÁC HÌNH

TT	Tên hình	Trang
Hình 1. 1.	Sơ đồ quá trình chuyển hóa lipoprotein	8
Hình 1. 2.	Mục tiêu LDL-C trong các hướng dẫn điều trị theo thời gian.....	9
Hình 1. 3.	Vị trí tác dụng của một số nhóm thuốc điều trị RLLPM	10
Hình 1. 4.	Sơ đồ cơ chế điều trị lipid máu của một số dược liệu.....	26
Hình 1. 5.	Cây, lá và hoa Trà hoa vàng <i>Camellia hakodae</i> Ninh.....	30
Hình 1. 6.	Sơ đồ quy trình điều chế cao khô lá Trà hoa vàng.....	35
Hình 1. 7.	Lá cây Trà hoa vàng sấy khô và bột cao khô lá Trà hoa vàng.....	36
Hình 2. 1.	Các nội dung nghiên cứu độc tính và tác dụng của CKL-THV.....	41
Hình 2. 2.	Sơ đồ nghiên cứu độc tính cấp của CKL-THV	42
Hình 2. 3.	Sơ đồ nghiên cứu độc tính bán trường diễn của CKL-THV	44
Hình 2. 4.	Sơ đồ nghiên cứu tác dụng chống béo phì của CKL-THV	46
Hình 2. 5.	Sơ đồ nghiên cứu tác dụng hạ lipid máu nội sinh.....	50
Hình 2. 6.	Sơ đồ nghiên cứu tác dụng hạ lipid máu ngoại sinh	52
Hình 2. 7.	Phản ứng thủy phân HMG-CoA bởi HMG-CoA reductase.....	53
Hình 2. 8.	Sơ đồ nghiên cứu cơ chế tác dụng ức chế HMG-CoA reductase ..	55
Hình 2. 9.	Phản ứng thủy phân pNPB bởi cholesterol esterase	56
Hình 2. 10.	Sơ đồ nghiên cứu cơ chế tác dụng ức chế cholesterol esterase ...	58
Hình 3. 1.	Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột ở các lô nghiên cứu	67
Hình 3. 2.	Hình ảnh vi thể gan chuột ở các lô nghiên cứu.....	69
Hình 3. 3.	Hình ảnh vi thể lách chuột ở các lô nghiên cứu.....	70
Hình 3. 4.	Hình ảnh vi thể thận ở các lô nghiên cứu.....	71
Hình 4. 1.	Cơ chế tác dụng ức chế enzym của CKL-THV	133

ĐẶT VẤN ĐỀ

Béo phì và rối loạn lipid máu là hai vấn đề sức khỏe được quan tâm trên toàn thế giới. Theo thống kê năm 2020, thế giới có khoảng 2,6 tỷ người mắc thừa cân, béo phì [1]. Bên cạnh đó, tỷ lệ rối loạn lipid máu cũng ngày một gia tăng, đặc biệt ở những người trẻ tuổi [2]. Ước tính đến năm 2035, mức độ thừa cân và béo phì tăng lên hơn 4 tỷ người, riêng tỷ lệ béo phì, dự kiến sẽ tăng từ 14% lên 24% dân số, ảnh hưởng đến gần 2 tỷ người lớn, trẻ em và thanh thiếu niên [1]. Béo phì gây ra những thay đổi trong chuyển hóa lipoprotein và xơ vữa động mạch [3], [4]. Một nghiên cứu trên người trưởng thành cho thấy có 71,8% người thừa cân béo phì mắc ít nhất một rối loạn về lipid máu [5]. Theo một nghiên cứu dịch tễ học toàn cầu, nồng độ LDL-C tăng cao trong huyết tương là yếu tố nguy cơ tử vong thứ 8 vào năm 2019 [6]. Như vậy, vừa tăng cân, béo phì, vừa rối loạn lipid máu gây ảnh hưởng kép đến sức khỏe, có thể gây ra các bệnh lý nặng nề khiến tỷ lệ tử vong cao.

Cho đến nay, có rất nhiều nhóm thuốc được sử dụng trong điều trị béo phì và rối loạn lipid máu. Tuy nhiên, bên cạnh hiệu quả thì nhiều thuốc gây ra các tác dụng không mong muốn, giá thành điều trị cao, dẫn đến việc sử dụng thuốc gặp nhiều khó khăn. Do đó, ở Việt Nam cũng như nhiều nước trên Thế giới có xu hướng nghiên cứu tìm ra các thuốc mới an toàn, hiệu quả, giá thành thấp từ các nguồn dược liệu khác nhau, không chỉ chống béo phì hay điều trị rối loạn lipid máu mà còn tìm ra thuốc có tác dụng kép lên cả hai triệu chứng trên.

Theo kinh nghiệm dân gian và những kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy Trà hoa vàng có chứa các hợp chất polyphenol, trong đó catechin được chứng minh có tác dụng chống oxy hóa, giảm cân, giảm vòng eo, hạ lipid máu... [7], [8], [9], [10]. Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh là loài đặc hữu của Vườn Quốc gia Tam Đảo do Trần Ninh phát hiện vào năm 2007, được sử dụng trong dân gian như một thức uống với nhiều công dụng [11], [12], [13]. Theo Nguyễn

Hồng Hạnh và cộng sự, sử dụng 20g dịch chiết nước nóng lá Trà hoa vàng *Camellia hakodae* uống liên tục trong 30 ngày có tác dụng hạ cholesterol toàn phần, LDL-C và triglycerid, đồng thời làm giảm BMI có ý nghĩa thống kê [14]. Trên cơ sở đó, với mong muốn tạo ra được một chế phẩm an toàn, có tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu, đồng thời phải thuận tiện trong sử dụng, chúng tôi đã bào chế chế phẩm cao khô chiết xuất từ lá Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh tại Học viện Quân y. Một trong những lợi thế lớn nhất của chế phẩm cao khô là khả năng tập trung các hoạt chất, tỷ lệ hoạt chất trong cao khô thường cao hơn tỉ lệ hoạt chất trong dược liệu [15], [16]. Tuy nhiên, có nhiều câu hỏi đặt ra, liệu khi dùng dạng chiết nước nóng lá Trà hoa vàng có tác dụng, nhưng khi bào chế dưới dạng cao khô thì có còn tác dụng không và có tính an toàn không? Để trả lời cho các câu hỏi nghiên cứu trên, đồng thời, hướng tới mục tiêu đưa cao khô lá Trà hoa vàng sử dụng trên lâm sàng, việc đánh giá tính an toàn và tác dụng của chế phẩm trên thực nghiệm là một việc quan trọng và hết sức cần thiết. Do đó, đề tài luận án: **“Nghiên cứu độc tính và tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu của cao khô lá cây Trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh) trên thực nghiệm”** được thực hiện với 2 mục tiêu:

1. Đánh giá được độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của cao khô lá cây Trà hoa vàng trên thực nghiệm.
2. Đánh giá được tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu và một số cơ chế tác dụng của cao khô lá cây Trà hoa vàng trên thực nghiệm.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về béo phì và rối loạn lipid máu

1.1.1. Béo phì

Béo phì được Tổ chức Y tế Thế giới và Hiệp hội Y khoa Hoa Kỳ công nhận là một bệnh mạn tính, đòi hỏi phải quản lý và điều trị lâu dài. Béo phì được định nghĩa là tình trạng tích tụ mỡ thừa hoặc bất thường, có thể ảnh hưởng xấu đến sức khỏe [17]. Cơ chế bệnh sinh gây béo phì là do sự mất cân bằng năng lượng, khi năng lượng đưa vào cơ thể vượt mức so với năng lượng tiêu thụ, năng lượng dư thừa sẽ tăng cường dự trữ dưới dạng mỡ, trọng lượng cơ thể tăng lên, dẫn đến thừa cân, béo phì. Ngoài ra, béo phì còn có thể do các nguyên nhân khác như yếu tố di truyền, nội tiết, stress, lối sống ít vận động hoặc do sử dụng/tác dụng không mong muốn của các thuốc đang dùng... [17], [18].

Tiêu chuẩn chẩn đoán

Dựa vào chỉ số khối cơ thể và số đo vòng bụng: Chỉ số khối cơ thể (Body Mass Index - BMI) được sử dụng rộng rãi để chẩn đoán thừa cân, béo phì. Dựa vào BMI có thể phân loại mức độ gầy béo, tuy nhiên lại không phản ánh được sự phân bố mỡ trong cơ thể [19], [20], [21]. Do vậy, có thể sử dụng thêm số đo vòng bụng hay sự phân bố mỡ của cơ thể để chẩn đoán béo phì [17].

Bảng 1. 1. Phân loại mức độ béo phì

<i>Phân loại theo BMI (kg/m²)</i>		<i>Phân loại theo phân bố mỡ, số đo vòng bụng</i>	
Béo phì	25 – 29,9 ≥ 30	Béo phì dạng nam	phân bố nhiều ở phần cao trên rốn, vòng bụng nam ≥ 90cm, vòng bụng nữ ≥ 80cm
Béo phì độ 1		Béo phì dạng nữ	phân bố nhiều ở phần dưới rốn: đùi, mông, cẳng chân
Béo phì độ 2		Béo phì hỗn hợp	phân bố mỡ đồng đều

* Nguồn: Theo Bộ Y tế (2022) [17], Bộ Y tế (2015) [19]

Dựa vào tỉ trọng mỡ trong cơ thể: Phương pháp hấp thụ năng lượng kép DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry) được xem là “tiêu chuẩn vàng” để đánh giá lượng mỡ của cơ thể. Phương pháp DEXA có thể đánh giá mật độ phân bố mỡ trong cơ thể, giúp phân biệt mỡ nội tạng (mô mỡ trắng) và mỡ dưới da (mô mỡ nâu). Phương pháp này cho phép đo lặp lại nhiều lần, tiến hành nhanh chóng và dễ dàng, áp dụng cho cả người khỏe mạnh và người bệnh [17].

Dựa vào triệu chứng lâm sàng và chỉ số sinh hóa: Các triệu chứng lâm sàng của thừa cân béo phì bao gồm: cân nặng tăng cao so với chiều cao, chỉ số mỡ cơ thể tăng quá mức, vòng bụng tăng quá to so với lồng ngực. Các xét nghiệm đánh giá tình trạng thừa cân, béo phì bao gồm: Protein huyết thanh; Albumin huyết thanh; Retinol-binding protein huyết thanh (RBP); Thyroxin-binding pre-Albumin (TBPA); Các xét nghiệm đường huyết, xét nghiệm lipid máu (cholesterol toàn phần, triglycerid, HDL-C)... [17].

Điều trị béo phì

Mục tiêu điều trị béo phì là kiểm soát cân nặng và giảm nguy cơ các biến chứng, cải thiện sức khỏe. Hướng dẫn của Châu Âu về Quản lý béo phì ở người lớn [22], [23] và Hướng dẫn của Bộ Y tế Việt Nam [17] đều đồng thuận mức mục tiêu giảm cân cụ thể trong điều trị béo phì là giảm 5-15% cân nặng trong 6 tháng sau khi bắt đầu điều trị. Có thể cân nhắc giảm nhiều hơn 20% đối với những trường hợp có mức độ béo phì cao ($BMI \geq 35 \text{ kg/m}^2$). Bên cạnh đó, việc giảm chu vi vòng eo cũng rất quan trọng do có liên quan đến việc giảm mỡ nội tạng và các nguy cơ chuyển hóa tim mạch [23].

Thay đổi lối sống là nền tảng cơ bản trong điều trị béo phì, bao gồm các biện pháp can thiệp dinh dưỡng, tập luyện thể lực, thay đổi hành vi và hỗ trợ tâm lý [17]. Tuy nhiên, thay đổi lối sống đơn thuần chỉ giảm được 3-5% cân nặng, không đủ để đạt được mục tiêu điều trị béo phì và thường không duy trì được trong thời gian dài. Bởi vậy, các hướng dẫn đều khuyến cáo nên bổ sung thêm các tác nhân dược lý kết hợp trong điều trị béo phì [17], [24], [25], [26].

Sử dụng thuốc chống béo phì được khuyến nghị cho những bệnh nhân có BMI ≥ 30 kg/m² hoặc BMI ≥ 27 kg/m² mắc kèm bệnh liên quan như tăng huyết áp, đái tháo đường typ 2 [22], [23], [25] [26]. Tại Việt Nam, theo hướng dẫn của Bộ Y tế, các trường hợp bệnh nhân có BMI ≥ 25 kg/m² không đạt mục tiêu giảm cân qua can thiệp lối sống sẽ được xem xét điều trị bằng thuốc [17]. Đánh giá hiệu quả của điều trị của thuốc sau 3 tháng. Nếu sau 3 tháng, giảm >5% cân nặng ở bệnh nhân không có bệnh mắc kèm và >3% ở bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường thì nên tiếp tục điều trị [22], [23], [27]. Những cải thiện về chu vi vòng eo và/hoặc thành phần cơ thể cũng có thể được sử dụng. Ngừng điều trị ở bệnh nhân không đáp ứng hoặc sử dụng liệu pháp thay thế [23], [27].

Các thuốc điều trị béo phì

Tính đến năm 2024, có 7 thuốc được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm (FDA) chấp thuận trong điều trị béo phì ở bệnh nhân trưởng thành. Trong khi đó, cơ quan Dược phẩm Châu Âu (EMA) chỉ chấp thuận 5 thuốc [28], [29], [30]. Tại Việt Nam, hiện chỉ có hai thuốc được phê duyệt trong điều trị béo phì là orlistat và liraglutide 3,0mg [17].

Bảng 1. 2. Các thuốc được chấp thuận trong điều trị béo phì

<i>Tên thuốc (Biệt dược)</i>	<i>Phê duyệt (năm)</i>		
	<i>FDA</i>	<i>EMA</i>	<i>Việt Nam</i>
Orlistat (Xenical, Ali)	1999	1998	2008
Phentermin/ topiramate (Qsymia)	2012	-	-
Natrexon/ bupropion (Contrave/ Mysimba)	2014	2015	-
Liraglutide (Saxenda)	2014	2015	2021
Setmelanotid (Imcivree)	2020	2021	-
Semaglutid (Wegovy)	2021	2021	-
Tirzepatid (Zepbound, Mounjaro)	2023	-	-

* Nguồn: Marlene C., 2023 [29], Homayoun L.D., 2016 [30]

Orlistat: được phê duyệt điều trị béo phì tại Việt Nam từ năm 2008, là dẫn xuất dehydro của lipstatin, chất có tác dụng ức chế lipase sinh ra từ vi khuẩn *Streptomyces toxytricini*. Các lipase có tác dụng thủy phân chất béo thành monoglycerin và acid béo. Orlistat gây ức chế mạnh có chọn lọc enzym lipase tụy, vì vậy ức chế sự thoái giáng triglycerid trong thức ăn thành acid béo tự do có khả năng hấp thụ. Orlistat không tác động đặc hiệu lên cơ chế no hoặc sự thèm ăn [17], [31]. Thuốc không ảnh hưởng tới các enzym khác ở ruột như trypsin, chymotrypsin, amylase tụy, cholesteroesterase và carboxyesterase ở gan. Do đó các thành phần glucid, protid trong khẩu phần ăn vẫn được hấp thu bình thường. Orlistat làm giảm lượng chất béo hấp thu ở ruột sau khi ăn, thường là lựa chọn tốt cho những người có xu hướng ăn thức ăn béo [30].

Liraglutide: là thuốc giảm cân dạng tiêm duy nhất được FDA chấp nhận trong điều trị béo phì từ năm 2014. Tuy nhiên, mãi tới năm 2021 mới được phê duyệt ở Việt Nam trong điều trị béo phì mạn tính ở liều 3,0 mg mỗi ngày ở người bệnh có hoặc không có đái tháo đường. Liraglutide là một thuốc đồng vận thụ thể GLP-1 (glucagon-like peptid 1), có cấu trúc giống tới 97% GLP-1 được tiết ra từ tế bào ống tiêu hóa trong cơ thể người. Liraglutide liên kết và kích hoạt thụ thể GLP-1 thông qua đó làm tăng cảm giác no và giảm tín hiệu đói chính, dẫn đến giảm trọng lượng cơ thể. Ngoài ra, liraglutide kích thích bài tiết insulin và giảm bài tiết glucagon, dẫn đến giảm lượng glucose lúc đói và sau ăn. Tác dụng hạ đường huyết rõ rệt hơn ở bệnh nhân tiền sử đái tháo đường [17], [23], [30], [31].

Phentermin/ Topiramate: Đây là loại thuốc kết hợp đầu tiên được FDA chấp thuận cho điều trị béo phì năm 2012. Tuy nhiên EMA chưa phê duyệt loại này do cung cấp thiếu dữ liệu về tác dụng trên tim mạch của phentermin và khả năng gây nghiện thuốc cũng như tác dụng phụ về nhận thức của topiramate khi sử dụng lâu dài. Thuốc tác dụng chủ yếu lên sự thèm ăn [31].

Naltrexon/Bupropion: Bupropion làm tăng hoạt động của các tế bào thần kinh pro-opiomelanocortin (POMC), dẫn đến giảm cảm giác thèm ăn và tăng tiêu hao năng lượng. Naltrexon ngăn chặn các thụ thể opioid trên tế bào thần kinh POMC, ngăn chặn sự ức chế phản hồi của các tế bào thần kinh này và làm tăng thêm hoạt động của POMC. Tác dụng không mong muốn thường gặp nhất là buồn nôn, đau đầu, chóng mặt, mất ngủ [22] [23] .

Semaglutid: là thuốc điều trị được chấp thuận để kiểm soát béo phì từ năm 2021. Semaglutid cũng là một thuốc đồng vận thụ thể GLP-1, có tác dụng tương tự như liraglutide nhưng thời gian tác dụng kéo dài hơn, có thể dùng một lần mỗi tuần. Semaglutid không chỉ điều hòa lượng đường trong máu tương tự GLP-1 tự nhiên mà còn có vai trò giảm năng lượng nạp vào, tăng cảm giác no và giảm cảm giác đói [31].

Setmelanotid: là chất chủ vận thụ thể melanocortin-4 (MC4R), được FDA phê duyệt năm 2020 để điều trị béo phì đơn gen ở người lớn và trẻ em trên 6 tuổi. Thuốc dùng tiêm dưới da, giúp kiểm soát cơn đói và sự thèm ăn.

Tirzepatid: Là thuốc mới nhất được FDA phê duyệt tháng 11 năm 2023 để kiểm soát cân nặng mạn tính ở người lớn mắc bệnh béo phì hoặc thừa cân. Đây là chất chủ vận kép GIP/GLP-1, kích hoạt thụ thể GLP-1 và polypeptid insulinotropic phụ thuộc glucose, làm giảm cảm giác thèm ăn và lượng thức ăn nạp vào.

1.1.2. Rối loạn lipid máu

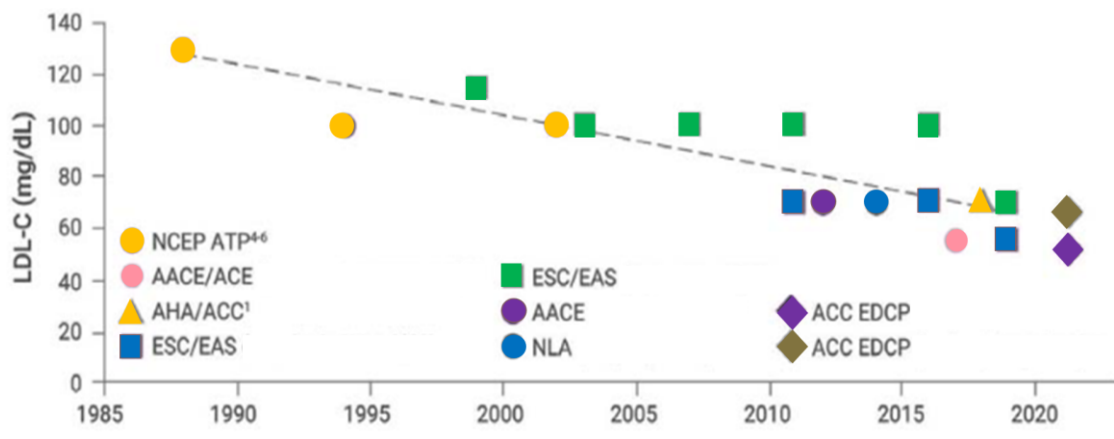
Lipid là một trong những thành phần quan trọng của màng tế bào, gồm hai thành phần chính là cholesterol và triglycerid. Trong máu, lipid phải kết hợp với protein, tạo thành lipoprotein để tan được trong nước và được vận chuyển đến các mô. Lipoprotein là các phân tử hình cầu, gồm 2 phần: phần lõi chứa triglycerid và cholesteryl ester, phần vỏ bao quanh là phospholipid, cholesterol tự do và các phân tử apoprotein [32], [33]. Quá trình chuyển hóa lipoprotein trong cơ thể xảy ra theo ba con đường ngoại sinh, nội sinh và vận chuyển ngược cholesterol [34], [35].

* Nguồn: Theo Albert S. và cộng sự (2021) [34]

Theo tiêu chuẩn hiện đại, rối loạn lipid máu được chẩn đoán khi nồng độ lipid và/hoặc lipoprotein huyết tương không đạt mức trị số mục tiêu được khuyến nghị cho dự phòng bệnh tim mạch do xơ vữa [36].

Điều trị rối loạn lipid máu

Các Hiệp hội Tim mạch lớn trên thế giới đều xác định LDL-C là mục tiêu tiên phát trong điều trị rối loạn lipid máu [37], [38]. Theo đó, nồng độ LDL-C càng thấp thì nguy cơ tim mạch càng giảm [39]. Mục tiêu LDL-C cần đạt trong điều trị bệnh lý tim mạch có xu hướng ngày càng nghiêm ngặt và giảm xuống thấp trong các hướng dẫn điều trị.



Hình 1. 2. Mục tiêu LDL-C trong các hướng dẫn điều trị theo thời gian

* Nguồn: Theo Nguyễn Dương Khang và cộng sự (2023) [39]

Ngoài LDL-C, hiện nay, non HDL-C và apolipoprotein B cũng được xác định là các đích điều trị. Giảm non HDL-C và apoB được xem là mục tiêu điều trị thứ hai trong dự phòng bệnh tim mạch do xơ vữa [36].

Bảng 1. 3. Đích điều trị LDL-C, non HDL-C và apolipoprotein B

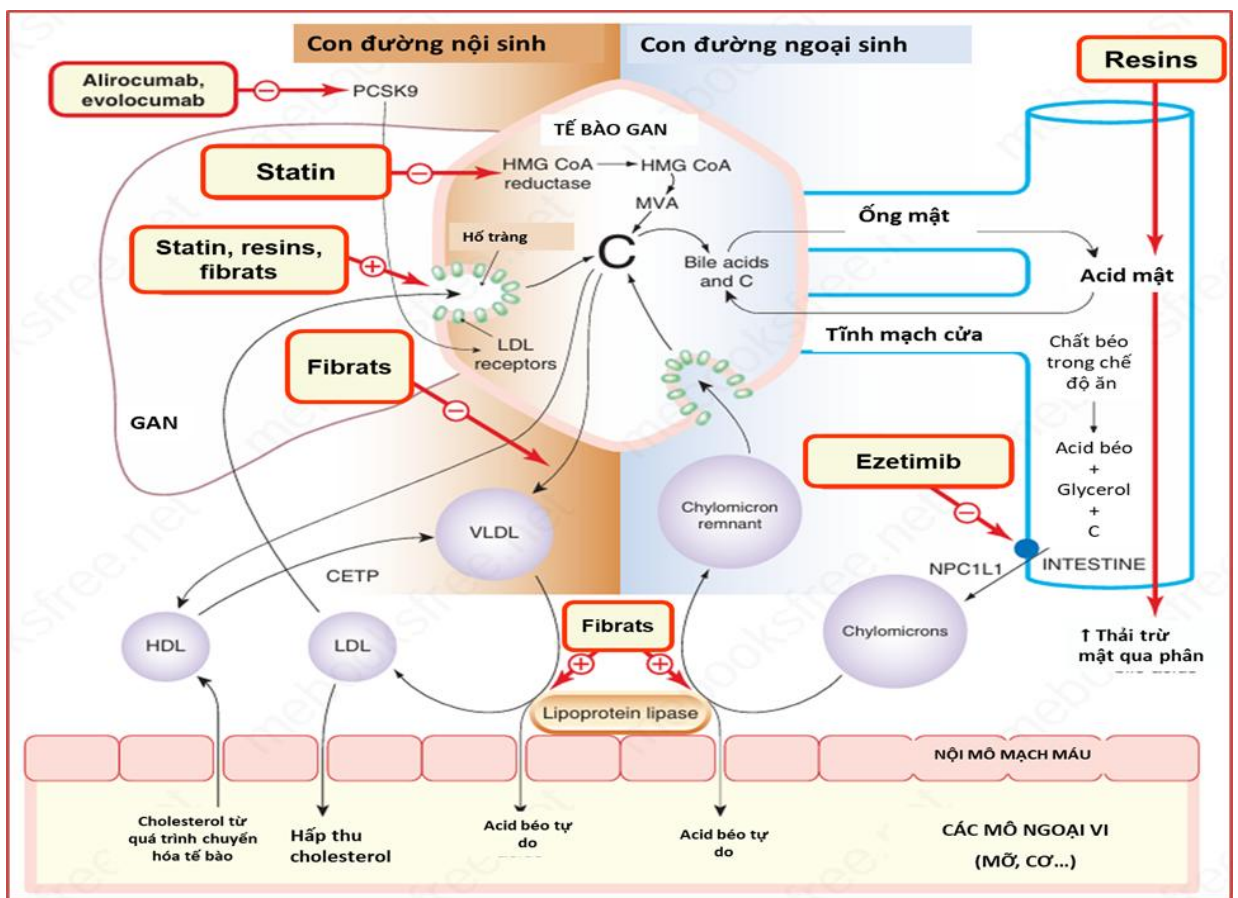
Nguy cơ tim mạch	Đích LDL-C (mmol/L)	Đích Non HDL-C (mmol/L)	Đích Apolipoprotein (mg/dL)
Thấp, Trung bình	<2,6	< 3,4	<100
Cao	Giảm $\geq 50\%$ và <1,8	< 2,6	<80
Rất cao	Giảm $\geq 50\%$ và <1,4	< 2,2	<65

* Nguồn: European Heart Journal (2021) [40], Hội Tim mạch học Việt Nam (2022) [41]

Khuyến cáo của Hội Tim mạch học Việt Nam năm 2024 có đưa ra thêm đề xuất về mức TG mục tiêu đạt $<1,7$ mmol/L (<150 mg/dL). Mặc dù TG không gây xơ vữa nhưng nồng độ TG máu gián tiếp đánh giá tình trạng lipoprotein giàu TG. Việc giảm nồng độ TG toàn phần và các lipoprotein giàu TG có xu hướng làm giảm biến cố tim mạch. Ngoài ra, Lp(a) cũng không có mức mục tiêu nhưng có thể cân nhắc ở mức <125 nmol/L [36].

Các thuốc điều trị rối loạn lipid máu

Hiện nay, có nhiều nhóm thuốc được phê duyệt trong điều trị RLLPM với các cơ chế khác nhau như: statin, fibrat, niacin, thuốc ức chế hấp thụ cholesterol (ezetimib), thuốc gắn acid mật, thuốc ức chế PCSK9, omega-3 acid béo, acid bempedoic, inclisiran... Các thuốc này giúp giảm LDL-C, triglycerid, tăng HDL-C và đặc biệt có hiệu quả trong việc giảm nguy cơ bệnh tim mạch.



Hình 1. 3. Vị trí tác dụng của một số nhóm thuốc điều trị RLLPM

* Nguồn: Rang & Dale's Pharmacology (2020) [35]

Nhóm statin: Cho đến nay, trong điều trị RLLPM, statin vẫn là thuốc được lựa chọn hàng đầu, có vai trò quan trọng cho cả mục tiêu LDL-C và non HDL-C, đồng thời giúp giảm các biến cố tim mạch [35], [42]. Chiến lược sử dụng statin được Hội Tim mạch học Hoa Kỳ và Hiệp hội Tim Hoa Kỳ khuyến cáo dựa trên mức độ làm giảm LDL-C máu [43]. Tuy nhiên, nếu các mục tiêu điều trị không đạt được với liều tối đa có thể dung nạp của statin, có thể xem xét kết hợp với các nhóm thuốc khác [37], [41], [38]. Hiện nay, có 7 loại statin được FDA phê duyệt sử dụng trong điều trị RLLPM, bao gồm: Atorvastatin (Lipitor, Torvast), rosuvastatin (Crestor), simvastatin (Zocor, Lipex), pravastatin (Pravachol, Lipostat, Selektine), fluvastatin (Lescol), lovastatin (Mevacor, Altocor, Altoprev) và pitavastatin (Livalo, Pitava). Tác động của statin lên các chỉ số lipid máu phụ thuộc vào từng thuốc và liều dùng [36], [43], [44]. Statin làm giảm tổng hợp cholesterol trong gan qua cơ chế ức chế cạnh tranh với enzym HMG-CoA reductase, từ đó làm giảm tốc độ sinh tổng hợp cholesterol. Khi nồng độ cholesterol nội bào giảm sẽ thúc đẩy tăng biểu hiện thụ thể LDL trên bề mặt tế bào gan, làm tăng hấp thu các phân tử LDL trong máu, do đó làm giảm nồng độ LDL và các lipoprotein chứa ApoB trong máu [32], [33], [36], [45]. Ngoài ra, các statin cũng làm giảm triglycerid và tăng nhẹ HDL-C [46].

Dẫn chất của acid fibric (fibrat): Fibrat là chất đồng vận của thụ thể kích hoạt peroxisome proliferator α (PPAR α), hoạt động thông qua các yếu tố phiên mã điều hòa các bước khác nhau trong chuyển hóa lipid mà lipoprotein. Vì vậy, fibrat có hiệu quả tốt trong việc giảm nồng độ TG lúc đói [36]. Ngoài ra, tác dụng kích hoạt PPAR α của fibrat còn gây ra quá trình phiên mã các gen cho các apoprotein chính của HDL là apo AI và apo AII. Do vậy sử dụng fibrat còn làm tăng HDL-C [38], [47]. Theo ESC/EAS 2019, fibrat có thể làm giảm 50% TG, giảm 20% LDL, tăng 20% HDL, giảm các biến cố tim mạch, chủ yếu là biến cố động mạch vành [37]. Fenofibrat và gemfibrozil được sử dụng phổ

biến trên lâm sàng, có hiệu quả trong giảm triglycerid và tăng HDL [38]. Người bệnh sử dụng statin đã đạt mục tiêu LDL-C nhưng triglycerid > 2,3 mmol/l có thể cân nhắc sử dụng fenofibrat hoặc bezafibrat [41].

Thuốc gắn acid mật: Sử dụng các thuốc gắn acid mật có thể làm giảm khoảng 18-25% LDL-C, tăng nhẹ triglycerid và không ảnh hưởng đến HDL-C [36], [37]. Về cơ chế, thuốc gắn với acid mật trong ruột, ngăn cản tái hấp thu các acid mật vào chu trình gan ruột, dẫn đến tăng bài tiết acid mật qua phân, kích thích chuyển hóa cholesterol thành acid mật trong gan. Sự tăng tổng hợp acid mật làm giảm nồng độ cholesterol trong gan, dẫn đến hoạt hóa chu trình SREBP, kích thích sản xuất thụ thể LDL, do đó làm tăng tốc độ thanh thải LDL [37].

Ezetimib: Ezetimib là thuốc ức chế hấp thu cholesterol tại tế bào bàn chải trên thành ruột từ nguồn thức ăn và mật được bài tiết ra mỗi ngày mà không ảnh hưởng tới sự hấp thu triglycerid, acid béo, acid mật hoặc các vitamin tan trong dầu. Ezetimib liên kết với NPC1L1 và ức chế hấp thu cholesterol ở ruột, giảm lượng cholesterol đưa đến gan. Do đó, gan phản ứng bằng cách tăng biểu hiện của thụ thể LDL, từ đó dẫn tới tăng độ thanh thải LDL khỏi máu [37]. Hội Tim mạch học Việt Nam khuyến cáo sử dụng phối hợp statin với ezetimib trong điều trị RLLPM ở bệnh nhân đái tháo đường nếu LDL-C mục tiêu không đạt được hoặc ở người bệnh suy thận mạn chưa lọc máu, giai đoạn 3-5 [41].

Omega-3 acid béo: Các acid béo không no họ omega-3 có tác dụng làm giảm triglycerid và VLDL, ít ảnh hưởng đến LDL và HDL-C [32], [36], [48]. Icosapent ethyl (Vascepa) được FDA phê duyệt năm 2012 để giảm mức triglycerid ở bệnh nhân có mức triglycerid cao. Tuy nhiên, tới tháng 12 năm 2019, FDA đã mở rộng chỉ định của Vascepa, phê duyệt thuốc này để giảm nguy cơ tim mạch ở người có tăng triglycerid máu (từ 150 mg/dL trở lên). Hiện các thuốc nhóm omega-3 acid béo đã được phê duyệt và sử dụng trong điều trị RLLPM tại Việt Nam.

Niacin (acid nicotinic): Ở gan, acid nicotinic ức chế diacylglycerol acyltransferase-2, từ đó làm giảm bài tiết VLDL. Ngoài ra thuốc còn kích thích sản xuất ApoA1 ở gan, dẫn đến làm tăng HDL-C và ApoA1 [36], [33]. Thuốc giảm triglycerid, VLDL và tăng HDL tốt hơn fibrat nhưng dung nạp kém, giới hạn liều điều trị và nhiều tác dụng phụ nên niacin ít được dùng.

Thuốc ức chế PCSK9: PCSK9 là protease liên kết với LDL-R trên bề mặt tế bào gan, gây giáng hóa LDL-R, làm giảm sự nhập LDL-C vào trong tế bào gây tăng LDL-C trong máu. Khi PCSK9 bị ức chế sẽ tăng LDL-R, giúp tăng nhập LDL vào trong tế bào, làm hạ LDL-C máu [36], [37], [48]. Đơn trị liệu thuốc ức chế PCSK9 hoặc phối hợp với statin và/hoặc các thuốc điều trị RLLPM khác làm giảm khoảng 60% nồng độ LDL-C [36]. Hai thuốc alirocumab và evolocumab đã được FDA cấp phép lưu hành từ năm 2015 giúp giảm LDL-C ở bệnh nhân có nguy cơ tim mạch cao. Tuy nhiên các thuốc này vẫn chưa được sử dụng phổ biến tại Việt Nam do giá thành cao.

Inclisiran: Đây là nhóm thuốc mới có tác dụng làm giảm LDL-C do ức chế tổng hợp PCSK9. Thuốc gắn vào tiền chất của mRNA PCSK9, gây ức chế quá trình dịch mã và sản xuất PCSK9. Khi PCSK9 giảm thì số lượng thụ thể LDL sẽ được tái sử dụng, từ đó làm giảm nồng độ LDL-C trong máu [36]. Tháng 12 năm 2021, Novartis đã công bố sự chấp thuận của FDA đối với Leqvio (inclisiran), đây là liệu pháp can thiệp RNA nhỏ (siRNA) đầu tiên và duy nhất để giảm cholesterol lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL-C). Hiện nay inclistan vẫn chưa được sử dụng phổ biến tại Việt Nam.

Acid bempedoic (Nexletol): Đây là thuốc dạng tiền chất, sử dụng theo đường uống, được chuyển hóa ở gan thành dạng hoạt động. Thuốc ức chế tổng hợp cholesterol bằng cách ức chế hoạt động của enzym adenosin triphosphat citrate lyase, là enzym có vai trò trong việc chuyển acid citric thành acetyl CoA, chất cần thiết để tổng hợp cholesterol. Acid bempedoic có tác dụng ức chế con đường sinh tổng hợp cholesterol tương tự như statin, dẫn đến làm tăng nồng độ

LDL-R, làm giảm LDL-C [33], [48]. Acid bempedoic được FDA phê duyệt vào tháng 2 năm 2020, chỉ định cho bệnh nhân có mức LDL-C cao và nguy cơ tim mạch cao, đặc biệt với những người không thể sử dụng statin. Hiện tại, acid bempedoic vẫn chưa được sử dụng rộng rãi ở Việt Nam.

Mipomersen: là thuốc đầu tiên ức chế oligonucleotide acid nucleic làm giảm tổng hợp apo B-100. Mipomersen gắn với mRNA của apo B-100 dẫn đến giáng hóa mRNA, do đó làm giảm biểu hiện của protein apo B-100 [32], [33], [48]. Mipomersen được FDA phê duyệt năm 2013 để điều trị giảm LDL-C cho bệnh nhân tăng cholesterol máu gia đình đồng hợp tử (HoFH). Tuy nhiên, Cục Dược phẩm Châu Âu (EMA) vẫn chưa cho phép lưu hành mipomersen. Tại Việt Nam, thuốc này cũng chưa được sử dụng.

Lomitapid (Juxtapid): Lomitapid ức chế MTP (microsomal TG transfer protein) là protein vận chuyển triglycerid và phospholipid từ lưới nội chất đến apoB để tạo VLDL. Do đó thuốc làm giảm VLDL ở gan và chylomicron ở ruột. Lomitapid được FDA phê duyệt năm 2012, chỉ định hỗ trợ điều trị cho bệnh nhân tăng cholesterol máu gia đình đồng hợp tử (HoFH) cùng với statin. Theo đồng thuận của Hội xơ vữa châu Âu 2023, lomitapid là liệu pháp thêm vào khi không đạt được mục tiêu điều trị hạ lipid máu khi đã dùng statin và ezetimib có kèm hoặc không kèm thuốc ức chế PCSK9 [33], [48]. Tại Việt Nam, việc sử dụng thuốc này còn hạn chế do chi phí cao và tác dụng phụ nghiêm trọng.

Evinacumab (Evkeeza): Là kháng thể đơn dòng ức chế angiopoietin-like 3 (ANGPTL3). Đây là protein giống angiopoietin, biểu hiện chủ yếu ở gan, có vai trò điều hòa chuyển hóa lipid bằng cách ức chế lipoprotein lipase và lipase nội mô. Thuốc liên kết và ức chế ANGPTL3 dẫn đến giảm LDL-C, HDL-C và triglycerid. Tháng 2 năm 2021, FDA phê duyệt evinacumab, như một phương pháp điều trị bổ sung cho bệnh nhân từ 12 tuổi trở lên mắc chứng tăng cholesterol máu gia đình đồng hợp tử [49]. Thuốc này hiện chưa được phổ biến ở Việt Nam.

1.2. Một số mô hình nghiên cứu tác dụng chống béo phì và hạ lipid máu

1.2.1. Các mô hình gây béo phì trên *in vivo*

1.2.1.1. Mô hình gây động vật béo phì bằng chế độ ăn

Chế độ ăn giàu năng lượng có thể gây béo phì cho động vật thí nghiệm do làm mất cân bằng năng lượng cơ thể. Trạng thái cân bằng giữa năng lượng do thức ăn cung cấp và năng lượng tiêu hao giúp cơ thể giữ được cân nặng ổn định. Nếu quá trình này mất cân bằng, các chất protein, lipid, glucid đều có thể trở thành chất béo dự trữ, tích lại trong cơ thể và gây thừa cân, béo phì. Có nhiều chế độ ăn khác nhau được sử dụng để gây béo phì cho động vật thí nghiệm như chế độ ăn nhiều chất béo (high fat diet - HFD), chế độ ăn nhiều đường (high sugar diet - HSD), chế độ ăn nhiều đường và chất béo (high sugar and high fat - HSHF) [50], [51]. Trong đó, mô hình chuột béo phì do chế độ ăn giàu chất béo HFD được áp dụng phổ biến trong các nghiên cứu. Tỷ lệ chất béo trong chế độ ăn HFD là 45% - 60% [51], [52]. Việc tiêu thụ chế độ ăn giàu chất béo dẫn đến sự phát triển bệnh béo phì giống như người vì nó làm tăng lượng mỡ trong cơ thể và leptin, đồng thời kích thích sự phát triển của các bệnh khác như tăng huyết áp và chứng không dung nạp glucose. Chế độ ăn HFD làm thay đổi quá trình trao đổi chất ở chuột, có tới 91 trong tổng số 447 chất chuyển hóa được phát hiện có thay đổi đáng kể, bao gồm lipid, acid béo tự do, chất chuyển hóa năng lượng, acid amin... [53]. Thời gian cần thiết để gây mô hình béo phì do chế độ ăn HFD thường từ 8 tuần đến 27 tuần [54].

Một nghiên cứu so sánh sự khác chuyển hóa lipid và mô mỡ giữa 2 chủng chuột *Wistar* và *Sprague-Dawley* cho thấy có sự khác biệt trong chuyển hóa lipid như sự hấp thụ acid béo và quá trình tạo mỡ, cũng như sự tương tác giữa gen và chế độ ăn uống giữa 2 chủng này. Do vậy, chuột chủng *Wistar* dễ bị béo phì hơn chủng chuột *Sprague-Dawley* [55]. Chuột trưởng thành (6 đến 8 tuần tuổi) có tốc độ tăng cân nhanh hơn chuột già, chuột đực non có khả năng tăng

cân nhiều hơn chuột cái. Tuy nhiên, tới giai đoạn trưởng thành thì chuột cái lại tăng cân nhiều hơn chuột đực [54].

Gây động vật béo phì bằng chế độ ăn HFD là phương pháp phổ biến trong các thử nghiệm sàng lọc thuốc chống béo phì bởi dễ thực hiện và hiệu quả gây béo phì cao. Tuy nhiên do chế độ ăn có nhiều chất béo nên chuột rất nhanh chán ăn, phải thay đổi chế độ ăn liên tục nhưng vẫn phải đảm bảo về hàm lượng chất béo để duy trì được tình trạng béo phì của chuột. Trong nghiên cứu của luận án, chúng tôi sử dụng chế độ ăn HFD để gây mô hình chuột béo phì trong đánh giá tác dụng chống béo phì của CKL-THV.

1.2.1.2. Mô hình gây động vật béo phì bằng cách tác động lên vùng dưới đồi

Trung tâm no của cơ thể nằm ở nhân bụng giữa vùng dưới đồi. Khi nhân này bị tổn thương, tín hiệu báo no từ ngoại vi đến vùng dưới đồi bị rối loạn, chuột ăn nhiều mà không cảm thấy no, cơ thể tăng cân nhanh chóng, dẫn đến béo phì. Trung tâm đói của cơ thể nằm ở nhân bên của vùng dưới đồi. Khi nhân này bị tổn thương, cơ thể sẽ mất cảm giác thèm ăn, trọng lượng cơ thể sẽ giảm. Do vậy, để tạo ra động vật thực nghiệm béo phì, có thể làm tổn thương trung tâm no hay nhân bụng giữa của vùng dưới đồi [56]. Các phương pháp gây tổn thương vùng dưới đồi gồm phẫu thuật hoặc dùng hóa chất (thioglucozơ vàng và natri glutamat). Phẫu thuật vùng dưới đồi thường khó thực hiện, yêu cầu kỹ thuật cao. Phương pháp sử dụng thioglucozơ vàng làm phát triển mạnh bệnh béo phì, song tình trạng này không giống với tình trạng béo phì mạn tính ở người. Sử dụng natri glutamat gây béo phì cho chuột dễ thực hiện hơn và tỉ lệ chuột chết thấp hơn so với sử dụng thioglucozơ vàng [56], [57].

1.2.1.3. Mô hình gây động vật béo phì do di truyền

Trong nghiên cứu tác dụng chống béo phì của chế phẩm, có thể gây chuột béo phì do di truyền bằng cách sử dụng các mô hình gây đột biến đơn gen hoặc đa gen [58], [50]. Đột biến đơn gen trong con đường leptin gồm các mô hình

động vật thiếu hụt leptin hoặc không nhạy cảm với leptin. Đột biến đa gen thường được tạo bởi mô hình béo phì do chế độ ăn uống [58].

Bảng 1. 4. Một số mô hình gây động vật béo phì do di truyền

Mô hình	Đặc điểm	Nguồn
Chuột nhắt ob/ob	Gen ob quy định sự tổng hợp leptin, là một chất kiểm soát sự thèm ăn và khả năng dự trữ mỡ của cơ thể. Chuột ob/ob biểu hiện thiếu leptin, là chủng béo phì tự phát kèm đái tháo đường.	[58]
Chuột nhắt db/db	Gen db nằm trên nhiễm sắc thể thường số 4, quy định receptor của leptin do đó gây kháng leptin. Chuột db mang đột biến trên receptor leptin, gây thiếu hụt thụ thể leptin nên không có đáp ứng khi đưa leptin vào cơ thể, thường được sử dụng trong nghiên cứu kháng leptin.	[59], [60], [61]
Chuột công Zucker	Đây là một mô hình kinh điển và được sử dụng rộng rãi gây bệnh béo phì kèm tăng insulin huyết. Bệnh béo phì do đột biến gen lặn fa trên nhiễm sắc thể thường số 5 và phát triển từ rất sớm. Chuột béo Zucker (fa/fa) biểu hiện không dung nạp glucose nhẹ, tăng insulin huyết và kháng insulin ở ngoại vi.	[61]
Chuột nhắt lông vàng (A ^Y A)	Đây là giống chuột mang đột biến gen agouti (A ^Y) quy định tình trạng béo phì và màu lông chuột. Gen agouti có ở các mô mỡ và có liên quan đến hệ thống melanocortin 4 receptor (MC4R) làm tăng dung nạp thức ăn. Vì vậy, các chất chủ vận trên MC4R sẽ làm giảm dung nạp thức ăn, gây giảm cân.	[58]

Mô hình	Đặc điểm	Nguồn
Chuột nhắt NZO	Đặc điểm của chuột NZO (NewZealand obese) là béo phì, mắc đái tháo đường typ 2 nặng. Cơ thể không dung nạp glucose, tăng insulin huyết và đề kháng insulin.	[62]
Chuột cống OLETF	Chuột mắc bệnh béo phì thể nhẹ, tăng đường huyết muộn (sau 18 tuần tuổi), tăng sinh nhiều ổ bệnh trên các tiểu đảo tụy và xuất hiện những biến chứng trên thận (tổn thương dạng nhiều u nhỏ). Ngoài ra, chuột OLETF thiếu hụt cholecystinin A receptor (CCK-AR) làm suy giảm chức năng bài tiết acid và làm rộng dạ dày. Do vậy, mô hình này thích hợp cho các nghiên cứu về bệnh béo phì hình thành sớm và các nghiên cứu đánh giá chức năng của receptor CCK.	[58], [63], [64]

1.2.2. Các mô hình gây tăng lipid máu trên in vivo

1.2.2.1. Mô hình gây tăng lipid máu theo con đường nội sinh

Ở người, chỉ có 30% cholesterol trong cơ thể có nguồn gốc ngoại sinh do chế độ ăn cung cấp, còn 70% cholesterol trong cơ thể có nguồn gốc nội sinh được tổng hợp ở gan. Do đó, ức chế quá trình tổng hợp cholesterol nội sinh là đích tác dụng của nhiều thuốc điều trị RLLPM. Các tác nhân thường được sử dụng để gây tăng lipid máu nội sinh nhanh và rõ rệt là poloxamer 407, Tween 80, Triton WR-1339. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng estrogen để gây tăng lipid máu theo con đường nội sinh, tuy nhiên phương pháp này chỉ thích hợp cho việc nghiên cứu các thuốc có tác dụng hạ cholesterol máu tương tự tác dụng của thyroxin (thuốc có tác dụng đảo ngược chứng tăng cholesterol máu do estrogen) [65], [66], [67]. Hiện nay, theo cơ chế nội sinh, thường sử dụng mô hình gây tăng lipid máu bởi poloxamer 407.

Mô hình gây tăng lipid máu bởi Poloxamer 407: Poloxamer 407 (P407) là một chất diện hoạt gây tăng lipid máu và xơ vữa động mạch nặng trên các

loài gặm nhấm. Chuột sau 2 giờ tiêm P-407 phát triển chứng tăng lipid máu. Cơ chế gây rối loạn lipid máu của P407 là gây ức chế lipoprotein lipase huyết tương và cholesterol 7 α hydroxylase, làm tăng số lượng và hoạt động của 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzym A reductase, giảm số lượng receptor LDL tại gan. Vì vậy, khi sử dụng P407 gây rối loạn lipid máu sẽ làm tăng cả cholesterol và triglycerid máu [67], [68]. Ngoài ra, P407 còn có cơ chế khác gây tăng lipid máu. Bước đầu tiên trong quá trình chuyển hóa lipid ở gan là sự di chuyển thuốc qua các lỗ nhỏ kích thước 100-200nm ở màng trong các tế bào gan. P407 gây nên tình trạng mở lỗ ở ở màng trong tế bào gan in vivo. Khoảng 24 giờ sau khi tiêm màng bụng P-407 cho chuột, những lỗ này giảm xuống khoảng 80% tương ứng với sự tăng lên khoảng 10 lần lipid huyết tương. Các tổn thương xơ vữa động mạch bắt đầu được hình thành sau 1 tháng sử dụng P407 hàng ngày. Liều lượng P-407 trong các mô hình tăng lipid máu nội sinh trên chuột nhất thường là 200mg/kg thể trọng. Động vật thí nghiệm được sử dụng chế phẩm nghiên cứu trong 7 ngày, sau đó gây tăng lipid máu bằng cách tiêm màng bụng P407. Sau 24 giờ kể từ khi tiêm P407, lấy máu chuột để phân tích các chỉ số lipid máu [69], [70]. Các thuốc đối chứng được sử dụng là các statin như pravastatin, simvastatin, lovastatin [67], [68]. P407 có khả năng làm tăng lipid máu tương đương với triton, nhưng được cho là an toàn hơn, mang lại nhiều lợi thế, đặc biệt nếu thử nghiệm trong thời gian dài [71]. Do vậy đây là mô hình phổ biến được áp dụng cho nhiều nghiên cứu để đánh giá sàng lọc một cách nhanh chóng tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu của một thuốc mới hoặc một sản phẩm mới, đặc biệt là các thuốc có tác dụng ức chế HMG-CoA reductase. Trong nghiên cứu, chúng tôi lựa chọn phương pháp gây tăng lipid máu nội sinh bằng P407 bởi tính phổ biến và nhiều ưu điểm vượt trội hơn so với các mô hình khác.

1.2.2.2. Mô hình gây tăng lipid máu theo con đường ngoại sinh

Mô hình được xây dựng dựa trên vai trò của các chất béo ngoại sinh, chế độ ăn uống giàu calo trong cơ chế bệnh sinh RLLPM ở người. Động vật được gây tăng lipid máu bằng cách bổ sung cholesterol hoặc acid béo bão hòa và triglycerid vào chế độ ăn uống [72], [73]. Ngoài ra, để làm tăng hấp thu cholesterol, có thể bổ sung thêm acid cholic (acid mật) và hormon kháng giáp trạng. Sau khi vào cơ thể, cholesterol ngoại sinh nhanh chóng được hấp thu, thúc đẩy sự tổng hợp lipoprotein ở gan và vận chuyển lipoprotein trong máu [66]. Phương pháp này thường được sử dụng trong các trường hợp nghiên cứu các thuốc có tác dụng trên hấp thu, chuyển hóa và bài tiết cholesterol.

Nhìn chung, các mô hình gây tăng lipid máu ngoại sinh tương đối giống tình trạng rối loạn lipid máu do ăn uống ở người, dễ thực hiện, và được sử dụng khá phổ biến. Tuy nhiên thời gian nghiên cứu thường dài, phải theo dõi liên tục để đánh giá được quá trình tăng lipid máu. Ngoài ra, để xây dựng được một chế độ ăn hoàn chỉnh gây tăng lipid máu cao nhất mà không ảnh hưởng đến sự phát triển của động vật, không làm động vật chán ăn, lượng calo đưa vào cơ thể cao nhưng không gây giảm hấp thu các chất khác là không dễ. Lượng thức ăn mà động vật tiêu thụ cũng khó kiểm soát chính xác. Động vật thí nghiệm sử dụng trong nghiên cứu về rối loạn lipid máu theo con đường nội sinh thường là chuột hoặc thỏ. Thỏ là động vật thí nghiệm đầu tiên được sử dụng trong nghiên cứu về rối loạn chuyển hóa lipoprotein và xơ vữa động mạch [66]. Mô hình cổ điển trên thỏ được sử dụng khá rộng rãi trong nhiều năm để đánh giá hiệu quả của thuốc hạ lipid máu, tuy nhiên xu hướng sử dụng giảm dần từ năm 2000. Hạn chế của mô hình này là cho động vật ăn cỏ (thỏ) sử dụng chế độ ăn giàu cholesterol và mỡ sẽ khó khăn. Việc sử dụng thỏ có ít lợi thế hơn so với sử dụng loài gặm nhấm.

Phương pháp của Nassiri và cộng sự (2009): Cho chuột cống trắng chủng Wistar uống hỗn hợp dầu cholesterol (gồm 10g cholesterol; 10g acid

cholic và 3g PTU, dầu lạc vừa đủ 100ml) với liều 10ml/kg thể trọng vào các buổi sáng, trong suốt 28 ngày liên tục. Sau khi uống hỗn hợp dầu cholesterol khoảng 2 giờ, cho chuột sử dụng thuốc nghiên cứu. Các thông số đánh giá bao gồm TC, TG, HDL, LDL, VLDL. Phương pháp này đã gây được chuột rối loạn lipid máu với TC tăng lên $9,65 \pm 0,1$ mmol/l trong khi ở nhóm đối chứng là $3,7 \pm 0,1$ mmol/l, tức là tăng lên hơn 160% [74]. Mô hình trên chuột là một mô hình khá phổ biến để nghiên cứu các thuốc có tác dụng hạ lipid máu. Phương pháp này đơn giản, có thể kiểm soát được lượng cholesterol đưa vào. Thời gian gây mô hình là 28 ngày, phù hợp với các nghiên cứu sàng lọc. Tuy mô hình trên cho kết quả tốt nhưng hàm lượng acid cholic được sử dụng khá cao, trong khi giá thành lại đắt. Do vậy, chi phí nghiên cứu thường lớn.

Năm 2013, *Nguyễn Trọng Thông và cộng sự* đã xây dựng một mô hình thực nghiệm gây rối loạn lipid máu có tính khả thi cao, chi phí rẻ hơn và có nhiều đặc điểm tương đồng với rối loạn lipid máu trên người. Dựa trên mô hình của Nassiri, Nguyễn Trọng Thông và các cộng sự đã tiến hành điều chỉnh, giảm hàm lượng acid cholic xuống 10 lần, giảm lượng propyl thiouracil 6 lần. Chuột được uống 0,1ml/10g hỗn hợp dầu cholesterol chứa 10mg cholesterol, 0,5g PTU và 1g acid cholic, dầu lạc vừa đủ 100ml trong thời gian 4 tuần. Kết quả nghiên cứu đã gây được mô hình rối loạn lipid máu trên chuột với nồng độ TC tăng 103,2%, LDL-C tăng 153,2%, TG tăng 16,4% [75]. Như vậy, sau khi điều chỉnh, mô hình thành công với kết quả tăng cholesterol máu ngoại sinh ổn định, đồng nhất trên chủng chuột cống có ở Việt Nam. Trên thực tế, mô hình này cũng được một số tác giả tại Việt Nam áp dụng trong nghiên cứu và cho thấy có tính ổn định tốt [76], [72], [77], [78]. Do vậy, phương pháp này đã được chúng tôi lựa chọn sử dụng trong nghiên cứu đánh giá tác dụng hạ lipid máu của CKL-THV theo cơ chế ngoại sinh.

1.2.3. Các mô hình nghiên cứu cơ chế tác dụng trên *in vitro*

RLLPM và béo phì là hai tình trạng bệnh lý thường đi đôi với nhau và có mối liên hệ chặt chẽ tới sự chuyển hóa lipid trong cơ thể. Lipid máu tăng, đặc biệt là tăng cholesterol là kết quả của sự tăng hấp thu cholesterol từ ruột, tăng tổng hợp cholesterol nội sinh và giảm thải trừ lipid từ máu. Do đó, có 3 hướng tiếp cận để đánh giá cơ chế tác dụng của thuốc là ức chế sinh tổng hợp cholesterol, ức chế hấp thu cholesterol ở ruột và tăng thải trừ lipid từ máu.

Quá trình sinh tổng hợp cholesterol được chia thành nhiều giai đoạn, với sự xúc tác của nhiều enzym. Trong đó, quan trọng phải kể đến enzym HMG-CoA reductase. Trong tổng hợp cholesterol, HMG CoA reductase xúc tác quá trình chuyển hydroxymethylglutaryl-CoA thành acid mevalonic, tiền chất của cholesterol. Do vậy, ức chế enzym này sẽ ức chế tổng hợp cholesterol, làm giảm cholesterol máu [79]. Trong quá trình hấp thu cholesterol ở ruột, cholesterol esterase là enzym có vai trò quan trọng trong việc phân giải cholesterol ester thành cholesterol tự do, ảnh hưởng đến mức cholesterol trong máu. Do vậy, ức chế enzym này cũng sẽ ức chế hấp thu cholesterol, làm giảm cholesterol máu [80]. Như vậy, cả hai enzym HMG-CoA reductase và cholesterol esterase đều có mối liên quan chặt chẽ tới bệnh rối loạn lipid máu và béo phì thông qua việc điều hòa chuyển hóa lipid trong cơ thể. Do vậy trong luận án, để đánh giá cơ chế tác dụng của CKL-THV trong nghiên cứu *in vitro*, chúng tôi tập trung vào nghiên cứu đánh giá tác dụng ức chế enzym HMG-CoA reductase và enzym cholesterol esterase.

1.2.3.1. Đánh giá tác dụng ức chế enzym HMG-CoA reductase

Trong các nghiên cứu, việc đánh giá tác dụng ức chế enzym HMG-CoA reductase *in vitro* thường được thực hiện bằng cách sử dụng cơ chất HMG-CoA. Để đánh giá tác dụng ức chế enzym này, có thể áp dụng các phương pháp phân tích hiện đại như quang phổ UV-VIS [81], [82], [83], sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [84] hoặc sắc ký lỏng kết hợp khối phổ (LC-MS/MS) [85].

Phương pháp quang phổ UV-Vis là một phương pháp phổ biến và dễ tiếp cận trong các phòng thí nghiệm, với thiết bị tương đối đơn giản và chi phí đầu tư thấp. Trong phương pháp quang phổ UV-Vis, để phản ánh quá trình chuyển đổi NADPH thành NADP^+ dưới sự tác động của enzym HMG-CoA reductase, đo sự giảm hấp thụ của NADPH tại bước sóng 340 nm. Chế phẩm được kết hợp với một hỗn hợp phản ứng gồm nicotinamid adenin dinucleotid phosphat (NADPH), chất nền HMG-CoA, và dung dịch đệm potassium phosphate (chứa potassium chlorid, ethylen diamin tetraacetic acid, và dithiothreitol). Sau đó, thêm enzym HMG-CoA reductase vào hỗn hợp, ủ ở nhiệt độ 37°C . Sau 10 phút, tiến hành đo độ hấp thụ tại bước sóng 340 nm. Các thuốc nhóm statin được sử dụng làm chứng dương, nước cất được sử dụng làm chứng âm [81], [82], [83].

Hiện nay, để đánh giá khả năng ức chế enzym HMG-CoA reductase có thể sử dụng các bộ KIT thương mại sẵn có trên thị trường. Bộ Kit của Sigma – Aldrich hoặc BioVision được nhiều tác giả lựa chọn trong nghiên cứu đánh giá tác dụng ức chế HMG-CoA reductase *in vitro* [81], [83], [82]. Các bộ kit đều sử dụng nguồn enzym dạng tinh khiết nên độ đặc hiệu tốt, ít bị ảnh hưởng bởi các yếu tố nhiễu, tuy nhiên giá thành thử nghiệm khá cao.

1.2.3.2. Đánh giá hoạt tính ức chế enzym cholesterol esterase

Cholesterol esterase là một enzym quan trọng tham gia vào quá trình chuyển hóa lipid của cơ thể. Trong ruột non, cholesterol esterase do tuyến tụy tiết ra có vai trò thủy phân cholesterol ester từ thức ăn thành cholesterol tự do, giúp cholesterol có thể dễ dàng hấp thu qua thành ruột. Ở mô gan và các mô khác, cholesterol esterase cũng giúp phân giải cholesterol ester dự trữ thành cholesterol tự do để tham gia vào các quá trình sinh học khác như tạo màng tế bào, tổng hợp hormon steroid và muối mật. Khi enzym cholesterol esterase bị ức chế, cholesterol ester không thể chuyển thành cholesterol dạng tự do, dẫn đến giảm khả năng hấp thu cholesterol, giảm nồng độ cholesterol máu, đặc biệt là LDL-cholesterol.

Trong các nghiên cứu *in vitro* về tác dụng ức chế enzym cholesterol esterase, có thể sử dụng cơ chất tự nhiên cholesterol ester [86] hoặc cơ chất tổng hợp p-nitrophenyl butyrate (pNPB) [87], [88], [89]. Những cơ chất này đóng vai trò quan trọng trong việc xác định khả năng ức chế của các hợp chất khác nhau đối với enzym này.

Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế enzym cholesterol esterase sử dụng cơ chất pNPB được tác giả Pietsch và Gutschow mô tả đầu tiên từ năm 2002 [87]. Cho tới nay, có rất nhiều tác giả khác đã áp dụng phương pháp này hoặc cải tiến cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm trong các nghiên cứu đánh giá tác dụng ức chế enzym cholesterol esterase [88], [89], [90], [91]... Cơ chất pNPB là một cơ chất tổng hợp, dễ dàng thủy phân bởi enzym cholesterol esterase, tạo ra p-nitrophenol, một sản phẩm có khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 405nm. Nồng độ cơ chất pNPB có thể được sử dụng là 200 μ M [87], [92]; 0,05 M [90]; 1 mg/ml hoặc 5mM [93]. Nhiệt độ và thời gian ủ thay đổi tùy theo nồng độ cơ chất, từ 25 °C đến 37 °C. Dung dịch natri phosphat 100mM, pH 7,0 được lựa chọn là dung dịch đệm phản ứng. Các thử nghiệm có thể không sử dụng chất đối chứng [87], [94], [93] hoặc sử dụng NaF [90], simvastatin [92], [95] hay orlistat [91], [95] làm các chứng dương.

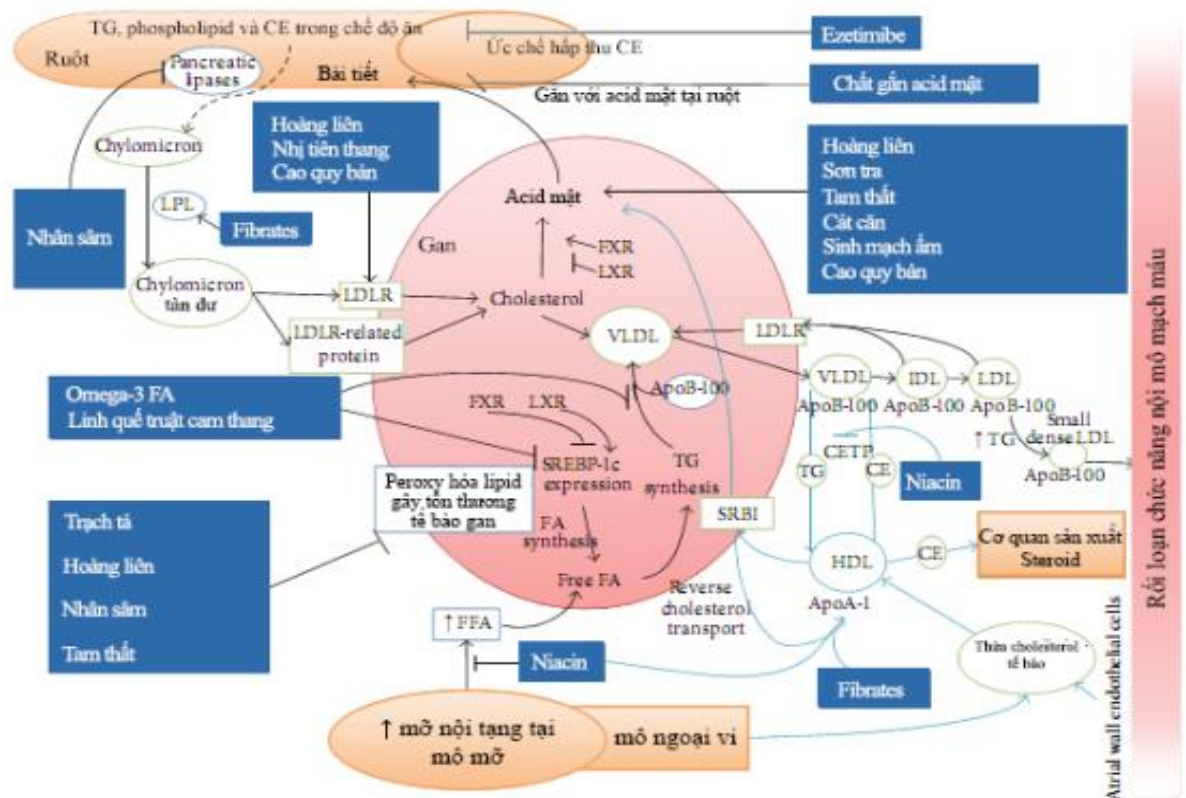
Bảng 1. 5. Một số nghiên cứu đánh giá tác dụng ức chế enzym cholesterol esterase

<i>Tác giả</i>	<i>Nồng độ pNPB</i>	<i>Nồng độ enzym</i>	<i>Dung dịch đệm</i>	<i>Điều kiện ủ</i>		<i>Chất đối chứng</i>
				<i>trước khi cho enzym</i>	<i>sau khi cho enzym</i>	
Pietsch và Gutschow [87]	200 μ M	19,5 ng/ml	100mM natri phosphat, 100 mM NaCl, pH 7,0	25°C 2 phút	- 1 phút	-
Brimo và cộng sự [90]	0,05 M	5 μ g/ml	Natri phosphat, 100 mM, pH 7,0	25°C 5 phút	25°C 15 phút	NaF
Glory và cộng sự [92]	200 μ M	19,5 ng/ml	Natri phosphat 100mM, pH 7,0	25°C 2 phút	- -	Simvastatin
Zhang và cộng sự [94]	1 mg/ml	0,163 U/ml	Natri phosphat 0,1M, pH 7,0	37°C 10 phút	37°C 20 phút	-
Waquas và cộng sự [93]	5 mM	5 μ g/ml	100mM natri phosphat, 100 mM NaCl, pH 7,0	-	37°C 30 phút	Orlistat
Sultan P. và cộng sự [95]	5 mM	-	Dung dịch đệm phosphat	t° phòng 5 phút	t° phòng 15 phút	Simvastatin
Djamila Z. và cộng sự [91]	0,2 M	1 μ g/ml	Natri phosphat 100mM, pH 7,0	-	25°C 5 phút	Orlistat
Jean R.M và cộng sự [96]	-	0,2 M	-	25°C 10 phút	25°C 5 phút	Orlistat

Ghi chú: (-) : không thấy nhắc đến trong nghiên cứu

1.3. Một số dược liệu có tác dụng chống béo phì và hạ lipid máu

Trong những thập niên gần đây, các dược liệu có tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu được nghiên cứu khá phổ biến. Dựa trên các nguồn cơ sở dữ liệu khoa học trên Science direct, Medicine/Pubmed và Google Scholar, một nghiên cứu hệ thống năm 2021 đã tổng hợp được trên toàn thế giới có 451 loài thực vật thuộc 329 chi và 110 họ có tác dụng chống béo phì. Các họ thực vật chính được sử dụng là Conpositae (34 chi và 43 loài) và Leguminosae (26 chi và 43 loài) [97]. Phân tích bộ phận dùng của các dược liệu trên cho thấy lá (24%) và quả (18%) là hai bộ phận được sử dụng nhiều nhất, phương pháp chế biến dạng thuốc sắc (42%) là phương pháp chủ yếu [97], [98].



Hình 1. 4. Sơ đồ cơ chế điều trị lipid máu của một số dược liệu

* Nguồn: Theo Sham T. và cộng sự (2014) [99]

Dược liệu có tác dụng hạ lipid máu cũng được nghiên cứu với nhiều dạng bào chế khác nhau, sử dụng dưới dạng độc vị hoặc phối hợp trong các bài thuốc. Hầu hết các nghiên cứu đều tập trung vào mục tiêu điều chỉnh nồng độ các

thành phần lipid trong máu như cholesterol toàn phần, triglycerid, LDL-C và HDL-C. Sham và cộng sự đã tổng hợp và hệ thống được cơ chế tác dụng hạ lipid máu của một số dược liệu trong y học cổ truyền như làm giảm sự peroxid hóa lipid (trạch tả, hoàng liên, nhân sâm, tam thất), hoạt hóa PPAR α (sơn tra, hoàng liên), ức chế HMG-CoA reductase (đại hoàng, men gạo đỏ), tăng LDLR (hoàng liên), ức chế lipase tụy (nhân sâm)... [99].

Bảng 1. 6. Một số dược liệu có tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu

Dược liệu [nguồn]	Tên khoa học	Tác dụng
Lô hội [100]	<i>Aloe barbadensis</i>	Gel <i>Aloe barbadensis</i> điều trị RLLPM cũng như stress oxy hóa ở chuột béo phì
Cần tây [101]	<i>Apium Graveolens</i>	Hoạt chất 3-N-butylphthalide có tác dụng chống béo phì do chế độ ăn HFD ở chuột C57BL/6
Sài hồ [102]	<i>Bupleuri Radix</i>	Chiết xuất <i>Bupleuri Radix</i> cải thiện RLLPM ở chuột béo phì gây bởi chế độ ăn HFD
Nấm ngọc cầu [103]	<i>Cynomorium songaricum</i>	Chiết xuất HCY2 giàu triterpenoid có tác dụng chống béo phì qua điều chỉnh con đường AMPK/PGC1
Chùm ngây [104]	<i>Moringa peregrine</i>	Chiết xuất vỏ và lá có tác dụng chống béo phì qua việc giảm hấp thu lipid
Dâu tằm trắng [105]	<i>Morus alba</i> L.	Ức chế các enzym tiêu hóa và sự biệt hóa tế bào mỡ; tăng tiêu hao năng lượng và chuyển hóa lipid.

<i>Được liệu [nguồn]</i>	<i>Tên khoa học</i>	<i>Tác dụng</i>
Dây thần thông [106]	<i>Tinospora cordifolia</i>	Giảm các rối loạn liên quan đến béo phì như tăng cân, rối loạn chức năng gan, thận và tăng stress oxy hóa
Giảo cổ lam [107], [108], [109]	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Giảm TC, TG, LDL-C. Làm tăng hoạt hóa AMPK và ức chế quá trình tạo mỡ
Đại hoàng [110]	<i>Rhizoma rhei</i>	Giảm TC, TG, LDL-C, điều chỉnh mức TC, TG, TNF- α và IL-1 β thông qua các con đường truyền tín hiệu như C/EBP α , 3T3-L1, PPAR α và AMPK, cải thiện tình trạng tăng lipid máu.
Trần bì [111]	<i>Pericarpium ritivulatae</i>	Giảm TG, TC, LDL-C, ức chế tổng hợp và hấp thu cholesterol.
Bán hạ [112]	<i>Rhizoma pinelliae</i>	Giảm TG, TC, giảm tổng hợp cholesterol máu, ức chế hấp thu cholesterol từ ruột
Bạch truật [113], [114]	<i>Atractylodes macrocephala</i>	Giảm TG, TC, LDL-C. Cải thiện quá trình peroxy hóa lipid ở gan và tăng cường hoạt động enzym chống oxy hóa.
Quế nhục [111]	<i>Cinamomum cassia</i>	Giảm TC, TG, LDL-C, tăng HDL-C. Ức chế HMG-CoA reductase.
Lá ổi [70]	<i>Psidium Guajava L</i>	Giảm TG, TC trong mô hình RLLPM ngoại sinh, giảm TG, TC, LDL-C trong mô hình RLLPM nội sinh

1.4. Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh và cao khô lá Trà hoa vàng

1.4.1. Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh

Theo hệ thống phân loại thực vật, vị trí phân loại của chi *Camellia* L. có thể được tóm tắt như sau:

Giới: Thực vật (*Plantae*)

Ngành: Ngọc lan (*Magnoliopsida*)

Lớp: Ngọc lan (*Magnoliopsida*)

Phân lớp: Sô (*Dilleniidae*)

Bộ: Trà (*Theaceae*)

Họ: Trà (*Theaceae*)

Chi: Trà (*Camellia*)

Chi *Camellia* L. có khoảng hơn 280 loài, phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới, có nguồn gốc ở khu vực miền đông và miền nam châu Á, từ phía đông dãy Himalaya tới Nhật Bản và Indonesia [11]. Trần Đức Mạnh và cộng sự đã thống kê được 52 loài Trà hoa vàng ở miền nam Trung Quốc và Việt Nam [115]. Trà hoa vàng thường phân bố trong rừng lá rộng, có độ che phủ từ 30-80%. Các loài đều ưa phát triển trong đất có độ ẩm cao. Do vậy, chúng thường được tìm thấy ở các thung lũng, gần suối và các vùng nước tự nhiên [11], [116], [117].

Camellia hakodae Ninh còn gọi là Trà hoa vàng Hakoda, do Hakoda và Trần Ninh tìm thấy ở sườn núi Đông Bắc vùng núi Tam Đảo vào năm 2007. Trà hoa vàng Hakoda được coi là loài cây đặc hữu của Vườn Quốc gia Tam Đảo, Việt Nam [11], [12], [13].



Hình 1. 5. Cây, lá và hoa Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh

* Nguồn: Ảnh chụp thực nghiệm tại Vườn Quốc gia Tam Đảo, Vĩnh Phúc, năm 2021

Thành phần hóa học

Trà hoa vàng chứa các nhóm chất chính tương tự như trà xanh, bao gồm các hợp chất phenolic, flavonoid, saponin, polysaccarid, acid amin và tinh dầu. Polyphenol là hợp chất quan trọng nhất có trong các loài Trà hoa vàng. Các hợp chất polyphenol của lá Trà hoa vàng đa số là các catechin [7], [8], [9]. Hàm lượng polyphenol tổng trong các mẫu lá của 16 loài Trà hoa vàng mọc tự nhiên ở Việt Nam dao động từ 52,2 đến 301,1 mgGAE/g [7]. Phân tích hàm lượng polyphenol trong hoa của 22 loài Trà hoa vàng, Jiang và cộng sự nhận thấy

trong số 9 thành phần polyphenol đo được, hàm lượng của epicatechin (EC) là cao nhất, chiếm hơn 50% tổng hàm lượng polyphenol [118]. Ngoài ra, trong Trà hoa vàng, còn có các flavonol như myricitin, kaempferol, quercetin, và các glycosid như myricetin-3-glucosid, kaempferol-3-glucosid, quercetin-3-hamnoglucosid... [8], [9], [119].

Nghiên cứu thành phần hóa học của hoa Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh, Nguyễn Thanh Tuyền và cộng sự đã phân lập được 9 loại flavonoid, bao gồm quercetin, quercetin-3-O-6-D-glucopyranosid, quercetin-7-O-6-D-taxifolin, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallat, kaempferol, naringenin, glucopyranosid [120]. Năm 2022, tác giả phát hiện thêm một hợp chất flavonoid mới có trong hoa *Camellia hakodae* Ninh là dẫn xuất sexangularetin 3-O-(2"-O-(E)-p-coumaroyl-β-d-glucopyranosid [121].

Nghiên cứu trên lá của Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh nhận thấy có 7 loại flavonoid, trong đó có 01 loại glycosid flavon mới là camehakonin và 6 loại flavonoid đã biết là isoxanthohumol, naringenin, (+) taxifolin, (-) epicatechin, macarangenin và 5,7,3',4'-tetrahydroxy-6-geranylflavonol [122]. Ngoài flavonoid, gần đây, Nguyễn Thanh Tuyền cũng đã phân lập được 9 dẫn xuất triterpen pentacyclic gồm acid 3-O-cis-p-coumaroyl trichadenic B và 2 dẫn xuất triterpen loại ursan mới từ lá của *Camellia hakodae* Ninh [123].

Tác dụng và độc tính

Theo Y học cổ truyền, Trà hoa vàng có tính bình, vị ngọt và có mùi thơm, quy vào 3 kinh là Tâm, Thận và Can. Thành phần hóa học có hoạt tính chính trong Trà hoa vàng là polyphenol. Polyphenol là chất chống oxy hóa có tác dụng khử các gốc tự do trong cơ thể. Nghiên cứu của Song và cộng sự trên 6 mẫu lá Trà hoa vàng cho thấy các thành phần catechin có phản ứng rõ với DPPH trên hình ảnh sắc ký đồ, thể hiện tác dụng chống oxy hóa thông qua khả năng trung hòa gốc tự do [124].

Ngoài ra, polyphenol trong Trà hoa vàng cũng được chứng minh có tác dụng chống ung thư, kìm hãm sự hình thành, phát triển và di căn của khối u. Theo Trần Ninh và cộng sự, Trà hoa vàng có khả năng kìm chế 33,8% sự sinh trưởng của các khối u [11]. Một số nghiên cứu đã chứng minh các dòng tế bào ung thư như tế bào ung thư phổi (A549 và NCI-H1975), tế bào ung thư dạ dày (HGC-27), tế bào ung thư đại tràng (SW620), tế bào ung thư vú MDA-MB-231... bị ức chế bởi các sản phẩm từ Trà hoa vàng [8], [125].

Tác dụng kháng khuẩn và chống viêm của Trà hoa vàng cũng được chứng minh trong nhiều thử nghiệm *in vitro*. Chiết xuất ethanol hoa của *Camellia nitidissima* được chứng minh có tác dụng kháng khuẩn đối với chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* (với nồng độ ức chế tối thiểu MIC = 2,5 mg/ml) [126]. Chiết xuất ethanol của lá có tác dụng trên hai chủng vi khuẩn Gram dương là *Staphylococcus aureus* (MIC = 0,625 mg/ml) và *Bacillus subtilis* (MIC = 1,25 mg/ml) [9]. Tác dụng chống viêm của Trà hoa vàng được thể hiện bằng cách ức chế sản xuất NO, làm giảm biểu hiện của gen iNOS và làm giảm biểu hiện của các cytokin gây viêm [127].

Trên chuyển hóa, Trà hoa vàng cũng được chứng minh có tác dụng hạ đường huyết trên động vật thực nghiệm [128], [129]. Cao chiết hoa Trà hoa vàng *Camellia flava* liều 1,09 hoặc 2,19 g/kg/24h làm hạ đường huyết rõ rệt trên chuột gây tăng đường huyết bởi alloxan sau 10 ngày sử dụng [128]. Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh khi kết hợp với các dược liệu khác như giáo cỏ lam, dây thìa canh lá to và xạ đen (tỷ lệ 1: 3: 3: 3) cũng được chứng minh có tác dụng hạ glucose máu với liều 24 g/kg/24h và 48 g/kg/24h trên chuột gây đái tháo đường typ 2 [129].

Nhóm catechin được biết đến là nhóm chất chính có tác dụng giảm cân và hạ lipid máu của Trà hoa vàng. Nghiên cứu của Chen và cộng sự cho thấy sử dụng liều cao catechin chiết xuất từ Trà hoa vàng trên phụ nữ béo bụng sau 2 tuần điều trị cho thấy hiệu quả giảm cân đáng kể, giảm chu vi vòng eo, nồng

độ cholesterol và LDL cholesterol [10]. Chiết xuất nước và chiết xuất ethanol của hoa Trà hoa vàng *Camellia euphlebia* có tác dụng giảm cân, giảm cholesterol toàn phần, triglycerid và LDL-C, đồng thời làm tăng mức HDL-C ở chuột nhắt sử dụng chế độ ăn nhiều chất béo [130]. Chiết xuất ethanol của hoa *Camellia nitidissima* đã được chứng minh có tác dụng chống béo phì và các biến chứng liên quan bằng cách làm giảm đáng kể trọng lượng cơ thể, giảm lượng thức ăn nạp vào, giảm chỉ số Lee, chỉ số gan, chỉ số mỡ mào tinh hoàn, chỉ số mỡ sau phúc mạc, giảm lượng cholesterol toàn phần, triglycerid và leptin [131]. Hỗn hợp dịch chiết chứa lá Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh và giáo cỏ lam (tỉ lệ 1:1) cũng được chứng minh có tác dụng giảm cân, giảm các chỉ số lipid máu như cholesterol toàn phần, triglycerid và LDL cholesterol trên chuột nhắt trắng gây béo phì [132]. Kết quả nghiên cứu lâm sàng trên các bệnh nhân rối loạn lipid máu nguyên phát cũng cho thấy dịch chiết lá Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh khi phối hợp với các dược liệu có tác dụng làm giảm nồng độ cholesterol toàn phần, triglycerid và LDL-C, giảm chỉ số BMI có ý nghĩa thống kê [14].

Về độc tính, nhiều nghiên cứu cho thấy các chế phẩm chiết xuất từ lá hoặc hoa từ các loài Trà hoa vàng khác nhau đều khá an toàn. Trong thử nghiệm độc tính cấp, khi sử dụng cao chiết hoa Trà hoa vàng *Camellia flava* trên chuột nhắt trắng chủng Swiss với mức liều tối đa qua kim là 11,75 g/kg thể trọng, không ghi nhận có chuột chết, chuột vẫn hoạt động bình thường, tiêu hoá, bài tiết bình thường, không có bất thường về đại thể các cơ quan gan, thận, lách [128].

Chiết xuất nước từ lá Trà hoa vàng *Camellia euphlebia* không biểu hiện độc tính cấp trên chuột nhắt với giá trị LD₅₀ lớn hơn 5000 mg/kg thể trọng. Trong thử nghiệm độc tính bán trường diễn 14 ngày trên chuột nhắt trắng, chiết xuất lá *Camellia euphlebia* liều 400, 800 và 1600 mg/kg không gây thay đổi đáng kể nào về lượng thức ăn, lượng nước tiêu thụ, trọng lượng cơ thể, hoạt độ AST, ALT, creatinin, số lượng hồng cầu và số lượng bạch cầu. Tuy nhiên, lô

chuột sử dụng liều 1600mg/kg thể trọng có những thay đổi về hành vi như an thần, đầy hơi, rụng lông và thoái hóa nhẹ tế bào gan. Trong thử nghiệm độc tính bán trường diễn 28 ngày trên chuột cống, chiết xuất lá *Camellia euphlebia* liều 600 mg/kg làm tăng đáng kể số lượng hồng cầu so với lô chứng, nhưng không ảnh hưởng tới các thông số bệnh lý khác, cũng không gây ảnh hưởng tới các mô bệnh học gan, lách, thận [133].

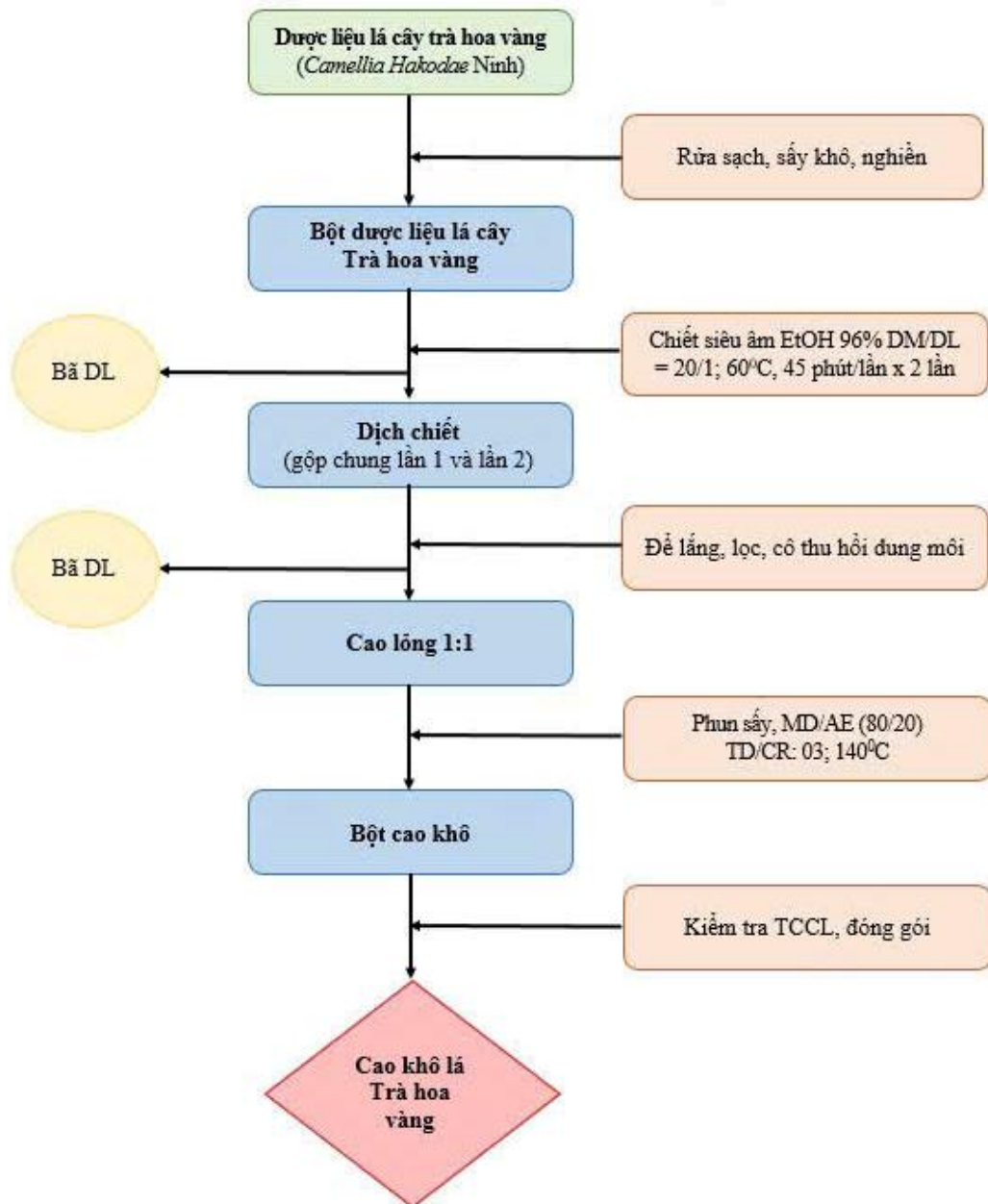
Nghiên cứu độc tính cấp trên dịch chiết lá *Camellia hakodae*, khi cho chuột nhắt trắng sử dụng các mức liều từ 24,0g đến 120,0 g/kg thể trọng, không thấy có chuột chết cũng như bất kì triệu chứng bất thường nào. Trong thử nghiệm độc tính bán trường diễn 28 ngày trên chuột cống, dịch chiết lá *Camellia hakodae* liều 2,8g và 14,0g/kg thể trọng cũng không gây ảnh hưởng đến trọng lượng cơ thể, số lượng hồng cầu, huyết sắc tố, số lượng bạch cầu, tiểu cầu, hoạt độ AST, hoạt độ ALT và nồng độ creatinin. Các mẫu mô bệnh học gan, thận, lách cũng không bị ảnh hưởng, không có hiện tượng tổn thương, hoại tử hoặc thoái hóa tế bào [134].

1.4.2. Cao khô lá Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh

Cao khô lá cây Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh được điều chế tại Học viện Quân y, chiết xuất theo phương pháp chiết siêu âm với dung môi ethanol 96%, sau đó bào chế bột cao khô bằng phương pháp phun sấy.

Lá cây Trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh) được thu hái tại Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc. Sau khi thu hái, rửa sạch lá, sấy khô, cắt nhỏ, nghiền thành bột. Tiến hành chiết siêu âm bột lá cây Trà hoa vàng trong 45 phút ở nhiệt độ 60 °C với dung môi ethanol 96%, tỉ lệ dung môi / dược liệu là 20:1, số lần chiết 2 lần.

Gộp dịch chiết từ 2 lần chiết xuất, lọc qua phễu lọc để thu phần dịch trong. Sau đó, sử dụng thiết bị cô quay chân không, thu hồi dung môi tạo cao lỏng Trà hoa vàng 1:1 (100g:100ml). Tiến hành phun sấy cao lỏng Trà hoa vàng 1:1 bằng máy phun sấy tạo hạt ở nhiệt độ 140 °C, tá dược maltodextrin và aerosil (80:20), thu được bột cao khô lá Trà hoa vàng.



Hình 1. 6. Sơ đồ quy trình điều chế cao khô lá Trà hoa vàng

Sử dụng 5000g dược liệu lá khô Trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh) điều chế được 618,15g cao khô lá Trà hoa vàng.



Hình 1. 7. Lá cây Trà hoa vàng sấy khô và bột cao khô lá Trà hoa vàng

* Nguồn: Ảnh chụp thực nghiệm tại bộ môn Dược lý, Học viện Quân y

Cao khô lá Trà hoa vàng được xây dựng tiêu chuẩn cơ sở với các chỉ tiêu chất lượng bao gồm: tính chất cao, độ ẩm, tro toàn phần, kim loại nặng, định tính và định lượng polyphenol toàn phần có trong cao.

Bảng 1. 7. Một số chỉ tiêu chất lượng của cao khô lá Trà hoa vàng

TT	Chỉ tiêu	Yêu cầu	Phương pháp thử
1	Tính chất	Bột khô toí, màu vàng nâu, mùi thơm nhẹ, vị hơi chát	Cảm quan
2	Mất khối lượng do làm khô	Không quá 5,0%	ĐĐVN V – PL9.6
3	Tro toàn phần	Không quá 5,0%	ĐĐVN V – PL9.8
4	Kim loại nặng	Không quá 20ppm	ĐĐVN V – PL9.4.8
5	Định tính	Có phản ứng với các thuốc thử đặc trưng của polyphenol	Phản ứng hóa học
6	Định lượng	Hàm lượng polyphenol toàn phần ≥ 50 mgGAE/g cao khô	Đo quang (UV-Vis)
7	Độ nhiễm khuẩn	Đạt yêu cầu theo bảng 13.6.6, PL 13.6, ĐĐVN V.	ĐĐVN V – PL13.6

Chế phẩm CKL-THV mới chỉ được điều chế ở quy mô phòng thí nghiệm và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở phục vụ bước đầu cho nghiên cứu. Cho đến nay,

chưa có công bố nào về thành phần hóa học chi tiết cũng như các nghiên cứu dược lý về chế phẩm này. Việc thiếu các dữ liệu khoa học nền tảng như vậy đặt ra yêu cầu cấp thiết cho việc đánh giá tính an toàn và tác dụng sinh học, xác định các nhóm hoạt chất chính có liên quan đến tác dụng, nhằm tạo cơ sở cho việc phát triển chế phẩm theo hướng ứng dụng thực tiễn trong phòng và hỗ trợ điều trị các bệnh lý chuyển hóa như béo phì và rối loạn lipid máu.

Sau khi kiểm tra tiêu chuẩn chất lượng, CKL-THV được đưa vào nghiên cứu tính an toàn và đánh giá tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu trên thực nghiệm. Theo kinh nghiệm dân gian và tham khảo từ các nghiên cứu trước, liều dùng của lá Trà hoa vàng khô trên người là 20g/24h [14], [134]. Dựa vào quy trình điều chế trên, ta tính được liều dùng trên người theo trọng lượng cao khô lá Trà hoa vàng là 2,4726 g/24h. Như vậy, với người 50 kg, liều dùng của CKL-THV là 0,05g/kg/24h. Sử dụng mức liều dự kiến này tiến hành quy đổi liều sang động vật thí nghiệm để đánh giá tác dụng của chế phẩm trên thực nghiệm.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu nghiên cứu

Cao khô lá cây Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh được bào chế tại Học viện Quân y, đạt tiêu chuẩn cơ sở.

2.1.2. Động vật nghiên cứu

Động vật nghiên cứu được cung cấp bởi Ban cung cấp Động vật thí nghiệm, Học viện Quân y. Động vật được nuôi dưỡng ổn định 5-7 ngày ở điều kiện phòng thí nghiệm (nhiệt độ phòng 25 ± 1 °C, độ ẩm $65 \pm 5\%$, chu kỳ sáng tối 12 giờ) để thích nghi trước khi tiến hành nghiên cứu. Thức ăn, nước uống đáp ứng theo điều kiện phòng thí nghiệm. Đặc điểm các động vật nghiên cứu sử dụng trong luận án được trình bày cụ thể trong bảng sau:

Bảng 2. 1. Động vật thí nghiệm sử dụng trong các nghiên cứu

<i>Động vật thí nghiệm</i>	<i>Đặc điểm động vật</i>	<i>Nghiên cứu sử dụng</i>
Chuột nhắt trắng chủng Swiss	Cả 2 giống, khỏe mạnh, trọng lượng $18 \pm 2,0$ g	Đánh giá độc tính cấp
		Đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh
Chuột cống trắng chủng Wistar	Cả 2 giống, khỏe mạnh, trọng lượng 180 ± 20 g	Đánh giá độc tính bán trường diễn
		Đánh giá tác dụng hạ lipid máu ngoại sinh
	Cả 2 giống, khỏe mạnh, trọng lượng 100-120 g (50 con) và 180 ± 20 g (10 con)	Đánh giá tác dụng chống béo phì

2.1.3. Thiết bị nghiên cứu

- Máy xét nghiệm sinh hoá Biochemical Systems International Srl (Italia)
- Máy phân tích huyết học Humancout 30TS (Đức)
- Máy quang phổ tử ngoại khả kiến UV-VIS Hitachi UH5300 (Nhật Bản)
- Máy đo pH Yamato MA500 (Sartorius, Đức)
- Máy lắc siêu âm, model MH-010S (Trung Quốc)
- Máy ly tâm Centrifuge 5430 (Eppendorf, Đức)
- Tủ ấm FOC 120E (VELP, Italia)
- Tủ lạnh âm sâu Haier Biomedical DW-40W138J (Đức)
- Cân phân tích có độ nhạy 0,1 mg; Cân kỹ thuật (Sartorius, Đức)
- Bộ micro pipet Hettlite Pro (Hettich, Đức)
- Bộ kim cong đầu tù cho chuột uống thuốc
- Dụng cụ phòng thí nghiệm: Cốc mở, bình định mức, lọ thủy tinh vial...
- Bộ dụng cụ tiểu phẫu mổ động vật cỡ nhỏ: Kéo, panh, kẹp phẫu tích....

2.1.4. Thuốc, hóa chất

Bảng 2. 2. Các thuốc, hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

TT	Hóa chất	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
1	Triton-X100 (9002-93-1)	Shanghai	Trung Quốc
2	Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O	Merck	Đức
3	pNPB (2635-84-9)	Shanghai	Trung Quốc
4	Acetonitril (75-05-8)	Fisher	Hàn Quốc
5	Poloxamer 407	Sigma	USA
6	Propofol 1% w/v (Nirfol 1%)	Nirma Limited	Ấn Độ
7	Nước siêu tinh khiết (7732-18-5)	Merk	Đức
8	Cholesterol esterase (9026-00-0)	Shanghai	Trung Quốc
9	Atorvastatin 10mg (VD-23970-15) (viên nén bao phim)	STADA	Việt Nam

10	Orlistat 120mg (VD-29357-18) (viên nang)	STADA	Việt Nam
11	Bộ Kit đánh giá tác dụng ức chế enzym HMG-CoA reductase (CS1090) <i>Assay Buffer, 5x (A5981)</i> <i>NADPH (N6505)</i> <i>HMG-CoA (S7447)</i> <i>HMG-CoA reductase (H8789)</i> <i>Pravastatin (I5909)</i>	Sigma	USA

2.2. Phương pháp nghiên cứu

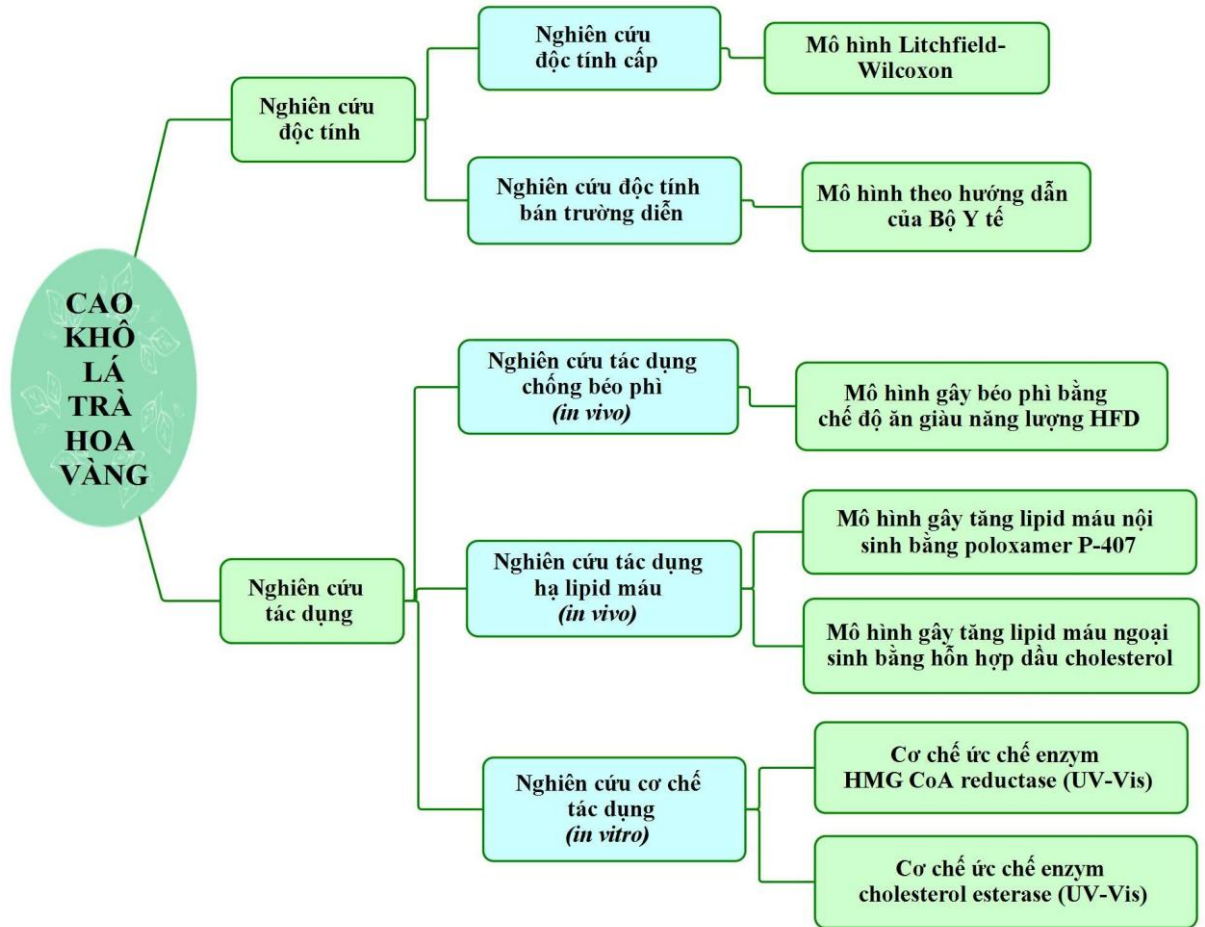
Tính liều dùng của CKL-THV trên động vật thực nghiệm

Theo kinh nghiệm dân gian và tham khảo từ các nghiên cứu trước, liều dùng của lá Trà hoa vàng khô trên người là 20g/24h [14], [134]. Dựa vào quy trình điều chế cao, ta tính được liều dùng trên người theo trọng lượng cao khô lá Trà hoa vàng là 2,4726 g/24h. Như vậy, trên người 50 kg, liều dùng của CKL-THV là 0,05g/kg/24h.

Theo quy ước quy đổi liều dùng từ người sang chuột [135], ta có liều dùng quy đổi sang chuột cống (hệ số 7) là 0,35 g/kg/24h, liều dùng quy đổi sang chuột nhắt (hệ số 12) là 0,60 g/kg/24h.

Các mức liều này được sử dụng trong các nghiên cứu đánh giá độc tính và tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu của CKL-THV trên thực nghiệm.

Các nội dung nghiên cứu trong luận án được tóm tắt ở sơ đồ sau:



Hình 2. 1. Các nội dung nghiên cứu độc tính và tác dụng của CKL-THV

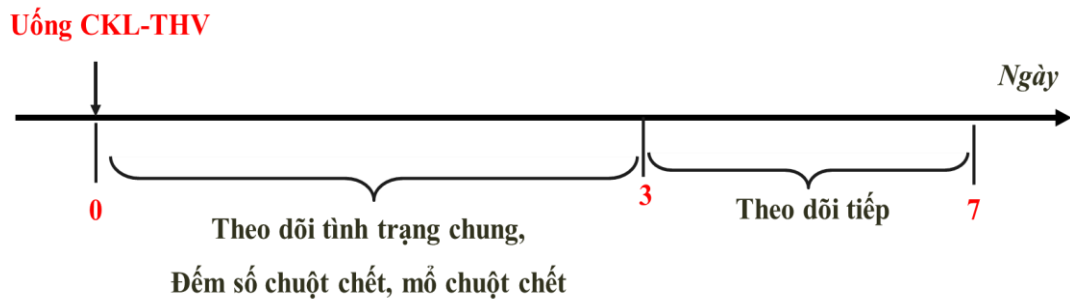
2.2.1. Phương pháp nghiên cứu độc tính cấp

Nghiên cứu độc tính cấp của CKL-THV sử dụng mô hình Litchfield – Wilcoxon được quy định trong hướng dẫn của Bộ Y tế về đánh giá tính an toàn và hiệu lực của thuốc [135].

Nguyên tắc: Cho động vật thí nghiệm sử dụng chế phẩm nghiên cứu với các liều khác nhau từ liều cao nhất không gây chết động vật thí nghiệm đến liều thấp nhất gây chết 100% động vật thí nghiệm. Từ đó xác định LD₅₀ là liều gây chết 50% động vật thí nghiệm của chế phẩm.

Tiến hành: Chuột nhắt trắng được chia thành nhiều lô, mỗi lô 10 con. Trước khi thử nghiệm, chuột được nhịn ăn 12 giờ nhưng vẫn cung cấp nước uống đầy đủ. Sau đó, chuột trong mỗi lô được cho uống CKL-THV với các liều tăng dần. Thể tích mỗi lần cho chuột uống là 0,2ml/10g, 3 lần/ ngày, mỗi lần

cách nhau 3 giờ. Sau đó theo dõi tình trạng chung của chuột và số chuột chết trong 72 giờ. Nếu có chuột chết, mổ chuột để xác định nguyên nhân gây chết. Tiếp tục theo dõi chuột sau 7 ngày uống CKL-THV về hoạt động ăn uống, thần kinh, vận động, bài tiết. Tính liều gây chết 50% động vật thí nghiệm (LD_{50}) theo phương pháp của Litchfield – Wilcoxon.



Hình 2. 2. Sơ đồ nghiên cứu độc tính cấp của CKL-THV

Các chỉ tiêu đánh giá:

- Tình trạng chung của động vật thí nghiệm: vận động, khả năng tiêu thụ thức ăn, nước uống, tình trạng phân, nước tiểu...
- Biểu hiện ngộ độc cấp tính sau khi dùng chế phẩm: Các biểu hiện bất thường trên thân kinh, vận động như hành vi, vận động, đi lại, co giật; biểu hiện của các chức năng hô hấp, tuần hoàn, tiêu hóa như nhịp tim, nhịp thở, nôn mửa, phản xạ của giác quan; tình trạng chất bài tiết của động vật thí nghiệm.
- Số chuột có biểu hiện ngộ độc, thời gian bắt đầu thể hiện triệu chứng ngộ độc, thời gian kéo dài các triệu chứng, khả năng hồi phục.
- Số lượng chuột chết (nếu có). Những động vật ở tình trạng suy kiệt, hấp hối kéo dài, không có khả năng sống sót (không thể ăn uống trong khoảng thời gian theo dõi, được tiên đoán là sẽ chết) thì được tính như trường hợp động vật thí nghiệm bị chết.
- Nếu có chuột chết, mổ chuột để quan sát đại thể. Nếu đại thể có dấu hiệu bất thường, làm tiêu bản vi thể để quan sát rõ hơn.
- Tính LD_{50} theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn nhằm xác định khả năng dung nạp của động vật thí nghiệm khi dùng chế phẩm nghiên cứu nhiều lần. Tiến hành đánh giá độc tính bán trường diễn của CKL-THV trên chuột cống trắng trong 90 ngày, theo hướng dẫn của Bộ Y tế [135] và của OECD [136].

Nguyên tắc: Cho động vật thí nghiệm sử dụng chế phẩm nghiên cứu hàng ngày trong vòng 90 ngày liên tục. Mức liều trong thử nghiệm được tính từ các thông tin thu được của độc tính cấp và được quy đổi tương đương theo liều giữa các loài. Sau đó quan sát tình trạng chung, đánh giá các chỉ tiêu huyết học, sinh hóa và phân tích mô bệnh học, từ đó đưa ra kết luận về độc tính bán trường diễn của chế phẩm.

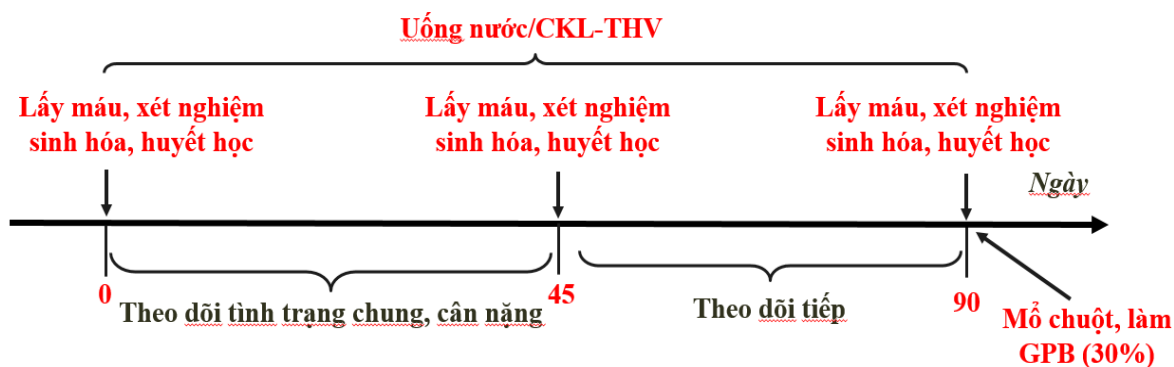
Chuẩn bị chế phẩm: Phân tán đều CKL-THV với nước cất để được các hỗn dịch có nồng độ 35 mg/ml và 105 mg/ml.

Tiến hành: Chuột cống trắng chủng *Wistar* cả 2 giống, được nuôi trong phòng thí nghiệm 7 ngày trước khi nghiên cứu bằng thức ăn tiêu chuẩn, uống nước tự do. Chuột được chia làm 3 lô, mỗi lô 10 con, thức ăn và nước uống được cung cấp theo nhu cầu hàng ngày. Cho chuột uống nước hoặc CKL-THV trong 90 ngày liên tiếp, mỗi ngày một lần vào buổi sáng, cụ thể như sau:

- Lô chứng: uống nước cất hàng ngày với thể tích 0,1ml/10g trọng lượng để được mức liều 10 ml/kg/ngày.

- Lô trị 1: uống CKL-THV 35 mg/ml, thể tích 0,1ml/10g trọng lượng để được mức liều 0,35 g/kg/24h.

- Lô trị 2: uống CKL-THV 105 mg/ml, thể tích 0,1ml/10g trọng lượng để được mức liều 1,05 g/kg/24h.



Hình 2. 3. Sơ đồ nghiên cứu độc tính bán trường diễn của CKL-THV

Các chỉ tiêu đánh giá:

- Tình trạng chung: Vận động, khả năng tiêu thụ thức ăn, nước uống, tình trạng phân, nước tiểu. Quan sát các biểu hiện bất thường của chuột, đặc biệt liên quan tới các chức năng hô hấp, tuần hoàn, tiêu hóa (như nhịp thở, nhịp tim, tình trạng nôn, tiêu chảy....); trên thần kinh, vận động (như hành vi, đi lại, co giật); phản xạ của các giác quan...

- Trọng lượng chuột: Cân chuột trước khi bắt đầu nghiên cứu, hàng tuần và kết thúc thử nghiệm.

- Các chỉ số huyết học và sinh hóa: Lấy máu xoang hốc mắt chuột vào các thời điểm bắt đầu thử nghiệm, sau 45 ngày và sau 90 ngày. Sau khi lấy máu, mẫu máu được mang đi ly tâm lấy huyết tương ở nhiệt độ phòng, 3000 vòng trong 15 phút. Huyết tương được ủ với thuốc thử đặc hiệu sau đó đo quang xác định các chỉ số huyết học và sinh hóa.

+ Đánh giá chức phận tạo máu thông qua các chỉ số huyết học: số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, thể tích trung bình hồng cầu, hàm lượng hemoglobin và hematocrit.

+ Đánh giá khả năng gây độc của chế phẩm (mức độ hủy hoại chức năng gan thận) thông qua định lượng một số enzym và chất chuyển hoá trong máu: hoạt độ ALT, AST; nồng độ cholesterol toàn phần, triglycerid và creatinin huyết thanh.

- Phân tích mô bệnh học: Sau 90 ngày nghiên cứu, mổ ngẫu nhiên 30% số chuột ở mỗi lô để quan sát đại thể các cơ quan nội tạng. Quan sát, đánh giá đại thể các cơ quan gan, lách, thận về màu sắc, hình dạng, kích thước. Sau đó tiến hành làm tiêu bản nhuộm HE, đánh giá cấu trúc vi thể gan, lách, thận của các chuột ở mỗi lô. Nếu có chuột chết trong quá trình nghiên cứu, tiến hành mổ chuột ngay và đánh giá cấu trúc đại thể, vi thể các chuột.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu tác dụng chống béo phì in vivo

Gây động vật béo phì bằng chế độ ăn giàu chất béo HFD và đánh giá tác dụng chống béo phì của chế phẩm theo phương pháp được mô tả bởi Whycliffe và cộng sự [137].

Nguyên tắc: Chế độ ăn giàu chất béo làm tăng năng lượng vào cơ thể, gây mất cân bằng chế độ ăn uống, từ đó gây ra tình trạng béo phì. Chuột thí nghiệm được cho ăn chế độ ăn nhiều chất béo HFD trong 12 tuần để gây tình trạng béo phì. Sau đó các chuột béo phì được đưa vào thử nghiệm chính thức, cho sử dụng chế phẩm nghiên cứu trong 8 tuần và đánh giá tác dụng chống béo phì của chế phẩm dựa trên các chỉ tiêu nghiên cứu.

Chuẩn bị thức ăn HFD:

Thức ăn HFD giàu chất béo được xây dựng sao cho tổng lượng chất béo chiếm khoảng 45-60%. Các thành phần trong chế độ ăn HFD được trộn đều, đập viên thành miếng nhỏ rồi nướng chín. Bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh.

Bảng 2. 3. Thành phần dinh dưỡng trong chế độ ăn HFD giàu chất béo

Thành phần	Chế độ ăn HFD (g)
Tinh bột	400
Mỡ lợn	200
Cá	300
Bơ	30
Sữa bột nguyên kem	20
Sữa đặc	20

Lạc	5
Cholesterol	10
Cystein	5
Vitamin và khoáng chất	10
Tổng	1000

Theo nguyên tắc quy đổi giá trị năng lượng từ các thành phần trong thực phẩm của Viện dinh dưỡng quốc gia, giá trị năng lượng của thực phẩm được tính theo hệ số 1 g protein cho 4 Kcal, 1 g lipid cho 9 Kcal, 1 g glucid cho 4 Kcal [138]. Như vậy, ta có bảng quy đổi giá trị năng lượng tương đối của các nhóm chất dinh dưỡng trong chế độ ăn HFD cụ thể như sau:

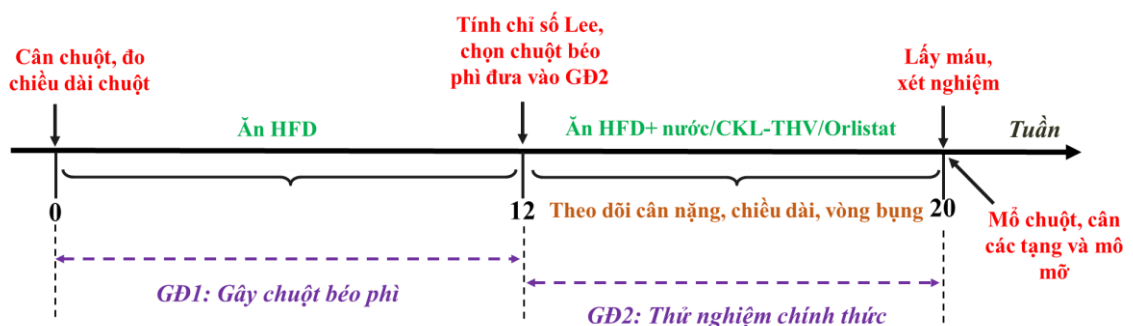
Bảng 2. 4. Giá trị năng lượng tương đối của chế độ ăn HFD

<i>Thành phần</i>	<i>Giá trị năng lượng (Kcal)</i>	<i>Tỉ lệ %</i>
Protein	641,0	14,26
Carbohydrat	1693,4	37,67
Chất béo	2161,4	48,08
Tổng	4495,8	100

Chuẩn bị chế phẩm: Phân tán đều CKL-THV với nước cất để được các hỗn dịch có nồng độ 35 mg/ml và 105 mg/ml.

Chuẩn bị thuốc đối chứng: Orlistat được nghiền nhỏ và pha với nước cất để được hỗn dịch có nồng độ 5 mg/ml.

Tiến hành: Nghiên cứu được tiến hành qua 2 giai đoạn: Gây mô hình chuột béo phì và thử nghiệm chính thức.



Hình 2. 4. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng chống béo phì của CKL-THV

Giai đoạn 1: Gây mô hình chuột béo phì: Chuột cống trắng chủng *Wistar*, giống đực, cân nặng 100-125g được cho ăn chế độ ăn HFD trong 12 tuần. Sau đó, tính chỉ số béo phì Lee ở chuột (chỉ số tương đương với chỉ số BMI ở người) theo công thức: **Chỉ số béo phì Lee** = $\frac{\sqrt[3]{W}}{L}$

Trong đó: W là cân nặng chuột (gam); L là chiều dài cơ thể chuột tính từ mũi đến hậu môn (cm)

Các chuột có giá trị chỉ số Lee từ 0,310 trở lên được coi là béo phì [139]. Chọn 40 chuột béo phì đưa vào giai đoạn 2 của nghiên cứu.

Giai đoạn 2: Thử nghiệm chính thức:

40 chuột cống béo phì ở giai đoạn 1 và 10 chuột cống trắng đực chủng *Wistar* bình thường khác (180 - 200g) được đưa vào nghiên cứu giai đoạn 2.

Các chuột được chia làm 5 lô, mỗi lô 10 con và thực hiện chế độ ăn uống hàng ngày như sau trong 8 tuần:

- Lô chứng sinh lý (1): chuột bình thường, ăn chế độ ăn thường. Hàng ngày chuột được cho uống nước cất liều 10ml/kg.

- Lô mô hình (2): chuột béo phì, tiếp tục ăn chế độ ăn HFD. Hàng ngày chuột được cho uống nước cất liều 10ml/kg.

- Lô tham chiếu (3): chuột béo phì, tiếp tục ăn chế độ ăn HFD. Hàng ngày chuột được cho uống dung dịch orlistat 5 mg/ml, thể tích mỗi lần cho uống là 0,1ml/10g trọng lượng để được mức liều 0,05 g/kg/24h.

- Lô trị 1 (4): chuột béo phì, tiếp tục ăn chế độ ăn HFD. Hàng ngày chuột được cho uống CKL-THV 35 mg/ml, thể tích uống 0,1ml/10g để được mức liều 0,35 g/kg/24h.

- Lô trị 2 (5): chuột béo phì, tiếp tục ăn chế độ ăn HFD. Hàng ngày chuột được cho uống CKL-THV nồng độ 105 mg/ml, thể tích uống 0,1ml/10g để được mức liều 1,05 g/kg/24h.

Các chỉ tiêu nghiên cứu: (xác định vào buổi sáng, trước khi cho ăn)

- Cân nặng chuột: Cân nặng chuột được xác định và theo dõi hàng tuần từ lúc bắt đầu giai đoạn thử nghiệm chính thức. Tính phần trăm thay đổi trọng lượng chuột ở các lô theo thời gian bằng công thức sau:

$$\% \text{ thay đổi trọng lượng} = \frac{(TL_i - TL_0)}{TL_0} \times 100 (\%)$$

Trong đó: TL_i là trọng lượng chuột tại thời điểm i ($i = 1-8$)

TL_0 là trọng lượng chuột tại thời điểm t_0

- Chiều dài cơ thể chuột: Chuột được gây mê nhẹ bằng 1,5 ml dung dịch propofol 1% w/v, tiêm phúc mạc. Đo chiều dài cơ thể chuột tính từ mũi đến hậu môn bằng thước dây có độ chính xác 0,1cm.

- Chu vi vòng bụng: Sau khi đo chiều dài chuột, tiếp tục giữ chuột ở tư thế nằm sấp, dùng thước dây đo chu vi vòng bụng chuột. Chiều dài cơ thể và chu vi vòng bụng chuột được đo tại các thời điểm: bắt đầu giai đoạn 2 của thử nghiệm (t_0), sau 2 tuần (t_2), 4 tuần (t_4), 6 tuần (t_6) và 8 tuần (t_8) nghiên cứu.

Tính phần trăm thay đổi chu vi vòng bụng chuột ở các lô theo thời gian bằng công thức sau: $\% \text{ thay đổi vòng bụng} = \frac{(VB_i - VB_0)}{VB_0} \times 100 (\%)$

Trong đó: VB_i là vòng bụng chuột tại thời điểm i ($i = 2, 4, 6, 8$)

VB_0 là vòng bụng chuột tại thời điểm t_0

- Chỉ số béo phì Lee: Tính chỉ số Lee của chuột từ cân nặng và chiều dài chuột theo công thức của Lee. Sau đó tính phần trăm thay đổi chỉ số Lee của chuột ở các lô theo thời gian bằng công thức sau:

$$\% \text{ thay đổi chỉ số Lee} = \frac{(Lee_i - Lee_0)}{Lee_0} \times 100 (\%)$$

Trong đó: Lee_i là chỉ số Lee của chuột tại thời điểm i ($i = 2, 4, 6, 8$)

Lee_0 là chỉ số Lee của chuột tại thời điểm t_0

- Các chỉ số lipid máu: Ngày cuối cùng của thử nghiệm chính thức, lấy máu xoang hốc mắt chuột, xác định các chỉ số lipid máu: cholesterol toàn phần,

triglycerid và HDL. Tính chỉ số LDL và non HDL theo công thức Friedewald [140]: $\text{LDL} = \text{TC} - \text{HDL} - \frac{\text{TG}}{2,2}$; $\text{Non HDL} = \text{TC} - \text{HDL}$

- Trọng lượng các tạng: Sau khi lấy máu, mổ chuột, tiến hành phẫu tích lấy các tạng gan, lách, thận, tim. Rửa sạch bằng nước muối lạnh 0,9%, thấm khô bằng khăn giấy, sau đó đem cân trên cân phân tích để xác định trọng lượng. Tính trọng lượng tương đối các tạng theo công thức:

$$\text{Trọng lượng tương đối các tạng} = \frac{\text{Trọng lượng tạng}}{\text{Trọng lượng chuột}} \times 100 (\%)$$

- Trọng lượng mỡ: Dùng kéo bóc tách các mô mỡ trong ổ bụng chuột, quanh các nội quan, rửa sạch bằng nước muối lạnh 0,9%, thấm khô bằng khăn giấy, sau đó đem cân trên cân phân tích để xác định trọng lượng. Tính chỉ số mỡ cơ thể chuột theo công thức: $\text{Chỉ số mỡ cơ thể} = \frac{\text{Trọng lượng mỡ}}{\text{Trọng lượng chuột}} \times 100 (\%)$

2.2.4. Phương pháp nghiên cứu tác dụng hạ lipid máu in vivo

2.2.4.1. Đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh

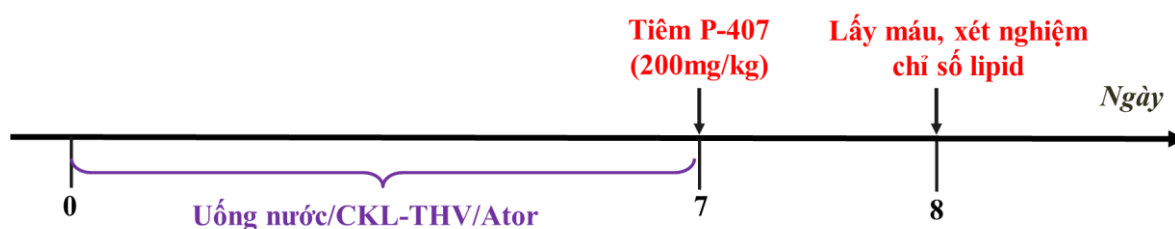
Đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh trên chuột nhắt chủng Swiss theo phương pháp của Millar và cộng sự [71], sử dụng P-407 để gây mô hình tăng lipid máu.

Nguyên tắc: Chuột được gây rối loạn lipid máu theo cơ chế nội sinh bằng P-407. Đây là một chất diện hoạt, có khả năng ức chế enzym lipoprotein lipase (LPL), dẫn đến tích tụ triglycerid và cholesterol trong máu. Chuột được sử dụng chế phẩm nghiên cứu 7 ngày, sau đó tiêm P407 rồi thu thập mẫu máu và phân tích các chỉ số lipid để so sánh giữa các nhóm điều trị và nhóm đối chứng, từ đó đánh giá hiệu quả của chế phẩm nghiên cứu.

Chuẩn bị chế phẩm: Phân tán đều CKL-THV với nước cất để được các hỗn dịch có nồng độ 60 mg/ml và 180 mg/ml.

Chuẩn bị thuốc đối chứng: Atorvastatin được nghiền nhỏ và pha với nước cất để được hỗn dịch có nồng độ 10 mg/ml.

Chuẩn bị dung dịch P407 2%: Pha 0,4g P407 vừa đủ với 20ml NaCl 0,9%, để tủ lạnh qua đêm để làm tăng độ tan của P407.



Hình 2. 5. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng hạ lipid máu nội sinh

Tiến hành:

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, nuôi ổn định, chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con. Thức ăn và nước uống được cung cấp theo nhu cầu hàng ngày. Cho chuột trong các lô uống nước hoặc CKL-THV trong 6 ngày, mỗi ngày một lần vào buổi sáng, cụ thể như sau :

- Lô chứng (1): uống nước cất hàng ngày với thể tích 0,1ml/10g trọng lượng để được mức liều 10 ml/kg/ngày. Ngày thứ 7, tiêm màng bụng nước muối sinh lý liều 10 ml/kg.

- Lô mô hình (2): uống nước cất hàng ngày với thể tích 0,1ml/10g trọng lượng để được mức liều 10 ml/kg/ngày. Ngày thứ 7 tiêm màng bụng chuột dung dịch P- 407 2% với liều 200 mg/kg.

- Lô tham chiếu (Ator) (3): uống dung dịch atorvastatin 10 mg/ml hàng ngày, thể tích uống 0,1 ml/10g trọng lượng để được mức liều 100 mg/kg. Ngày thứ 7 tiêm màng bụng chuột dung dịch P- 407 2% với liều 200 mg/kg.

- Lô CKL-THV 0,6 (4): uống CKL-THV 60 mg/ml hàng ngày, thể tích uống 0,1ml/10g trọng lượng để được mức liều 0,6g/kg/24h. Ngày thứ 7 tiêm màng bụng chuột dung dịch P- 407 2% với liều 200 mg/kg.

- Lô CKL-THV 1,8 (5): uống CKL-THV nồng độ 180 mg/ml hàng ngày, thể tích mỗi lần cho uống là 0,1ml/10g trọng lượng để được mức liều 1,8

g/kg/24h hàng ngày. Ngày thứ 7 tiêm màng bụng chuột dung dịch P- 407 2% với liều 200 mg/kg.

Chỉ tiêu nghiên cứu: Sau khi tiêm P-407 hoặc nước muối sinh lý 24 giờ, lấy máu xoang hốc mắt chuột, xác định các chỉ số lipid máu: cholesterol toàn phần, triglycerid và HDL. Chỉ số LDL và non HDL được tính theo công thức Friedewald [140].

2.2.4.2. Đánh giá tác dụng hạ lipid máu ngoại sinh

Nghiên cứu sử dụng mô hình gây tăng lipid máu ngoại sinh do chế độ ăn của Nassiri [74], được cải tiến bởi Nguyễn Trọng Thông và cộng sự [75].

Nguyên tắc: Động vật thí nghiệm được gây tăng lipid máu bằng cách bổ sung cholesterol hoặc acid béo bão hòa và triglycerid vào chế độ ăn uống để mô phỏng tình trạng rối loạn lipid máu ngoại sinh, tương tự như ở người. Chế độ ăn có bổ sung cholesterol làm tăng lượng cholesterol trên màng lưới nội chất tế bào gan, giảm LDL receptor nên làm tăng LDL cholesterol trong huyết tương. Sự có mặt của acid cholic làm tăng hấp thu cholesterol và nồng độ cholesterol huyết thanh tăng mạnh hơn khi sử dụng thêm các thuốc kháng giáp trạng. Thuốc hoặc chế phẩm nghiên cứu được đưa vào chế độ ăn uống hàng ngày để đánh giá hiệu quả điều trị rối loạn lipid máu. Thu thập và phân tích mẫu máu của chuột tại các thời điểm trước, trong và sau khi kết thúc nghiên cứu. So sánh các chỉ số lipid máu giữa các nhóm điều trị và nhóm đối chứng, từ đó xác định hiệu quả của chế phẩm nghiên cứu.

Chuẩn bị chế phẩm: Phân tán đều CKL-THV với nước cất để được các hỗn dịch có nồng độ 35 mg/ml và 105 mg/ml.

Chuẩn bị thuốc đối chứng: Atorvastatin được nghiền nhỏ và pha với nước cất để được hỗn dịch có nồng độ 1mg/ml.

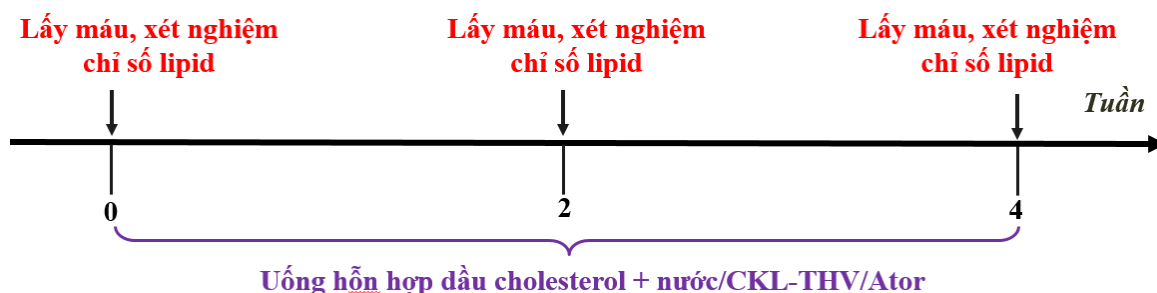
Chuẩn bị hỗn hợp dầu cholesterol: Đun nóng cách thủy 200mg dầu lạc, cho 50g cholesterol vào, khuấy đều cho tan hết, để nguội. Thêm 5g acid cholic và 2,5g propylthiouracil (PTU) vào hỗn dịch trên, khuấy đều. Cuối cùng, cho

thêm dầu lạc vừa đủ 500ml. Như vậy, trong 1ml hỗn hợp dầu cholesterol chứa 0,1g cholesterol; 0,01g acid cholic; 0,005g PTU.

Bảng 2. 5. Công thức thành phần hỗn hợp dầu cholesterol

Thành phần	Hàm lượng (g)
Cholesterol	50
Acid cholic	5
Propyl thiouracil (PTU)	2,5
Dầu lạc	vừa đủ 500ml

Tiến hành:



Hình 2. 6. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng hạ lipid máu ngoại sinh

Chuột cống trắng, 50 con, nuôi ổn định 1 tuần, chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con. Thức ăn và nước uống được cung cấp theo nhu cầu hàng ngày. Cho chuột trong các lô uống nước, hỗn hợp dầu cholesterol và chế phẩm nghiên cứu CKL-THV trong 4 tuần, mỗi ngày một lần vào buổi sáng, thể tích mỗi lần cho uống là 0,1ml/10g. Cụ thể như sau:

- Lô chứng (1): uống nước cất hàng ngày với liều 10 ml/kg/ngày.
- Lô mô hình (2): uống hỗn hợp dầu cholesterol, liều 10ml/kg. Sau 2 giờ, uống nước cất liều 10ml/kg.
- Lô tham chiếu (3): uống hỗn hợp dầu cholesterol liều 10ml/kg, sau 2 giờ, uống atorvastatin liều 10 mg/kg/24h.
- Lô trị 1 (4): uống hỗn hợp dầu cholesterol liều 10ml/kg, sau 2 giờ, uống CKL-THV 35 mg/ml, thể tích uống 0,1ml/10g để được mức liều 0,35 g/kg/24h.

- Lô trị 2 (5): uống hỗn hợp dầu cholesterol liều 10ml/kg, sau 2 giờ, uống CKL-THV 105 mg/ml, thể tích 0,1ml/10g để được mức liều 1,05 g/kg/24h.

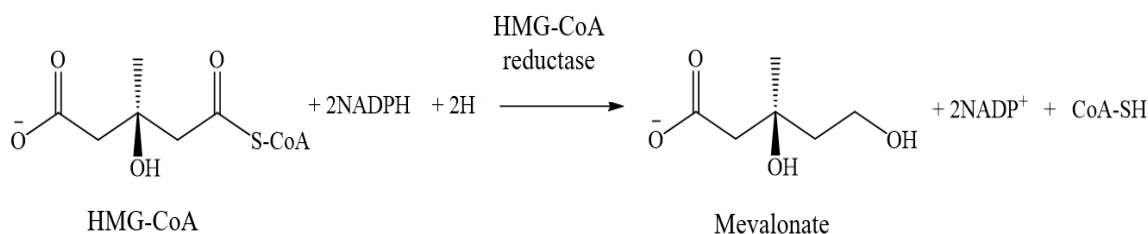
Chỉ tiêu nghiên cứu: Các chỉ số lipid máu: Lấy máu xoang hốc mắt chuột, xác định các chỉ số lipid máu: cholesterol toàn phần, triglycerid, HDL tại các thời điểm bắt đầu nghiên cứu, sau 2 tuần và sau 4 tuần. Chỉ số LDL và non HDL được tính theo công thức Friedewald [140].

2.2.5. Phương pháp nghiên cứu cơ chế tác dụng trên *in vitro*

2.2.5.1. Đánh giá cơ chế ức chế enzym HMG-CoA reductase

Tiến hành đánh giá cơ chế ức chế enzym HMG-CoA reductase *in vitro* bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến UV-VIS [81], [82], [83], sử dụng bộ kit thương mại sẵn có của Sigma-Aldrich.

Nguyên tắc: HMG-CoA reductase (HMGCoAR) xúc tác quá trình chuyển hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) thành acid mevalonic, tiền chất của cholesterol. NADPH có vai trò như một cofactor xúc tác cho phản ứng và bị oxy hóa thành NADP^+ . NADPH hấp thụ ánh sáng mạnh ở bước sóng 340nm, trong khi NADP^+ không hấp thụ mạnh ở bước sóng này. Do đó, bằng cách đo sự giảm độ hấp thụ của NADPH tại bước sóng 340nm, ta có thể xác định được hoạt tính ức chế enzym HMG-CoA reductase. Khi thêm vào phản ứng chất có tác dụng ức chế enzym HMG-CoA reductase thì sẽ làm giảm sự tạo thành NADP^+ , do đó mức giảm độ hấp thụ của NADPH sẽ ít. Mẫu thử có tác dụng ức chế càng mạnh thì mức giảm độ hấp thụ càng ít, và ngược lại.



Hình 2. 7. Phản ứng thủy phân HMG-CoA bởi HMG-CoA reductase

Tiến hành:

- Chuẩn bị dung dịch đệm 1x từ dung dịch 5x (giữ trên đá, -20°C): Pha 10ml dd đệm 5x với 40ml nước siêu tinh khiết được 50ml dd đệm 1x.

- Chuẩn bị dung dịch NADPH: Hoàn nguyên NADPH với 1,5ml dung dịch đệm 1x. Trộn đều và giữ trên đá, bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

- Chuẩn bị dung dịch enzym: Làm tan 1 lượng nhỏ HMG-CoA reductase trên đá và giữ lạnh trong suốt quá trình tiến hành (không được để quá 60 phút).

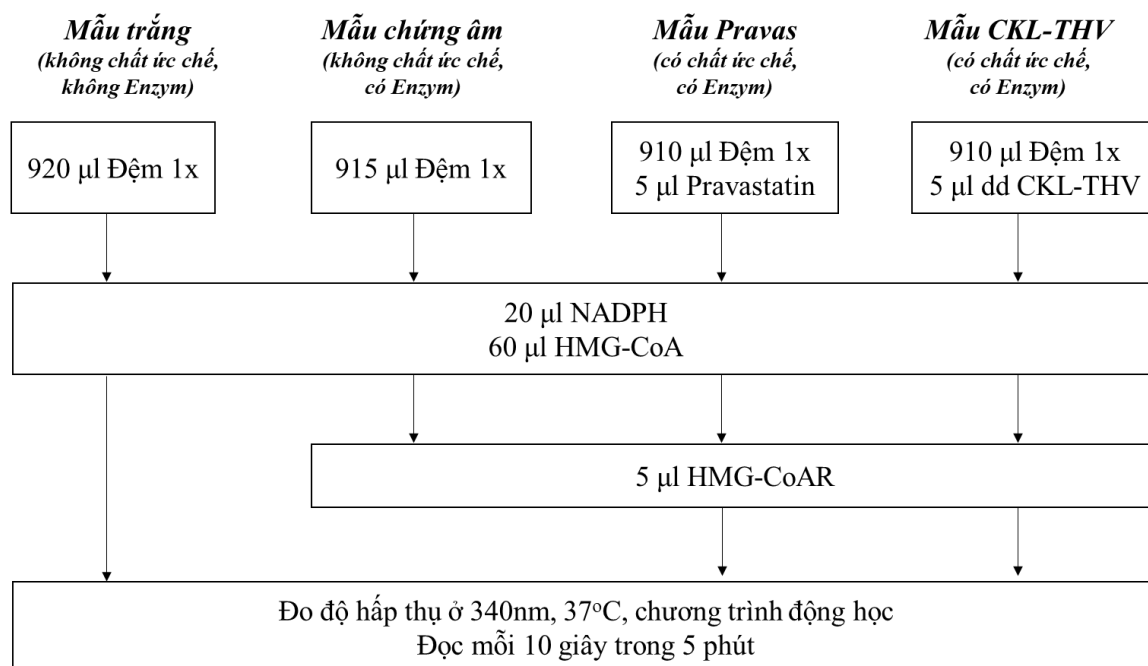
- Chuẩn bị mẫu thử: Pha CKL-THV trong dung dịch nước siêu tinh khiết để được dung dịch gốc có nồng độ 10 mg/ml. Lắc siêu âm 10 phút. Sau đó đem ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút, lấy dịch nổi phía trên đưa vào thử nghiệm. Từ dung dịch gốc, pha thành dãy các dung dịch thử có nồng độ 10; 7,5; 5; 2,5 mg/ml. Trong 1ml phản ứng, lượng thể tích dung dịch thử là 5µl (chiếm 1/200 lần thể tích phản ứng). Như vậy, ta có dãy nồng độ cuối trong thử nghiệm của dung dịch thử CKL-THV là 50; 37,5; 25; 12,5 µg/ml.

- Chuẩn bị cơ chất, chất đối chứng: HMG-CoA, pravastatin được rã đông ở nhiệt độ phòng, sau đó giữ trên đá.

- Pha các dung dịch theo quy trình trong hình 2.10. Thành phần cụ thể các dung dịch trong hỗn hợp phản ứng được biểu thị trong bảng 2.7.

Bảng 2. 6. Thành phần các dung dịch trong hỗn hợp phản ứng thủy phân HMG-CoA trong thử nghiệm *in vitro*

<i>Mẫu</i>	<i>Thể tích (µl)</i>					
	<i>Đệm 1x</i>	<i>Pravas</i>	<i>CKLTHV</i>	<i>NADPH</i>	<i>HMG-CoA</i>	<i>HMGCAR</i>
Trắng	920	-	-	20	60	-
Chứng âm	915	-	-	20	60	5
Pravas	910	5	-	20	60	5
CKL-THV	910	-	5	20	60	5



Hình 2. 8. Sơ đồ nghiên cứu cơ chế tác dụng ức chế HMG-CoA reductase

- Sản phẩm phản ứng được cho vào cuvet thạch anh 1ml rồi đưa vào máy quang phổ đo độ hấp thụ ở 340 nm, 37°C, chương trình động học, đọc mỗi 10 giây trong 5 phút. Mỗi thử nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần ở mỗi nồng độ.

Đánh giá:

- Hoạt độ của enzym được xác định theo công thức sau:

$$\text{Hoạt độ enzym} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{phút}_{\text{mẫu}} - \Delta A_{340}/\text{phút}_{\text{trắng}}) \times TV}{12,44 \times V \times 0,6 \times LP} \left(\frac{\text{Units}}{\text{mgP}} \right)$$

Units/mgP (μ mol/phút/mg-protein): 1 đơn vị sẽ chuyển đổi 1,0 μ mol NADPH mỗi phút ở 37°C.

Ghi chú:

TV: Tổng thể tích phản ứng, tính bằng ml (1 ml)

12,44: Hệ số tắt của NADPH ở bước sóng 340nm là 6,22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (12,44 tương ứng với 2 NADPH trong phản ứng)

V: Thể tích enzym sử dụng, tính bằng ml (5 μ l = 0,005ml)

0,6: Nồng độ enzym, tính bằng mg protein (mgP/ml) (0,50-0,70 mgP/ml)

LP: Đường đi ánh sáng, tính bằng cm (cuvet 1 cm)

- Phần trăm ức chế enzym (%I) của mẫu thử tính theo công thức:

$$\% I = \frac{(\text{Hoạt độ enzym trắng thử} - \text{Hoạt độ enzym thử})}{\text{Hoạt độ enzym trắng thử}} \times 100\%$$

- Xác định nồng độ ức chế 50% hoạt tính enzym (IC₅₀) của mẫu thử:

+ Nếu mẫu có %I tuyến tính theo nồng độ thì vẽ đồ thị hồi quy tuyến tính $y = ax + b$ đi qua tất cả các điểm, với y là giá trị % ức chế, x là giá trị nồng độ.

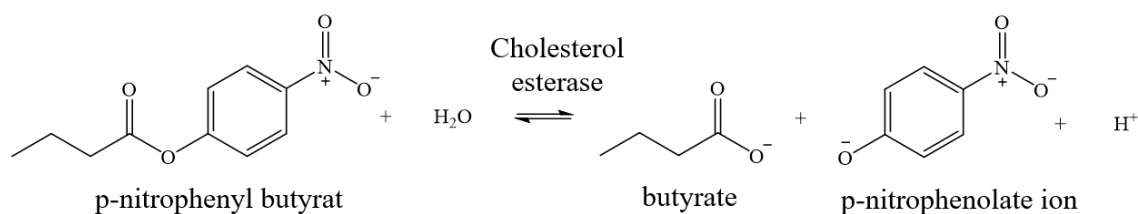
+ Nếu mẫu có %I không tuyến tính theo nồng độ, vẽ đồ thị hồi quy tuyến tính $y = a \cdot \lg(x) + b$.

Thay giá trị $y = 50\%$ vào phương trình sẽ tính được x (chính là nồng độ ức chế 50% hoạt tính enzym).

2.2.5.2. Đánh giá cơ chế ức chế enzym cholesterol esterase

Tiến hành đánh giá cơ chế ức chế enzym cholesterol esterase của CKL-THV *in vitro* bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến UV-VIS, sử dụng cơ chất p-nitrophenyl butyrat (pNBP), theo phương pháp của Pietsch và Gutschow có sửa đổi bởi Brimo và cộng sự [90].

Nguyên tắc: Dưới xúc tác của enzym cholesterol esterase, cơ chất pNPB thủy phân tạo sản phẩm p-nitrophenolat. Đây là một chất có màu vàng và có khả năng hấp thụ ánh sáng quang phổ tử ngoại – khả kiến tại bước sóng 405nm. Khi thêm mẫu thử có tác dụng ức chế enzym thì sẽ làm giảm sự tạo thành p-nitrophenolat nên độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng sẽ giảm. Do vậy, dựa vào đánh giá độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng có thể xác định được tác dụng ức chế enzym của mẫu thử. Mẫu thử có tác dụng ức chế càng mạnh thì độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng càng giảm và ngược lại.



Hình 2. 9. Phản ứng thủy phân pNPB bởi cholesterol esterase

Tiến hành:

- Chuẩn bị dung dịch đệm natri phosphat, 100mM, pH=7,0: Hòa tan 1,78g dinatri hydrophosphat khan ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) trong 80 ml nước. Thêm từ từ dung dịch acid phosphoric 30% cho đến khi đạt pH=7,0. Thêm nước cất vào bình định mức đến vạch 100 ml.

- Chuẩn bị dung dịch enzym: Cholesterol esterase đông khô được hòa tan trong 1ml dung dịch đệm natri phosphat 100mM, pH=7,0. Dung dịch enzym được chia nhỏ thành các phần 200 μl , bảo quản ở -80°C để tránh sự giảm hoạt tính. Trước khi sử dụng, các phần dung dịch enzym được rã đông và pha loãng thành nồng độ 5 $\mu\text{g/ml}$ bằng dung dịch đệm natri phosphat ở trên.

- Chuẩn bị dung dịch thử: Pha CKL-THV trong acetonitril để được dung dịch gốc có nồng độ 10 mg/ml. Lắc siêu âm 10 phút. Sau đó đem ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút, lấy dịch nổi phía trên đưa vào thử nghiệm. Từ dung dịch gốc, pha thành dãy các dung dịch thử có nồng độ 10; 7,5; 5; 2,5; 1 mg/ml. Trong 1ml phản ứng, lượng thể tích dung dịch thử là 20 μl (chiếm 1/50 lần thể tích phản ứng). Như vậy, ta có dãy nồng độ cuối trong thử nghiệm của dung dịch thử CKL-THV là 200, 150, 100, 50, 20 $\mu\text{g/ml}$.

- Chuẩn bị các dung dịch khác:

+ Dung dịch cơ chất: Hòa tan 20,9 mg pNPB trong 2ml acetonitril.

+ Dung dịch Triton-X100 5% (w/w) từ dung dịch Triton-X100: Cân 0,5g dung dịch triton-X100, thêm khoảng 80 ml nước. Lắc siêu âm ở 30 – 40 $^\circ\text{C}$ trong 60 phút. Thêm nước vừa đủ 100 ml.

+ Dung dịch acetonitril 2% từ dung dịch acetonitril: Hút 0,5ml dung dịch acetonitril, pha loãng với nước trong bình định mức 25ml.

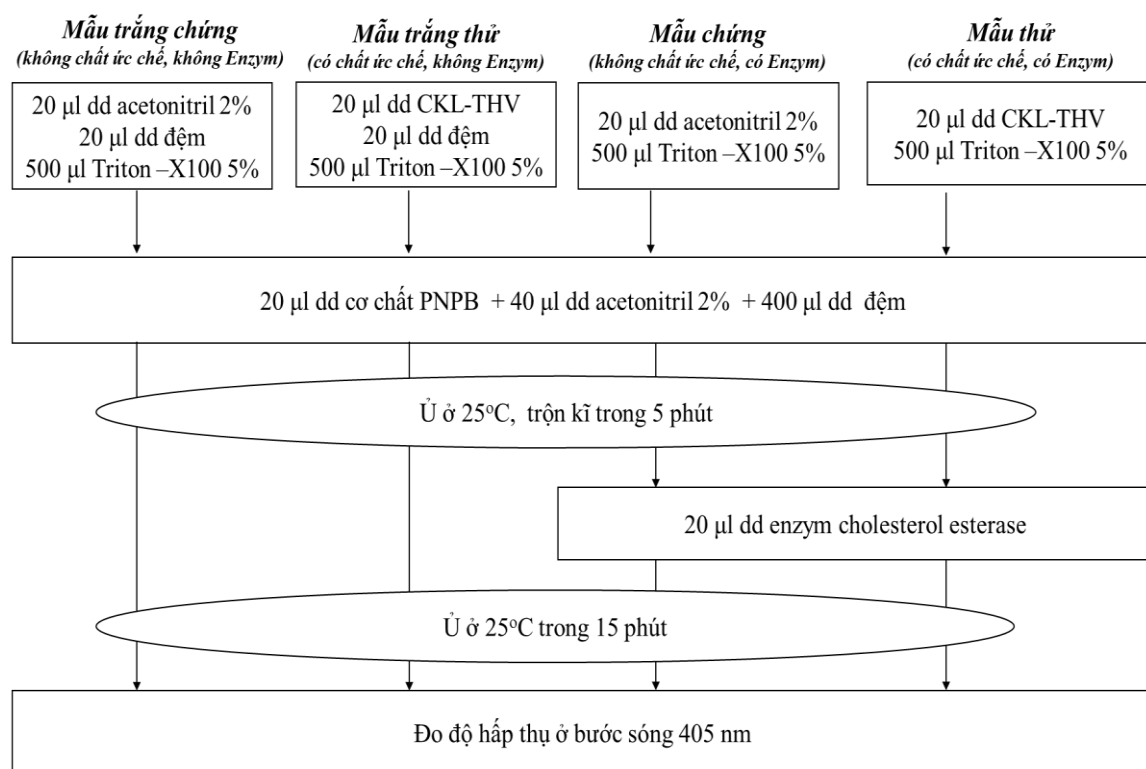
- Pha các dung dịch theo quy trình trong hình 2.11. Thành phần cụ thể các dung dịch trong hỗn hợp phản ứng được biểu thị trong bảng 2.4.

- Dung dịch phản ứng được cho vào cuvet thạch anh 1ml rồi đưa vào máy quang phổ UV-Vis đo độ hấp thụ. Chọn chế độ đo theo dải bước sóng từ 350

nm đến 500 nm. Sản phẩm phản ứng hấp thụ cực đại ở bước sóng 405 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở mỗi nồng độ.

Bảng 2. 7. Thành phần các dung dịch trong hỗn hợp phản ứng thủy phân pNPB trong thử nghiệm in vitro

<i>Mẫu</i>	Thể tích (μl)					
	<i>DD Đệm</i>	<i>Triton</i>	<i>CKL-THV</i>	<i>pNPB</i>	<i>Acetonitril</i>	<i>Enzym</i>
Trắng chứng	420	500	-	20	60	-
Trắng thử	420	500	20	20	40	-
Chứng	400	500	-	20	60	20
Thử	400	500	20	20	40	20



Hình 2. 10. Sơ đồ nghiên cứu cơ chế tác dụng ức chế cholesterol esterase

Đánh giá:

- Xác định phần trăm ức chế enzym cholesterol esterase (%I) của mẫu

thử theo công thức: $\%I = \frac{(A_c - A_{oc}) - (A_t - A_{ot})}{(A_c - A_{oc})} \times 100\%$

Ghi chú:

Ac : Độ hấp thụ mẫu chứng (không có chất ức chế, có enzym)

Aoc : Độ hấp thụ mẫu trắng chứng (không có chất ức chế, không có enzym)

At : Độ hấp thụ mẫu thử (có chất ức chế, có enzym)

Aot : Độ hấp thụ mẫu trắng thử (có chất ức chế, không có enzym)

- Xác định nồng độ ức chế 50% hoạt tính enzym (IC_{50}) của mẫu thử (phương pháp tương tự như mô tả ở mục 2.2.3.1).

2.3. Địa điểm nghiên cứu

- Các nghiên cứu về độc tính và nghiên cứu đánh giá tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu *in vivo* được tiến hành ở Bộ môn Dược lý, Học viện Quân y.

+ Các xét nghiệm sinh hóa, huyết học (trong thử nghiệm độc tính bán trường diễn) được làm tại Bộ môn Dược lý, Học viện Quân y.

+ Các xét nghiệm lipid máu (trong các thử nghiệm *in vivo*) được làm tại Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Bông Quốc gia Lê Hữu Trác.

+ Các xét nghiệm mô bệnh học (trong thử nghiệm độc tính bán trường diễn) được làm tại Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện 103.

- Các nghiên cứu đánh giá cơ chế tác dụng ức chế enzym HMG-CoA reductase và enzym cholesterol esterase *in vitro* được tiến hành tại Phòng Thí nghiệm Hóa lý và Dược, Bộ môn Lý – Lý sinh y học, Trường Đại học Y – Dược, Đại học Thái Nguyên.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê y sinh học, sử dụng phần mềm SPSS 26.0.

Kiểm tra phân phối chuẩn bằng kiểm định Kolmogorov – Smirnov và Shapiro – Wilk. Nếu $p > 0,05$ thì phân phối chuẩn, nếu $p < 0,05$ thì phân phối không chuẩn.

- Nếu phân phối chuẩn, số liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Sử dụng kiểm định Paired - Samples T-Test khi so sánh giá trị trung bình của 1

nhóm tại các thời điểm khác nhau; Kiểm định Independent - Samples T-Test để so sánh giá trị trung bình của 2 nhóm trong cùng một thời điểm. Khi so sánh giá trị trung bình từ 3 nhóm trở lên, sử dụng kiểm định One-way ANOVA. Đánh giá hậu kiểm bằng Post Hoc test LSD nếu phương sai đồng nhất, Dunnett's T3 nếu phương sai không đồng nhất.

- Nếu phân phối không chuẩn, số liệu được biểu diễn dưới dạng Trung vị, khoảng tứ phân vị. Sử dụng kiểm định Wilcoxon khi so sánh giá trị trung bình của 1 nhóm tại các thời điểm khác nhau; Kiểm định Mann-Whitney để so sánh giá trị trung vị của 2 nhóm trong cùng một thời điểm. Khi so sánh giá trị trung vị từ 3 nhóm trở lên, sử dụng kiểm định Kruskal-Wallis.

Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$: so với lô chứng

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$: so với lô mô hình

^ $p < 0,05$; ^^ $p < 0,01$; ^^^ $p < 0,001$: so giữa 2 lô với nhau

2.5. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành dưới sự chấp thuận của Hội đồng khoa học Học viện Quân Y và tuân thủ các tiêu chuẩn về đạo đức trong nghiên cứu Y học. Các động vật thí nghiệm được chăm sóc trong điều kiện vệ sinh sạch sẽ, cung cấp thức ăn và nước uống theo điều kiện phòng thí nghiệm. Các quy trình và thao tác thực hiện theo quy định chung của động vật nghiên cứu.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính

3.1.1. Độc tính cấp

Chuột nhắt trắng trong các lô được uống CKL-THV với các mức liều tăng dần từ liều 1,5g/kg đến liều cao nhất có thể đưa được qua đường uống cho chuột nhắt qua kim cong đầu tù là 12g/kg thể trọng. Theo dõi sát chuột ở các lô trong 72 giờ sau khi uống chế phẩm và trong suốt 7 ngày sau khi uống chế phẩm, thu được bảng kết quả sau:

Bảng 3. 1. Kết quả theo dõi chuột trong thử nghiệm độc tính cấp

Chỉ tiêu theo dõi	Kết quả
Tình trạng chung	Bình thường, lông mượt
Ăn uống	Bình thường
Vận động	Bình thường, nhanh nhẹn
Bài tiết	Bình thường, phân thành khuôn
Phản xạ	Bình thường, linh hoạt
Biểu hiện bất thường	Không có
Số chuột chết	Không có

Kết quả ở bảng 3.1 cho thấy: Chuột ở tất cả các lô đều bình thường, lông mượt, không có biểu hiện khó thở hay tím tái. Các hoạt động ăn uống, chức năng vận động và bài tiết bình thường. Chuột linh hoạt, phản xạ của các giác quan như mắt, mũi nhanh nhẹn. Không thấy có dấu hiệu bất thường trong suốt thời gian nghiên cứu.

Với các mức liều CKL-THV khác nhau từ 1,5 đến 12,0 g/kg/24h, ở tất cả các lô đều không có chuột nào chết trong 72 giờ sau khi uống CKL-THV và 7 ngày sau đó. Mức liều 12,0 g/kg/24h là mức liều tối đa dùng được bằng đường uống để đánh giá độc tính cấp của CKL-THV. Do không có chuột chết nên chưa xác định được liều gây chết 50% động vật thí nghiệm (LD_{50}) của CKL-THV trên thực nghiệm.

3.1.2. Độc tính bán trường diễn

3.1.2.1. Ảnh hưởng của CKL-THV đến tình trạng chung và sự thay đổi cân nặng của chuột cống trắng khi dùng dài ngày

* **Tình trạng chung:** Chuột ở tất cả các lô nghiên cứu đều bình thường. Chuột lông mượt, ăn uống, vận động, bài tiết bình thường, phân thành khuôn. Không có biểu hiện bất thường trong suốt quá trình nghiên cứu.

* **Ảnh hưởng của CKL-THV đến trọng lượng chuột**

Bảng 3. 2. Ảnh hưởng của CKL-THV đến trọng lượng chuột

Thời điểm	Cân nặng (g) ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)			p giữa các lô
	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	
Bắt đầu (a)	182,1 $\pm$ 5,93	181,8 $\pm$ 4,71	182,8 $\pm$ 4,92	$p^* > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	211,2 $\pm$ 12,35	210,9 $\pm$ 8,67	208,2 $\pm$ 5,61	
Sau 90 ngày (c)	221,9 $\pm$ 10,19	221,9 $\pm$ 10,28	226,4 $\pm$ 9,29	
Trong cùng lô	$p^{**}_{b,c-a} < 0,01; p^{**}_{c-b} < 0,01$			-

Ghi chú: p^* : kiểm định ANOVA, hậu kiểm LSD

p^{**} : kiểm định Paired - Samples T-Test

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy: So sánh trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu cho thấy trọng lượng chuột ở cả ba lô nghiên cứu đều tăng dần, sự thay đổi có ý nghĩa với mức thống kê $p < 0,01$. So sánh giữa các lô với nhau trong cùng một thời điểm nghiên cứu cho thấy trọng lượng chuột ở các lô cho uống CKL-THV liều 0,35 g/kg thể trọng/24h và 1,05 g/kg thể trọng/24h không có sự khác biệt với nhau và khác biệt so với ở lô chứng sinh lý ($p > 0,05$).

3.1.2.2. Ảnh hưởng của CKL-THV đến một số chỉ tiêu huyết học

Lấy máu xoang hốc mắt chuột vào các thời điểm bắt đầu thử nghiệm, sau 45 ngày và sau 90 ngày nghiên cứu. Sau đó, xử lý mẫu máu và xác định các chỉ số huyết học, sinh hóa. Kết quả thu được cụ thể như sau:

Bảng 3. 3. Ảnh hưởng của CKL-THV đến số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố

Thời điểm	Lô chúng	Lô trị 1	Lô trị 2	Pgiữa các lô
Số lượng hồng cầu (x10 ¹² /L) (n = 10, $\bar{X} \pm SD$)				
Trước TN	8,91 ± 0,89	9,04 ± 0,73	8,71 ± 0,49	p* > 0,05
Sau 45 ngày	8,22 ± 1,38	8,97 ± 0,26	8,70 ± 0,60	
Sau 90 ngày	8,08 ± 1,42	9,05 ± 0,63	8,56 ± 0,73	
Ptrong cùng lô	p** > 0,05			-
Hàm lượng huyết sắc tố (g/L) (n = 10, $\bar{X} \pm SD$)				
Trước TN	161,30 ± 10,97	157,90 ± 14,69	163,00 ± 7,62	p* > 0,05
Sau 45 ngày	153,80 ± 15,20	149,80 ± 15,63	161,30 ± 12,44	
Sau 90 ngày	152,90 ± 13,80	152,70 ± 15,99	160,50 ± 13,70	
Ptrong cùng lô	p** > 0,05			-

Ghi chú: p^* : kiểm định ANOVA, hậu kiểm LSD

p^{**} : kiểm định Paired - Samples T-Test

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy: So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm thí nghiệm, số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3. 4. Ảnh hưởng của CKL-THV đến chỉ số hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu

Thời điểm	Lô chúng	Lô trị 1	Lô trị 2	pgiữa các lô
Hematocrit (%) ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)				
Trước TN	$42,85 \pm 3,73$	$42,66 \pm 4,38$	$44,05 \pm 2,27$	$p^* > 0,05$
Sau 45 ngày	$41,07 \pm 4,53$	$41,01 \pm 4,17$	$44,73 \pm 3,77$	
Sau 90 ngày	$40,99 \pm 2,80$	$41,89 \pm 4,39$	$43,70 \pm 3,42$	
P trong cùng lô	$p^{**} > 0,05$			-

Thời điểm	Lô chúng	Lô trị 1	Lô trị 2	P giữa các lô
Thể tích trung bình hồng cầu (fL) ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)				
Trước TN	49,30 $\pm$ 2,83	48,80 $\pm$ 3,19	50,60 $\pm$ 2,01	$p^* > 0,05$
Sau 45 ngày	50,00 $\pm$ 4,03	47,60 $\pm$ 5,52	51,80 $\pm$ 3,55	
Sau 90 ngày	50,50 $\pm$ 4,09	48,00 $\pm$ 5,98	51,90 $\pm$ 3,67	
P trong cùng lô	$p^{**} > 0,05$			-

Ghi chú: p^* : kiểm định ANOVA, hậu kiểm LSD

p^{**} : kiểm định Paired - Samples T-Test

Kết quả ở bảng 3.4 cho thấy: So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm thí nghiệm, chỉ số hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, chỉ số hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3. 5. Ảnh hưởng của CKL-THV đến số lượng bạch cầu và tiểu cầu

Thời điểm	Lô chúng	Lô trị 1	Lô trị 2	Pgiữa các lô
Số lượng bạch cầu (x10 ⁹ /L) (n = 10, $\bar{x} \pm SD$)				
Trước TN	7,08 ± 1,89	6,74 ± 2,07	6,85 ± 2,21	p*> 0,05
Sau 45 ngày	7,49 ± 2,49	7,76 ± 1,09	8,27 ± 1,03	
Sau 90 ngày	7,37 ± 2,16	7,42 ± 1,29	7,43 ± 1,39	
Ptrong cùng lô	p**>0,05			-
Số lượng tiểu cầu (x10 ⁹ /L) (n = 10, $\bar{x} \pm SD$)				
Trước TN	603,90 ± 61,54	657,40 ± 114,99	528,80 ± 87,15	p*> 0,05
Sau 45 ngày	605,70 ± 77,25	653,90 ± 89,66	533,30 ± 94,63	
Sau 90 ngày	684,00 ± 101,0	668,70 ± 69,28	539,30 ± 72,17	
Ptrong cùng lô	p**>0,05			-

Ghi chú: p^* : kiểm định ANOVA, hậu kiểm LSD

p^{**} : kiểm định Paired - Samples T-Test

Kết quả ở bảng 3.5 cho thấy: So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm thí nghiệm, số lượng bạch cầu và tiểu cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, số lượng bạch cầu và tiểu cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.1.2.3 Ảnh hưởng của CKL-THV đến một số chỉ tiêu sinh hóa

Bảng 3. 6. Ảnh hưởng của CKL-THV đến hoạt độ AST, ALT

Thời điểm XN	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	Pgiữa các lô
Hoạt độ AST (UI/l) (n = 10, $\bar{x} \pm SD$)				
Trước TN	147,40 ± 6,35	151,50 ± 11,34	144,30 ± 12,99	p* > 0,05
Sau 45 ngày	149,70 ± 12,03	154,10 ± 5,13	147,50 ± 9,51	
Sau 90 ngày	145,00 ± 14,05	149,00 ± 12,71	140,40 ± 15,85	
Ptrong cùng lô	p** > 0,05			-
Hoạt độ ALT (UI/l) (n = 10, $\bar{x} \pm SD$)				
Trước TN	91,40 ± 14,37	95,60 ± 12,12	89,10 ± 12,44	p* > 0,05
Sau 45 ngày	86,00 ± 13,26	92,90 ± 15,08	91,60 ± 9,90	
Sau 90 ngày	81,70 ± 13,16	90,40 ± 10,64	82,50 ± 12,08	
Ptrong cùng lô	p** > 0,05			-

Ghi chú: p^* : kiểm định ANOVA, hậu kiểm LSD

p^{**} : kiểm định Paired - Samples T-Test

Kết quả ở bảng 3.6 cho thấy: So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, hoạt độ các enzym AST, ALT trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, hoạt độ các enzym AST, ALT thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3. 7. Ảnh hưởng của CKL-THV đến chỉ số albumin, cholesterol toàn phần và triglycerid

Thời điểm XN	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	pgiữa các lô
Albumin (g/L) (n = 10, $\bar{x} \pm SD$)				
Trước TN	31,30 ± 4,55	33,70 ± 4,67	33,90 ± 5,45	p*> 0,05
Sau 45 ngày	33,60 ± 4,62	32,10 ± 4,15	33,10 ± 2,60	
Sau 90 ngày	35,40 ± 5,30	35,90 ± 6,62	34,20 ± 2,86	
Ptrong cùng lô	p**>0,05			
Cholesterol toàn phần (mmol/L) (n = 10, $\bar{x} \pm SD$)				
Trước TN	1,72 ± 0,21	1,57 ± 0,21	1,63 ± 0,16	p*> 0,05
Sau 45 ngày	1,69 ± 0,20	1,59 ± 0,19	1,73 ± 0,34	
Sau 90 ngày	1,55 ± 0,17	1,50 ± 0,18	1,51 ± 0,22	
Ptrong cùng lô	p**>0,05			-
Triglycerid (mmol/L) (n = 10, $\bar{x} \pm SD$)				
Trước TN	1,38 ± 0,14	1,29 ± 0,06	1,37 ± 0,15	p*> 0,05
Sau 45 ngày	1,50 ± 0,29	1,35 ± 0,05	1,39 ± 0,08	
Sau 90 ngày	1,44 ± 0,14	1,41 ± 0,13	1,35 ± 0,07	
Ptrong cùng lô	p**>0,05			-

Ghi chú: p^* : kiểm định ANOVA, hậu kiểm LSD

p^{**} : kiểm định Paired - Samples T-Test

Kết quả ở bảng 3.7 cho thấy: So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, chỉ số albumin, cholesterol toàn phần và triglycerid trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Khi so sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, chỉ số albumin, cholesterol toàn phần và triglycerid trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3. 8. Ảnh hưởng của CKL-THV đến chỉ số creatinin

Thời điểm XN	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	pgiữa các lô
Creatinin ($\mu\text{mol/l}$) ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)				
Trước TN	78,40 $\pm$ 7,73	74,40 $\pm$ 12,08	72,10 $\pm$ 7,92	$p^* > 0,05$
Sau 45 ngày	74,40 $\pm$ 10,30	74,40 $\pm$ 7,93	74,00 $\pm$ 7,73	
Sau 90 ngày	73,30 $\pm$ 8,00	68,70 $\pm$ 12,43	77,30 $\pm$ 7,79	
P trong cùng lô	$p^{**} > 0,05$			-

Ghi chú: p^* : kiểm định ANOVA, hậu kiểm LSD

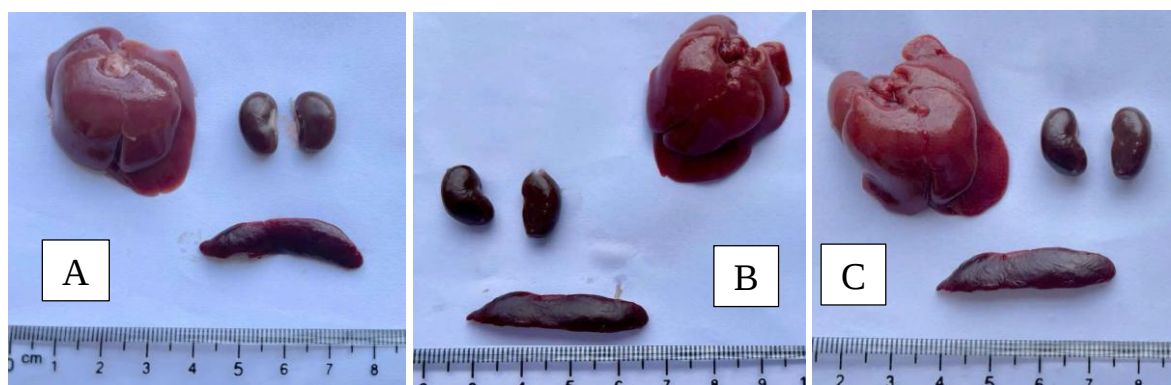
p^{**} : kiểm định Paired - Samples T-Test

Kết quả ở bảng 3.8 cho thấy: So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, chỉ số creatinin trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Khi so sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, chỉ số creatinin trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.1.2.4. Ảnh hưởng của CKL-THV lên các tạng gan, lách, thận của chuột

* Ảnh hưởng của CKL-THV lên đại thể gan, lách, thận

Quan sát đại thể các tạng gan, lách, thận chuột ở các lô nghiên cứu bằng mắt thường và dưới kính lúp thu được kết quả như trong hình sau:



Hình 3. 1. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột ở các lô nghiên cứu

Ghi chú: (A) Lô chứng (chuột số 3); (B) Lô trị 1 (CKL-THV 0,35 g/kg/24h) (chuột số 25); (C) Lô trị 2 (CKL-THV 1,05 g/kg/24h) (chuột số 13)

Kết quả ở hình 3.1 cho thấy: Hình ảnh đại thể các tạng gan, lách, thận của chuột ở các lô đều có màu nâu đỏ thẫm đồng đều, bề mặt nhẵn, không có u

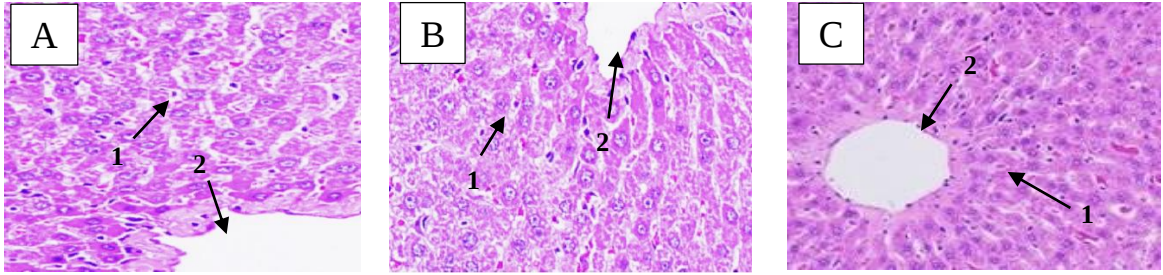
cục hoặc xuất huyết, có đàn hồi khi ấn xuống. So sánh hình ảnh đại thể các tạng gan, lách, thận giữa các lô nghiên cứu, không nhận thấy có sự khác biệt.

*** Hình ảnh vi thể gan chuột**

Gan chuột sau khi nhuộm HE, được quan sát dưới kính hiển vi, độ phóng đại 400 lần. Kết quả thu được hiển thị ở bảng 3.9 và hình 3.2 dưới đây:

Bảng 3. 9. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học gan chuột

Chỉ tiêu	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2
Tế bào gan	Bình thường	Bình thường, bào tương thuần nhất	Bình thường, bào tương thuần nhất
Cấu trúc tiểu thùy gan	Đồng đều, không thấy xuất huyết hoặc hoại tử	Các tiểu thùy gan rõ, đồng đều, không thấy hình ảnh xuất huyết hoặc hoại tử	Các tiểu thùy gan rõ, không thấy xuất huyết hoặc hoại tử
Cấu trúc khoang cửa	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Mạch máu	Tĩnh mạch cửa và tĩnh mạch trung tâm tiểu tùy có cấu trúc bình thường	Tĩnh mạch cửa và tĩnh mạch trung tâm tiểu tùy có cấu trúc bình thường, không có xung huyết	Tĩnh mạch cửa và tĩnh mạch trung tâm tiểu tùy có cấu trúc bình thường, không có xung huyết
Tổn thương	Không	Không thấy ở xuất huyết hoặc ổ hoại tử, thoái hóa tế bào gan.	Không thấy ở xuất huyết hoặc ổ hoại tử, thoái hóa tế bào gan.
Kết luận	Nhu mô gan bình thường	Nhu mô gan bình thường	Nhu mô gan bình thường



Hình 3. 2. Hình ảnh vi thể gan chuột ở các lô nghiên cứu (nhuộm HE, 400X)

Ghi chú: (A) Lô chứng (chuột số 3); (B) Lô trị 1 (CKL-THV 0,35 g/kg/24h)

(chuột số 13); (C) Lô trị 2 (CKL-THV 1,05 g/kg/24h (chuột số 28)

1- Tế bào gan ; 2- Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy

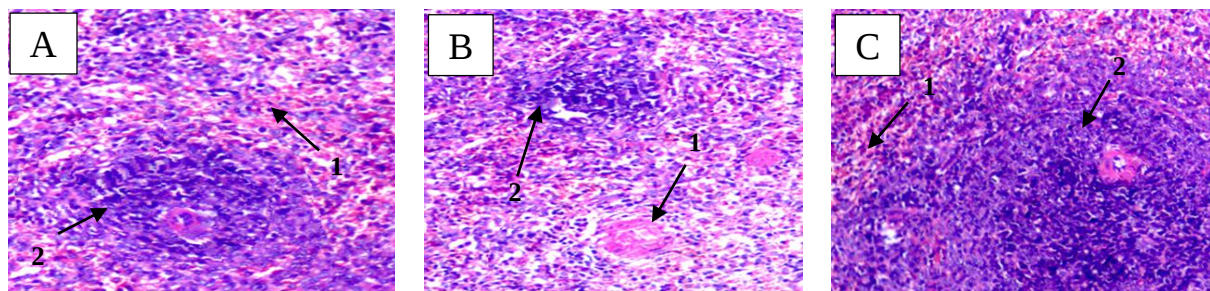
Kết quả ở bảng 3.9 và hình 3.2 cho thấy: Hình ảnh vi thể gan chuột dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột các lô sử dụng CKL-THV không khác biệt so với hình ảnh vi thể gan chuột ở lô chứng. Trên hình ảnh không thấy ở xuất huyết hoặc ổ hoại tử, thoái hóa tế bào gan.

*** Hình ảnh vi thể lách chuột**

Lách chuột sau khi nhuộm HE, được quan sát dưới kính hiển vi, độ phóng đại 400 lần. Kết quả thu được hiển thị ở bảng 3.10 và hình 3.3 dưới đây:

Bảng 3. 10. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học lách chuột

Chỉ tiêu	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2
Cấu trúc vùng tủy trắng	Bình thường	Bắt màu xanh thẫm, rõ ràng, tập trung các nang lympho lớn	Bắt màu xanh thẫm, rõ ràng, tập trung các nang lympho lớn
Cấu trúc mạch máu	Bình thường	Xung huyết nhẹ	Xung huyết nhẹ
Cấu trúc xoang	Bình thường	Các xoang nang chứa nhiều hồng cầu và một số đại thực bào	Các xoang nang chứa nhiều hồng cầu và một số đại thực bào
Tổn thương	Không	Không	Không
Kết luận	Nhu mô lách bình thường	Nhu mô lách bình thường	Nhu mô lách bình thường



Hình 3. 3. Hình ảnh vi thể lách chuột ở các lô nghiên cứu (nhuộm HE, 400X)

Ghi chú: (A) Lô chứng (chuột số 1); (B) Lô trị 1 (CKL-THV 0,35 g/kg/24h (chuột số 14); (C) Lô trị 2 (CKL-THV 1,05 g/kg/24h (chuột số 23)

1- Vùng tủy đỏ ; 2- Vùng tủy trắng

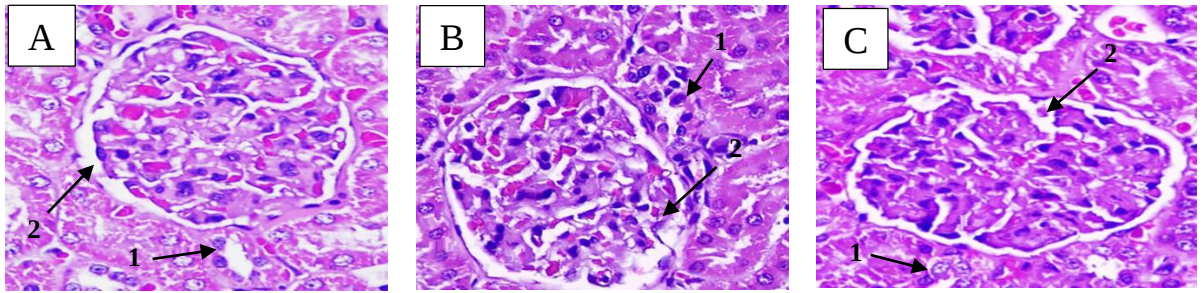
Kết quả ở bảng 3.10 và hình 3.3 cho thấy: Hình ảnh vi thể lách dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở các lô CKL-THV không khác biệt so với lô chứng. Trên hình ảnh thấy vùng tủy trắng bắt màu xanh thẫm, tập trung các nang lympho lớn. Vùng tủy đỏ bắt màu xanh đỏ, với các xoang nang chứa nhiều hồng cầu và một số đại thực bào.

*** Hình ảnh vi thể thận chuột**

Thận chuột sau khi nhuộm HE, được quan sát dưới kính hiển vi, độ phóng đại 400 lần. Kết quả thu được hiển thị ở bảng 3.11 và hình 3.4 dưới đây:

Bảng 3. 11. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học thận chuột

Chỉ tiêu	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2
Cấu trúc vùng vỏ	Bình thường	Rõ ràng	Rõ ràng
Cấu trúc vùng tủy	Bình thường	Rõ ràng	Rõ ràng
Cầu thận	Bình thường	Bình thường, bao Bowman rõ	Bình thường, bao Bowman rõ
Ống thận	Bình thường	Các ống thận đều	Các ống thận đều
Tổn thương	Không	Không	Không
Kết luận	Nhu mô thận bình thường	Nhu mô thận bình thường	Nhu mô thận bình thường



Hình 3. 4. Hình ảnh vi thể thận ở các lô nghiên cứu (nhuộm HE, 400X)

Ghi chú: (A) Lô chứng (chuột số 2); (B) Lô trị 1 (CKL-THV 0,35 g/kg/24h (chuột số 12); (C) Lô trị 2 (CKL-THV 1,05 g/kg/24h (chuột số 28)

1- Tế bào ống thận ; 2-Tiểu cầu thận

Kết quả ở bảng 3.11 và hình 3.4 cho thấy: Hình ảnh vi thể thận dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở các lô CKL-THV không khác biệt so với lô chứng. Cấu trúc các vùng chức năng thận đều bình thường.

3.2. Kết quả nghiên cứu tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu

3.2.1. Nghiên cứu tác dụng chống béo phì in vivo

3.2.1.1. Kết quả xây dựng mô hình béo phì bằng chế độ ăn HFD

Trong giai đoạn gây mô hình chuột béo phì, sau 12 tuần cho chuột ăn chế độ ăn HFD, chúng tôi tiến hành đo trọng lượng và chiều dài của tất cả các chuột. Sau đó tính chỉ số béo phì Lee của các chuột này, từ đó, lựa chọn 40 chuột có chỉ số béo phì Lee lớn hơn 0,301 đưa vào nghiên cứu giai đoạn thử nghiệm chính thức. Lô chứng của giai đoạn thử nghiệm chính thức gồm 10 chuột khỏe mạnh bình thường khác, cân nặng 180-200g. Dưới đây là bảng tổng hợp một số chỉ tiêu nghiên cứu của chuột ở các lô nghiên cứu tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm chính thức.

Bảng 3. 12. Trọng lượng, chiều dài, vòng bụng và chỉ số Lee của chuột ở các lô tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm chính thức

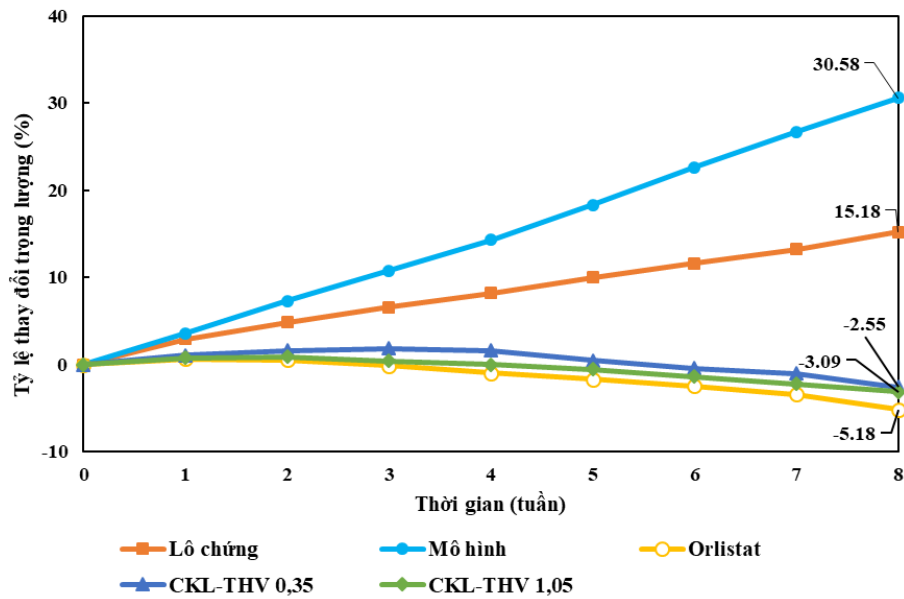
Lô nghiên cứu	Chỉ tiêu nghiên cứu ($\bar{X} \pm SD$)			
	Trọng lượng (g)	Chiều dài (cm)	Vòng bụng (cm)	Chỉ số Lee
Lô chứng (1)	188,9 ± 7,78	19,3 ± 0,21	13,9 ± 0,19	0,298 ± 0,003
Mô hình (2)	257,3 ± 18,47 ***	19,3 ± 0,25	17,9 ± 0,55 ***	0,330 ± 0,006 ***
Orlistat (3)	257,2 ± 22,07 ***	19,3 ± 0,31	17,9 ± 0,30 ***	0,330 ± 0,006 ***
CKL-THV 0,35 (4)	257,1 ± 25,07 ***	19,3 ± 0,23	18,0 ± 0,39 ***	0,330 ± 0,010 ***
CKL-THV 1,05 (5)	257,2 ± 22,33 ***	19,2 ± 0,27	18,0 ± 0,26 ***	0,330 ± 0,009 ***

Ghi chú: *p* đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm Dunnett T3

Kết quả ở bảng 3.12 cho thấy: Chuột ở lô mô hình, lô sử dụng orlistat, và các lô sử dụng CKL-THV đều có chỉ số Lee lớn hơn 0,310. Trọng lượng chuột, số đo vòng bụng chuột và chỉ số Lee của các lô này đều có sự khác biệt so với lô chứng là lô có các chuột bình thường ($p < 0,001$). Không có sự khác biệt về chiều dài chuột giữa 5 lô nghiên cứu ($p > 0,05$). Chuột béo phì ở các lô mô hình, lô sử dụng orlistat, lô sử dụng CKL-THV có sự tương đồng về trọng lượng chuột, chiều dài chuột, vòng bụng chuột và chỉ số Lee ($p > 0,05$).

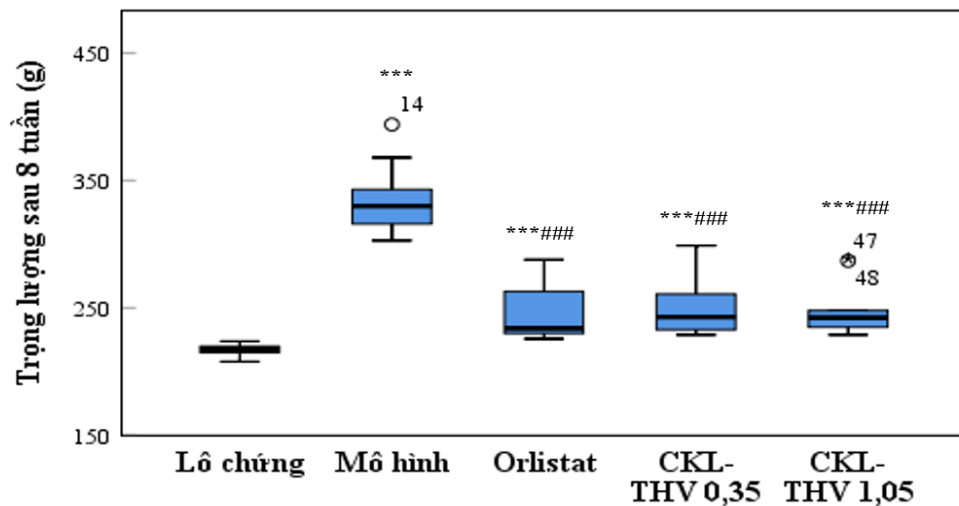
3.2.1.2. Ảnh hưởng của CKL-THV đến trọng lượng chuột béo phì

Theo dõi trọng lượng chuột theo tuần trong thời gian nghiên cứu ở giai đoạn nghiên cứu béo phì (giai đoạn thử nghiệm chính thức), tính tỷ lệ phần trăm thay đổi trọng lượng từng tuần so với thời điểm T0 (thời điểm bắt đầu giai đoạn thử nghiệm chính thức), chúng tôi thu được kết quả cụ thể như sau:



Biểu đồ 3. 1. Sự thay đổi trọng lượng chuột ở các lô nghiên cứu

Kết quả ở biểu đồ 3.1 cho thấy: Trọng lượng của chuột ở lô chứng và lô mô hình tăng theo thời gian. Trong đó, lô mô hình có tỉ lệ thay đổi trọng lượng tăng mạnh hơn so với tất cả các lô khác, tỉ lệ tăng trọng lượng so với thời điểm bắt đầu giai đoạn chính thức là 30,58%. Các lô chuột sử dụng orlistat và các mẫu CKL-THV có xu hướng giảm trọng lượng. Lô sử dụng CKL-THV làm giảm 2,55 – 3,09 % trọng lượng sau 8 tuần.

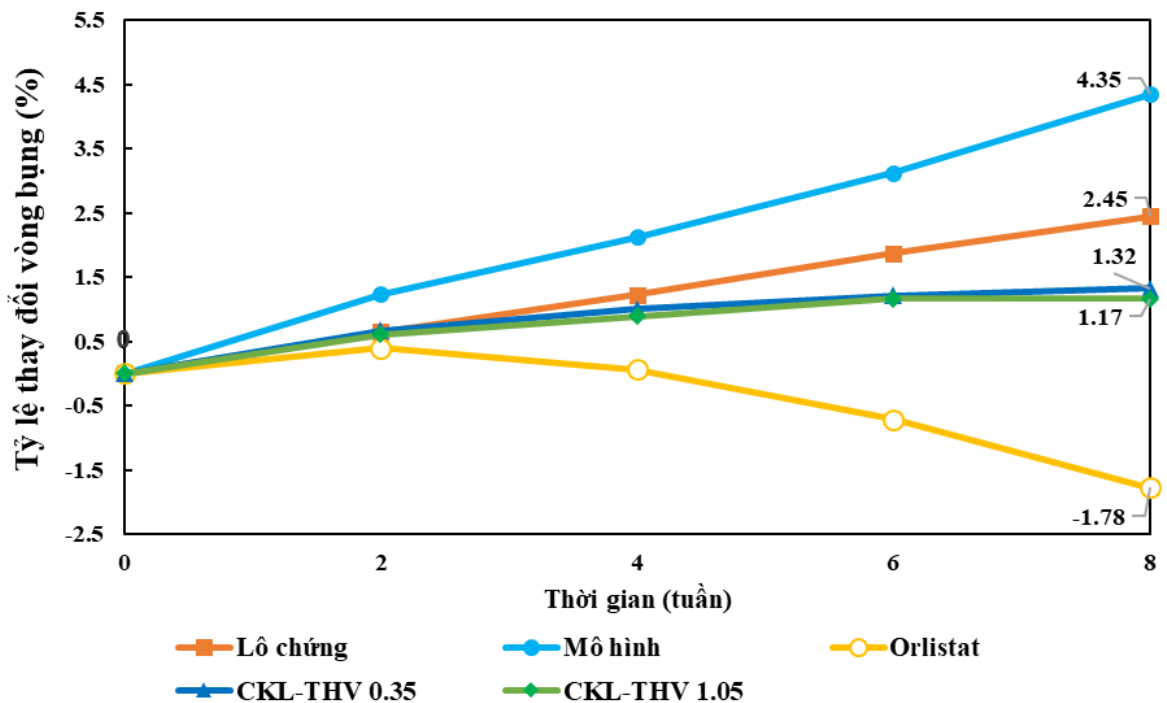


Biểu đồ 3. 2. Trọng lượng chuột ở các lô nghiên cứu sau 8 tuần

Ghi chú: giá trị p đánh giá bằng kiểm định Mann Whitney

Kết quả ở biểu đồ 3.2 cho thấy: Tại thời điểm kết thúc thử nghiệm (sau 8 tuần), có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa trọng lượng chuột ở lô chúng so với tất cả các lô khác ($p < 0,001$). Khi so sánh trọng lượng chuột ở lô mô hình với các lô sử dụng orlistat và CKL-THV cũng nhận thấy có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê, với mức ý nghĩa $p < 0,001$). Không có sự khác biệt về trọng lượng chuột tại thời điểm kết thúc thử nghiệm giữa các lô sử dụng orlistat và CKL-THV.

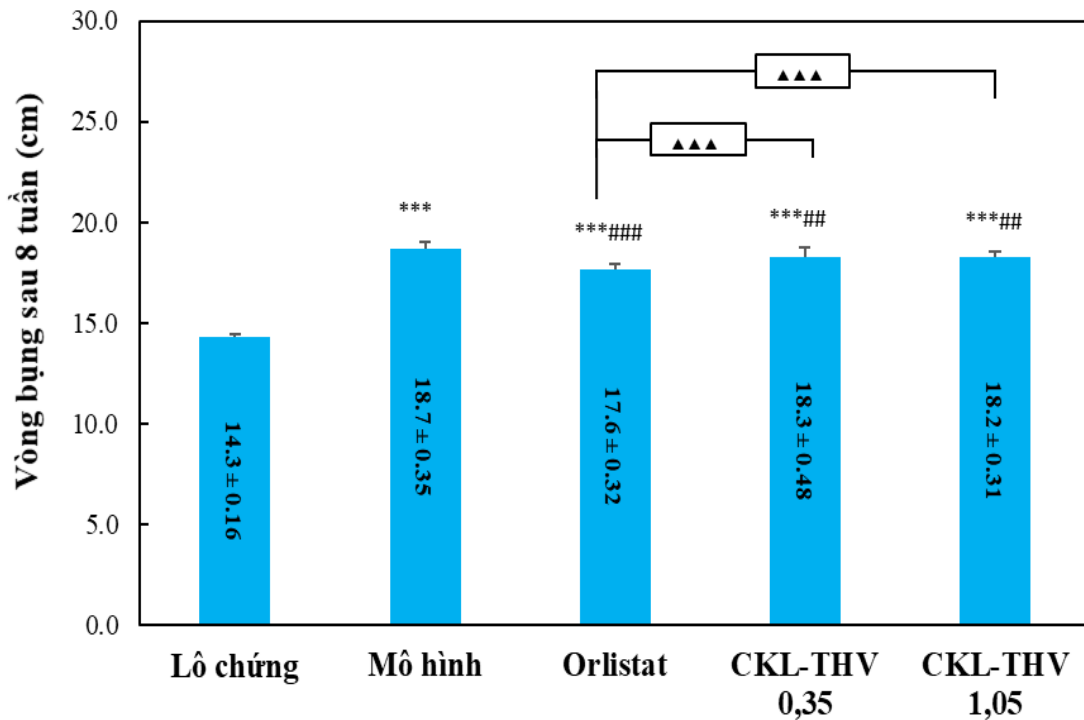
3.2.1.3. Ảnh hưởng của CKL-THV đến vòng bụng chuột béo phì



Biểu đồ 3. 3. Sự thay đổi vòng bụng chuột ở các lô nghiên cứu

Kết quả ở biểu đồ 3.3 cho thấy số đo vòng bụng của chuột ở các lô mô hình và lô chúng đều tăng theo thời gian. Lô mô hình tăng 4,35% vòng bụng chuột so với thời điểm bắt đầu thử nghiệm giai đoạn chính thức. Chỉ có lô chuột sử dụng orlistat làm giảm 1,78% số đo vòng bụng sau 8 tuần nghiên cứu. Các mẫu CKL-THV chưa làm giảm số đo vòng bụng chuột ở các lô nghiên cứu.

Đánh giá riêng số đo vòng bụng của chuột tại thời điểm kết thúc nghiên cứu, thu được kết quả sau:



Biểu đồ 3. 4. Vòng bụng chuột ở các lô nghiên cứu sau 8 tuần

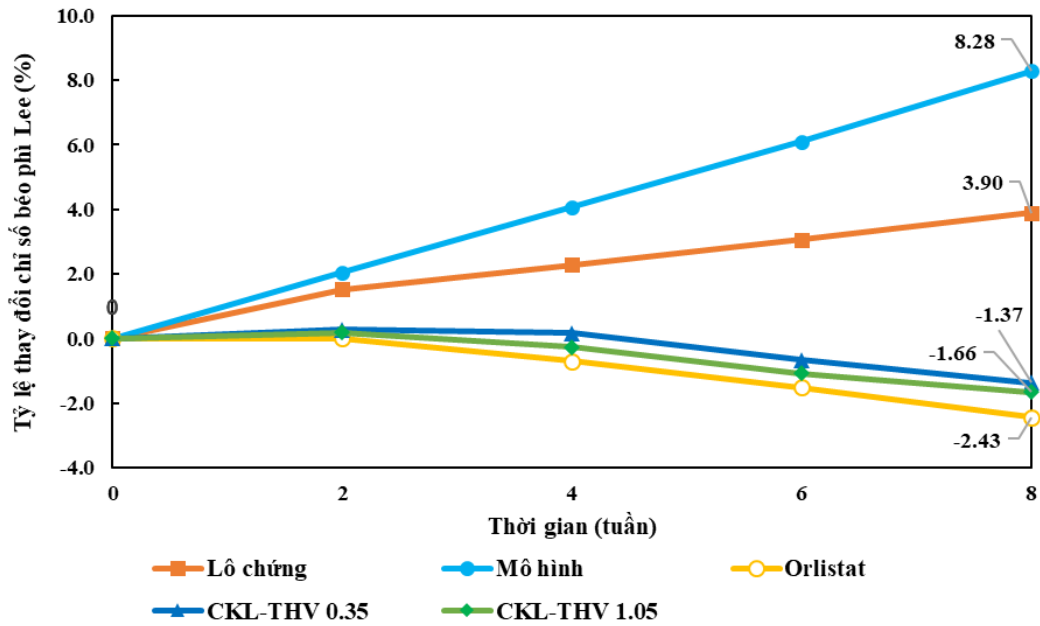
Ghi chú: *p* đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm LSD

Kết quả ở biểu đồ 3.4 cho thấy tại thời điểm kết thúc thử nghiệm, số đo vòng bụng của chuột ở lô chứng nhỏ hơn so với lô mô hình, cũng như các lô sử dụng orlistat hay CKL-THV, sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

Ở lô sử dụng orlistat, vòng bụng chuột giảm có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,001$).

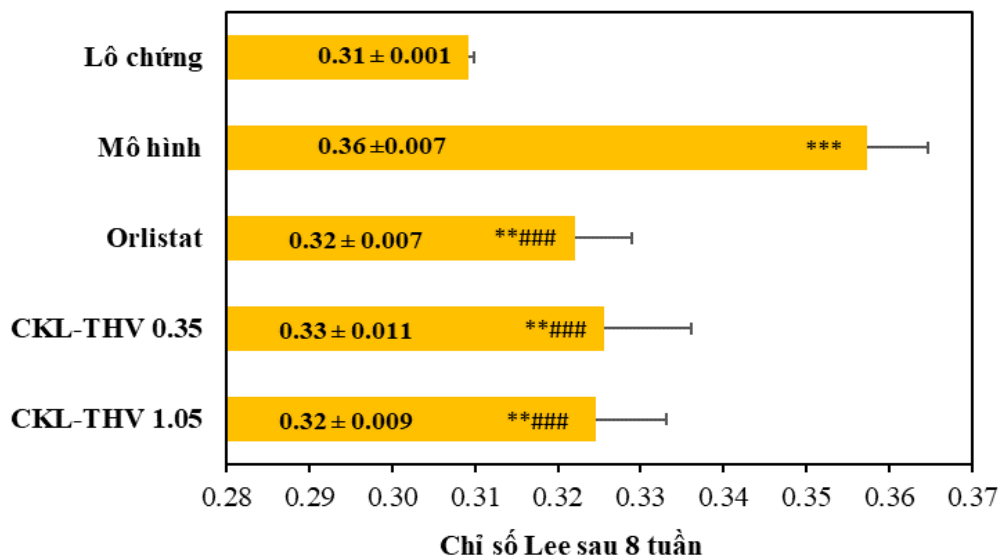
Các lô sử dụng CKL-THV cũng làm giảm số đo vòng bụng chuột so với lô mô hình ($p < 0,01$). Khi so sánh với lô sử dụng orlistat, cả 2 lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h và 1,05 g/kg/24h đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

3.2.1.4. Ảnh hưởng của CKL-THV đến chỉ số béo phì Lee



Biểu đồ 3. 5. Sự thay đổi chỉ số béo phì Lee ở các lô nghiên cứu

Kết quả ở biểu đồ 3.5 cho thấy chỉ số Lee của chuột ở lô chứng và lô mô hình tăng theo thời gian, tỉ lệ tăng lần lượt là 3,9% và 8,28%. Các lô chuột sử dụng orlistat và CKL-THV có xu hướng giảm chỉ số Lee. Sau 8 tuần, chỉ số Lee ở lô chuột sử dụng orlistat giảm 2,43%, các lô sử dụng CKL-THV giảm từ 1,34 đến 1,66%.

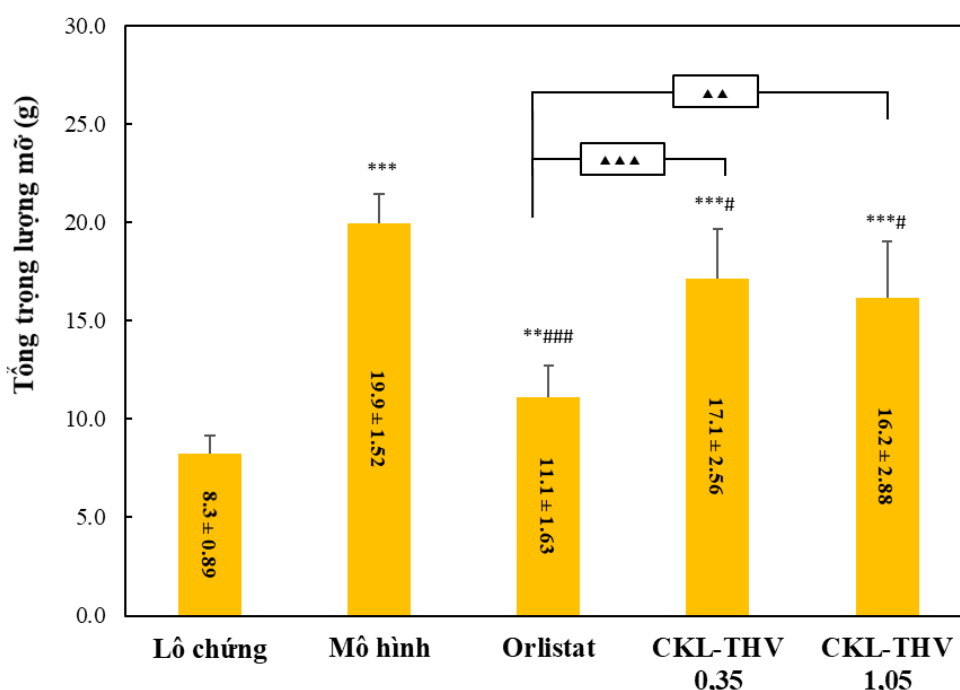


Biểu đồ 3. 6. Chỉ số béo phì Lee ở các lô nghiên cứu sau 8 tuần

Ghi chú: *p* đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm Dunnet T3

Kết quả ở biểu đồ 3.6 cho thấy tại thời điểm kết thúc thử nghiệm, có sự khác biệt về chỉ số béo phì Lee giữa lô chứng so với lô mô hình ($p < 0,001$) và so với các lô còn lại ($p < 0,01$). Chỉ số béo phì Lee ở các lô sử dụng orlistat và CKL-THV đều giảm so với lô mô hình ($p < 0,001$). Tuy nhiên không có sự khác biệt mang ý nghĩa khi so sánh giữa các lô sử dụng orlistat và CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h và 1,05 g/kg/24h.

3.2.1.5. Ảnh hưởng của CKL-THV đến trọng lượng mỡ và chỉ số mỡ



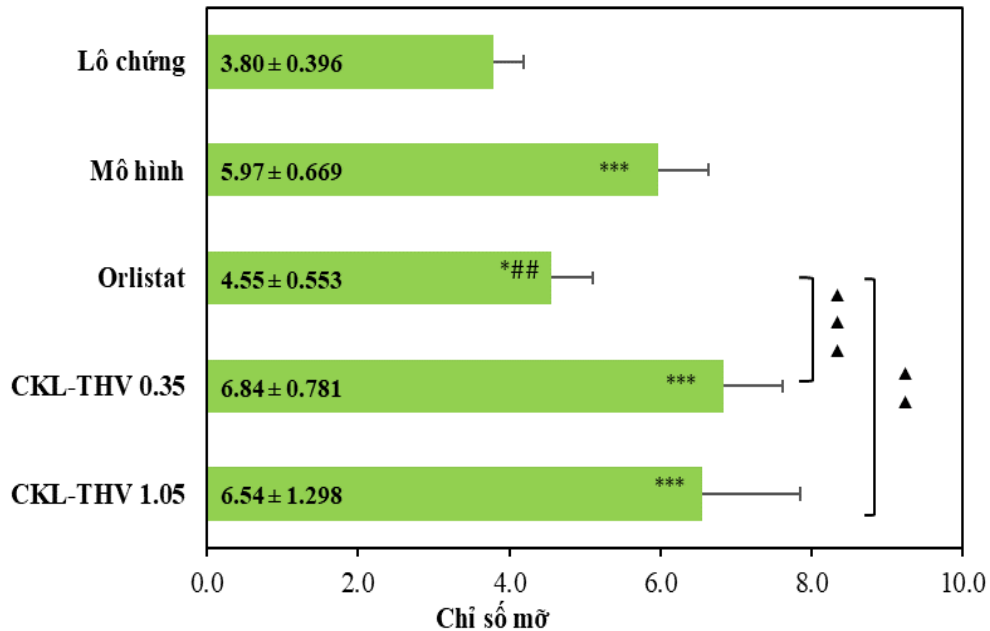
Biểu đồ 3. 7. Trọng lượng mỡ ở các lô nghiên cứu sau 8 tuần

Ghi chú: p đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm Dunnet T3

Kết quả ở biểu đồ 3.7 cho thấy so với lô chứng, trọng lượng mỡ ở các lô nghiên cứu đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. So với lô mô hình, lô sử dụng orlistat làm giảm đáng kể trọng lượng mỡ ($p < 0,001$).

Các lô sử dụng CKL-THV cũng làm giảm trọng lượng mỡ so với lô mô hình ($p < 0,05$). So sánh với lô sử dụng orlistat, có sự khác biệt về tổng trọng lượng mỡ chuột với mức ý nghĩa $p < 0,001$ so với lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h, và mức $p < 0,01$ so với lô sử dụng CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h.

Dựa vào tổng trọng lượng mỡ và trọng lượng của chuột tại thời điểm kết thúc thí nghiệm, tính chỉ số mỡ cơ thể chuột, sau đó so sánh chỉ số mỡ giữa các lô nghiên cứu với nhau. Kết quả cụ thể như sau:



Biểu đồ 3. 8. Chỉ số mỡ ở các lô nghiên cứu sau 8 tuần

Ghi chú: *p* đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm Dunnett T3

Kết quả ở biểu đồ 3.8 cho thấy ở lô mô hình có sự tăng rõ rệt chỉ số mỡ của cơ thể so với lô chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

Ở lô sử dụng orlistat, chỉ số mỡ cơ thể giảm so với lô mô hình ($p < 0,001$) nhưng vẫn tăng so với lô chứng ($p < 0,01$).

Các lô sử dụng CKL-THV có sự khác biệt về tỉ trọng mỡ so với lô chứng ($p < 0,001$). Tuy nhiên, so với lô mô hình, chỉ số mỡ vẫn tăng cao, chưa có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$). Có sự khác biệt có ý nghĩa về chỉ số mỡ giữa lô sử dụng orlistat so với lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h ($p < 0,001$), và so với lô sử dụng CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h.

3.2.1.6. Ảnh hưởng của CKL-THV đến trọng lượng các cơ quan

Bảng 3. 13. Trọng lượng tuyệt đối các tạng chuột ở các lô nghiên cứu

Lô	Trọng lượng các tạng ($\bar{X} \pm SD$)			
	Tim (g)	Gan (g)	Thận (g)	Lách (g)
Lô chứng (1)	0,61 $\pm$ 0,054	5,22 $\pm$ 0,908	1,34 $\pm$ 0,264	0,53 $\pm$ 0,092
Mô hình (2)	1,03 $\pm$ 0,079 ***	9,45 $\pm$ 1,280 ***	2,29 $\pm$ 0,178 ***	0,95 $\pm$ 0,111 ***
Orlistat (3)	0,64 $\pm$ 0,073 ###	5,57 $\pm$ 0,896 ###	1,33 $\pm$ 0,160 ###	0,52 $\pm$ 0,075 ###
CKL-THV 0,35 (4)	0,75 $\pm$ 0,048 ***###▲▲▲	6,68 $\pm$ 0,771 **###▲	1,65 $\pm$ 0,274 *###▲▲	0,64 $\pm$ 0,216 ###▲
CKL-THV 1,05 (5)	0,72 $\pm$ 0,043 ***###▲▲	5,91 $\pm$ 1,091 ###	1,43 $\pm$ 0,372 ###	0,58 $\pm$ 0,106 ###

Ghi chú: giá trị p đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm LSD

p^* : so với lô chứng ; $p^\#$: so với lô mô hình ; p^Δ : so với lô orlistat

Kết quả ở bảng 3.13 cho thấy so với lô chứng, trọng lượng các tạng tim, gan, thận, lách ở lô mô hình đều tăng cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

Ở lô sử dụng orlistat, trọng lượng các tạng tim, gan, thận, lách giảm so với lô mô hình ($p < 0,001$) và tương đương so với lô chứng ($p > 0,05$). Các lô sử dụng CKL-THV có trọng lượng các tạng tim, gan, thận, lách đều giảm so với lô mô hình ($p < 0,001$).

Lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h có sự khác biệt so với lô chứng về trọng lượng tim ($p < 0,001$), gan ($p < 0,01$), thận ($p < 0,05$), còn trọng lượng lách thì tương đương ($p > 0,05$). Khi so sánh lô này với lô sử dụng orlistat, cũng nhận thấy có sự khác biệt về trọng lượng tim ($p < 0,001$), gan ($p < 0,05$), thận ($p < 0,01$), lách ($p < 0,05$).

Lô sử dụng CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h chỉ có sự khác biệt về trọng lượng tim so với lô chứng ($p < 0,01$) và so với lô sử dụng orlistat ($p < 0,01$). Còn trọng lượng các tạng gan, thận, lách so với lô chứng và lô sử dụng orlistat là tương đương ($p > 0,05$).

Bảng 3. 14. Trọng lượng tương đối các tạng chuột ở các lô nghiên cứu

Lô	Trọng lượng tương đối các tạng ($\bar{X} \pm SD$)			
	Tim (%)	Gan (%)	Thận (%)	Lách (%)
Lô chứng (1)	$0,28 \pm 0,024$	$2,40 \pm 0,410$	$0,62 \pm 0,124$	$0,24 \pm 0,042$
Mô hình (2)	$0,31 \pm 0,028$ *	$2,83 \pm 0,457$ *	$0,69 \pm 0,090$	$0,29 \pm 0,047$
Orlistat (3)	$0,26 \pm 0,023$ ###	$2,31 \pm 0,458$ #	$0,55 \pm 0,083$ #	$0,21 \pm 0,037$ ##
CKL-THV 0,35 (4)	$0,30 \pm 0,032$ ▲▲	$2,68 \pm 0,313$	$0,66 \pm 0,111$ ▲	$0,26 \pm 0,097$
CKL-THV 1,05 (5)	$0,29 \pm 0,024$ ▲	$2,39 \pm 0,508$ #	$0,58 \pm 0,167$	$0,23 \pm 0,045$

Ghi chú: giá trị p đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm LSD

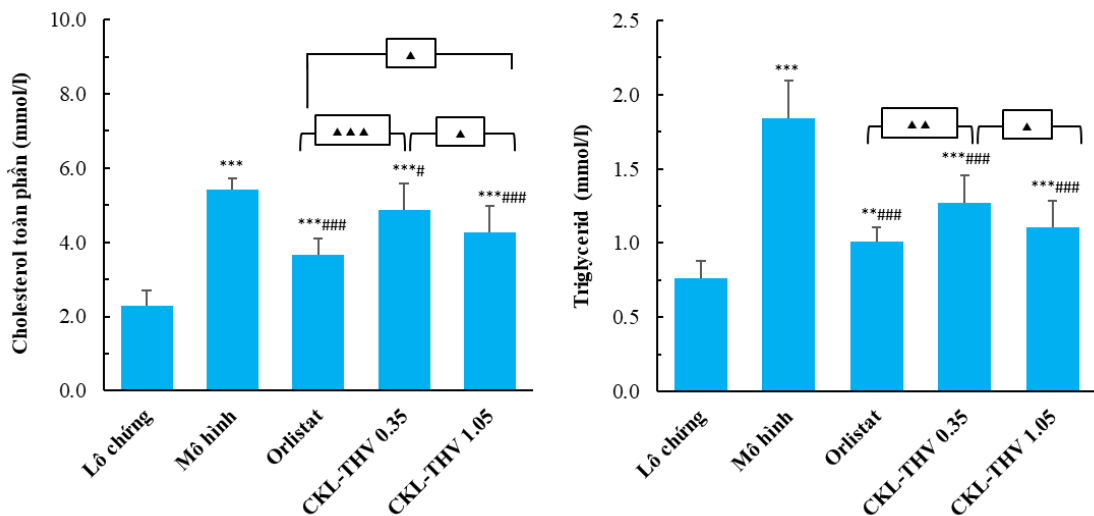
p^* : so với lô chứng ; $p^\#$: so với lô mô hình ; p^Δ : so với lô orlistat

Kết quả ở bảng 3.15 cho thấy so với lô chứng, chỉ có trọng lượng tương đối của tim và gan ở lô mô hình tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), còn trọng lượng tương đối của thận và lách đều không thay đổi có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Khi so sánh với lô mô hình, lô sử dụng orlistat giảm trọng lượng tương đối các tạng tim ($p < 0,001$), gan ($p < 0,05$), thận ($p < 0,05$), lách ($p < 0,01$).

Các lô sử dụng CKL-THV không có sự khác biệt về trọng lượng tương đối các tạng so với lô chứng ($p > 0,05$). Khi so sánh với lô mô hình thì chỉ có lô sử dụng CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h có sự khác biệt về trọng lượng tương đối của tạng gan ($p < 0,05$), còn các tạng khác không thay đổi.

Tuy nhiên, khi so sánh trọng lượng tương đối các tạng giữa các lô sử dụng CKL-THV và lô sử dụng orlistat thì sự khác biệt lại có ý nghĩa thống kê. Cụ thể, lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h có sự khác biệt so với lô sử dụng orlistat về trọng lượng tương đối của tim ($p<0,01$) và thận ($p<0,05$). Lô sử dụng CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h chỉ có sự khác biệt so với lô sử dụng orlistat về trọng lượng tương đối của tim ($p<0,05$).

3.2.1.7. Ảnh hưởng của CKL-THV đến các chỉ số lipid máu



Biểu đồ 3. 9. Nồng độ cholesterol toàn phần và triglycerid sau 8 tuần

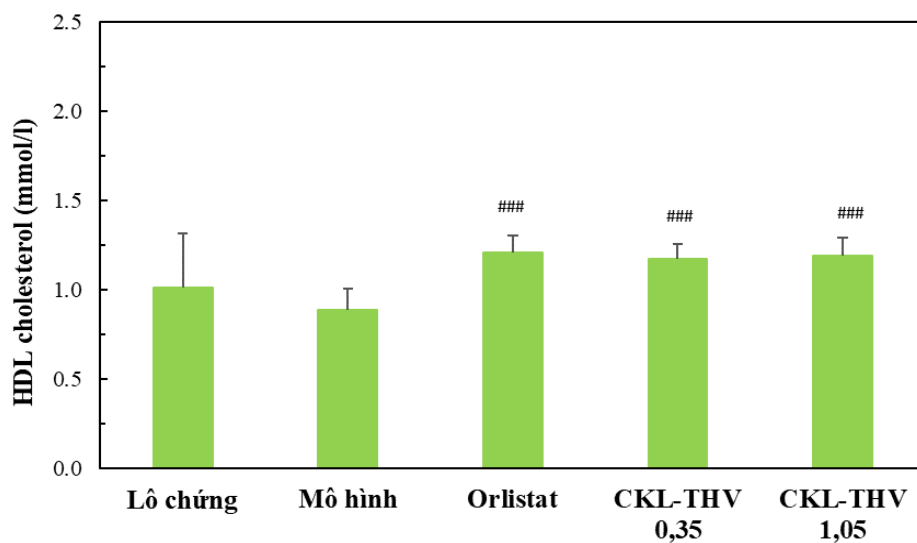
Ghi chú: Giá trị p đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm LSD

Kết quả ở biểu đồ 3.9 cho thấy tại thời điểm kết thúc thử nghiệm, nồng độ cholesterol toàn phần và triglycerid máu chuột ở lô mô hình tăng cao hơn so với lô chứng ($p<0,001$). Ở lô sử dụng orlistat, nồng độ cholesterol toàn phần và triglycerid máu giảm mạnh có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p<0,001$), và gần tương đương với lô chứng ($p>0,05$).

Nồng độ cholesterol toàn phần và triglycerid máu ở cả 2 lô sử dụng CKL-THV đều giảm so với lô mô hình ($p<0,001$) nhưng vẫn tăng so với lô chứng ($p<0,001$). Lô sử dụng CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h làm giảm nồng độ cholesterol toàn phần và triglycerid máu nhiều hơn so với lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h ($p<0,05$).

Có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê cả về nồng độ cholesterol toàn phần và triglycerid máu của lô sử dụng orlistat so với các lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h với mức ý nghĩa thống kê lần lượt là $p < 0,001$ và $p < 0,01$.

Lô sử dụng CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h có sự khác biệt với lô sử dụng orlistat về chỉ số cholesterol toàn phần ($p < 0,05$), nhưng lại tương đương về chỉ số triglycerid ($p > 0,05$). Khi so sánh giữa 2 lô sử dụng CKL-THV, nhận thấy có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) về cả chỉ số cholesterol toàn phần và triglycerid.

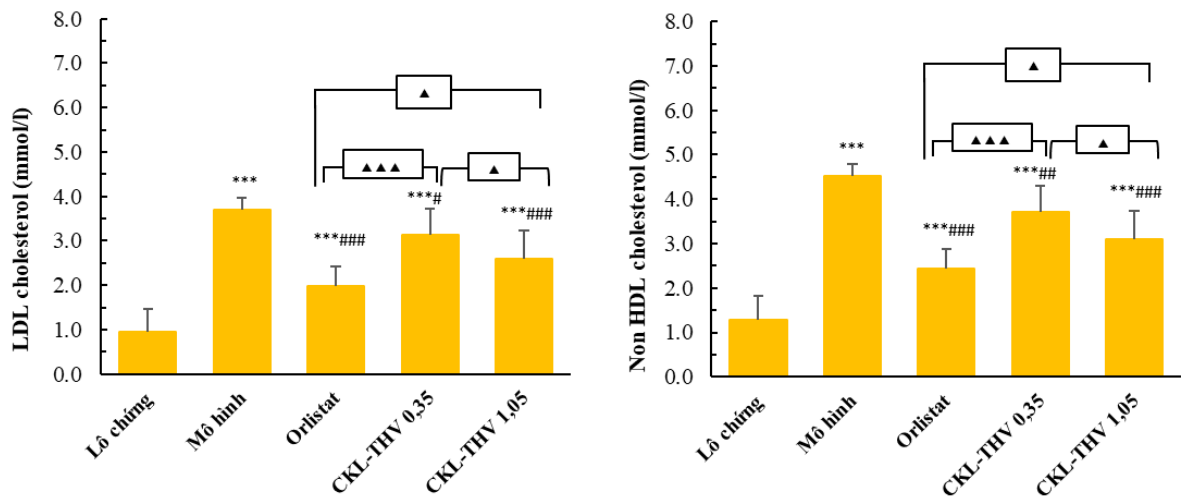


Biểu đồ 3. 10. Nồng độ HDL-C ở các lô nghiên cứu sau 8 tuần

Ghi chú: *p* đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm Dunnet T3

Kết quả ở biểu đồ 3.10 cho thấy sau 8 tuần, nồng độ HDL-C máu chuột ở lô mô hình có giảm nhưng chưa có sự khác biệt so với lô chứng ($p > 0,05$).

Lô sử dụng orlistat và các lô sử dụng CKL-THV đều có nồng độ HDL cholesterol tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,001$), và tương đương với lô chứng ($p > 0,05$). Không có sự khác biệt về chỉ số HDL cholesterol giữa các lô sử dụng CKL-THV và lô sử dụng orlistat.



Biểu đồ 3. 11. Nồng độ LDL-C và non HDL-C sau 8 tuần

Ghi chú: Giá trị p đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm LSD

Kết quả ở biểu đồ 3.11 cho thấy tại thời điểm kết thúc thử nghiệm, cả nồng độ LDL-C và non HDL-C máu chuột ở lô mô hình đều tăng cao hơn so với lô chứng ($p < 0,001$). Ở lô sử dụng orlistat, nồng độ LDL-C và non HDL-C giảm có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,001$), và gần tương đương với lô chứng ($p > 0,05$).

Các lô sử dụng CKL-THV đều có nồng độ LDL-C và non HDL-C tăng so với lô chứng ($p < 0,001$) và giảm so với lô mô hình có ý nghĩa thống kê. Lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h làm giảm cả 2 chỉ số LDL-C và non HDL-C so với lô mô hình với mức ý nghĩa lần lượt là $p < 0,05$ và $p < 0,01$. Lô sử dụng CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h làm giảm cả 2 chỉ số LDL cholesterol và non HDL cholesterol so với lô mô hình với mức ý nghĩa $p < 0,001$.

Có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê cả về nồng độ LDL cholesterol và non HDL cholesterol giữa lô sử dụng orlistat so với các lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h và 1,05 g/kg/24h với mức ý nghĩa thống kê lần lượt là $p < 0,001$ và $p < 0,05$. Lô sử dụng CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h làm giảm nồng độ LDL cholesterol và non HDL cholesterol nhiều hơn so với lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h ($p < 0,05$).

3.2.2. Nghiên cứu tác dụng hạ lipid máu in vivo

3.2.2.1. Tác dụng hạ lipid máu trên mô hình tăng lipid máu nội sinh

Bảng 3. 15. Kết quả gây mô hình tăng lipid máu nội sinh bằng P407

Chỉ số lipid (n = 10, $\bar{x} \pm SD$)	Lô chứng (1) (mmol/l)	Lô mô hình (2) (mmol/l)	% thay đổi so với lô (1)	P₂₋₁
Cholesterol toàn phần	2,20 ± 0,35	2,76 ± 0,42	↑ 25,5 %	<0,01
Triglycerid	0,85 ± 0,13	1,04 ± 0,14	↑ 22,4 %	<0,01
HDL-C	0,60 ± 0,05	0,57 ± 0,09	↓ 5,0 %	>0,05
LDL-C	1,21 ± 0,35	1,72 ± 0,33	↑ 42,1 %	<0,01
Non HDL-C	1,60 ± 0,34	2,19 ± 0,37	↑ 36,8 %	<0,01

Ghi chú: giá trị p đánh giá bằng kiểm định Independent Samples T-test

Kết quả ở bảng 3.15 cho thấy: Ở lô mô hình, các chỉ số cholesterol toàn phần, triglycerid, LDL cholesterol và non HDL cholesterol đều tăng so với lô chứng. Cụ thể, chỉ số TC tăng 25,5%, TG tăng 22,4%, LDL tăng 42,1%, non HDL tăng 36,8%, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Chỉ số HDL-C có giảm 5,0% so với lô chứng, tuy nhiên không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của CKL-THV lên các chỉ số lipid máu chuột

Bảng 3. 16. Ảnh hưởng của CKL-THV lên các chỉ số lipid máu chuột

Chỉ số (n = 10, $\bar{x} \pm SD$)		Lô mô hình (2)	Lô Ator (3)	Lô CKL- THV 0,6 (4)	Lô CKL- THV 1,8 (5)
TC	Chỉ số (mmol/l)	2,76 ± 0,42	2,12 ± 0,31 ##	2,03 ± 0,37 ##	1,98 ± 0,55 ##
	% thay đổi so với lô (2)	-	↓ 23,2 %	↓ 26,5 %	↓ 28,3 %
TG	Chỉ số (mmol/l)	1,04 ± 0,14	0,84 ± 0,10 ##	0,82 ± 0,09 ##	0,86 ± 0,09 ##
	% thay đổi so với lô (2)	-	↓ 19,2 %	↓ 21,2 %	↓ 17,3 %

Chỉ số ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)		Lô mô hình (2)	Lô Ator (3)	Lô CKL- THV 0,6 (4)	Lô CKL- THV 1,8 (5)
HDL	Chỉ số (mmol/l)	0,57 $\pm$ 0,09	0,56 $\pm$ 0,08	0,53 $\pm$ 0,11	0,53 $\pm$ 0,11
	% thay đổi so với lô (2)	-	↓ 1,8 %	↓ 7,0 %	↓ 7,0 %
LDL	Chỉ số (mmol/l)	1,72 $\pm$ 0,33	1,17 $\pm$ 0,30 ##	1,13 $\pm$ 0,30 ##	1,06 $\pm$ 0,46 ##
	% thay đổi so với lô (2)	-	↓ 32,0 %	↓ 34,3 %	↓ 38,4 %
Non HDL	Chỉ số (mmol/l)	2,19 $\pm$ 0,37	1,56 $\pm$ 0,29 ###	1,51 $\pm$ 0,31 ###	1,45 $\pm$ 0,47 ##
	% thay đổi so với lô (2)	-	↓ 28,8 %	↓ 31,1 %	↓ 33,8 %

Ghi chú: giá trị p đánh giá bằng kiểm định Independent Samples T-test

Kết quả ở bảng 3.16 cho thấy: Lô chuột sử dụng atorvastatin liều 100 mg/kg/24h có chỉ số lipid máu chuột giảm rõ rệt so với lô mô hình ($p < 0,01$). Cụ thể, chỉ số TC giảm 23,2%, TG giảm 19,2%, LDL giảm 32,0%, non HDL-C giảm 28,8%.

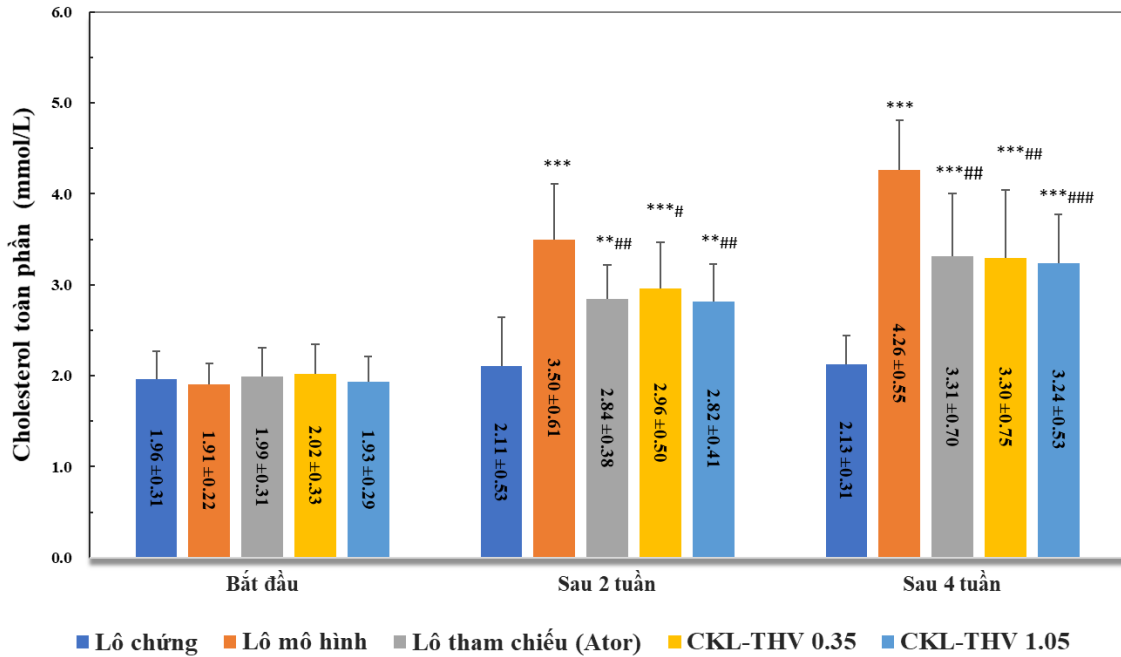
Các lô sử dụng CKL-THV có các chỉ số TC, TG, LDL và non HDL máu chuột đều giảm so với lô mô hình, có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Cụ thể, ở lô sử dụng CKL-THV liều 0,6g/kg thể trọng, chuột có chỉ số TC giảm 26,5%, TG giảm 21,2%, LDL giảm 34,3%, non HDL-C giảm 31,1% so với lô mô hình. Ở lô sử dụng CKL-THV liều 1,8g/kg thể trọng, chuột có chỉ số TC giảm 28,3%, TG giảm 17,3%, LDL giảm 38,4%, non HDL-C giảm 33,8% so với lô mô hình.

Chỉ số HDL-C ở các lô sử dụng CKL-THV có giảm so với lô mô hình nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Không có sự khác biệt về các chỉ

số lipid máu giữa các lô chuột uống atorvastatin, CKL-THV liều 0,6g/kg/24h và CKL-THV liều 1,8 g/kg/24h ($p>0,05$).

3.2.2.2. Tác dụng hạ lipid máu trên mô hình tăng lipid máu ngoại sinh

Ảnh hưởng của CKL-THV lên nồng độ cholesterol toàn phần



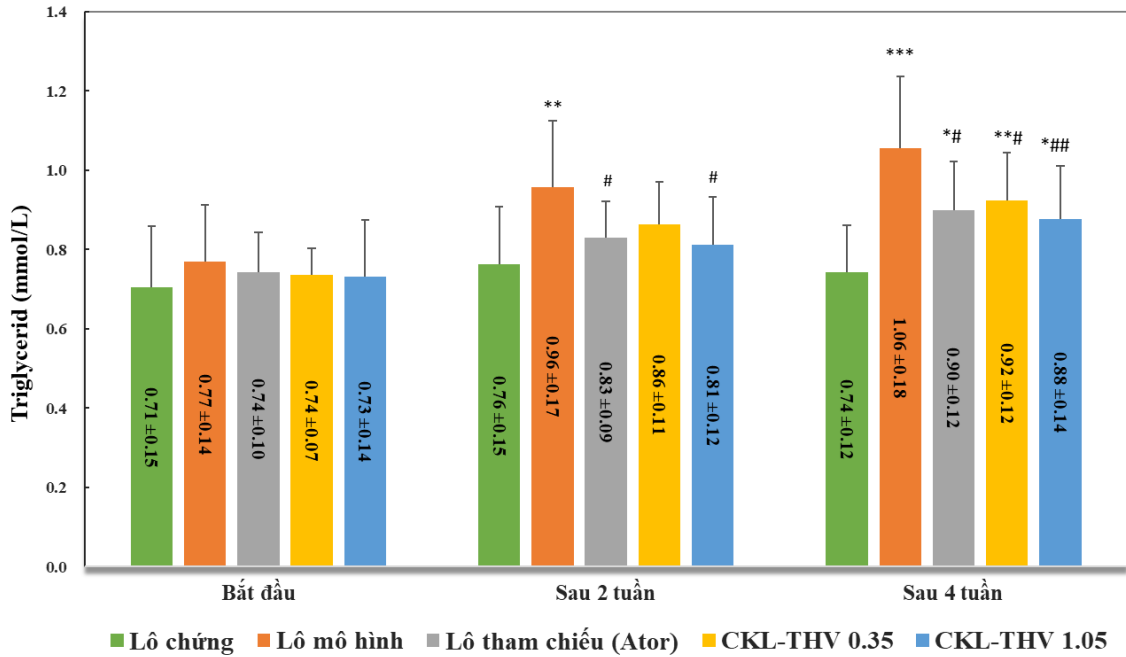
Biểu đồ 3. 12. Nồng độ cholesterol toàn phần ở các lô theo thời gian

Ghi chú: giá trị p đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm LSD

Kết quả ở biểu đồ 3.12 cho thấy: Tại thời điểm sau 2 tuần và sau 4 tuần sử dụng hỗn hợp dầu cholesterol, nồng độ cholesterol toàn phần máu chuột cống trắng ở tất cả các lô tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p<0,01$).

Cả CKL-THV và atorvastatin đều có tác dụng làm giảm cholesterol toàn phần máu chuột trong các lô tham chiếu và các lô trị so với lô mô hình. Sự thay đổi có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$ tại thời điểm sau 2 tuần, và $p<0,01$ sau 4 tuần. Không có sự khác biệt về nồng độ TC giữa các lô dùng atorvastatin và CKL-THV trong suốt thời gian nghiên cứu ($p>0,05$).

Ảnh hưởng của CKL-THV lên nồng độ triglycerid máu chuột



Biểu đồ 3. 13. Nồng độ triglycerid ở các lô nghiên cứu theo thời gian

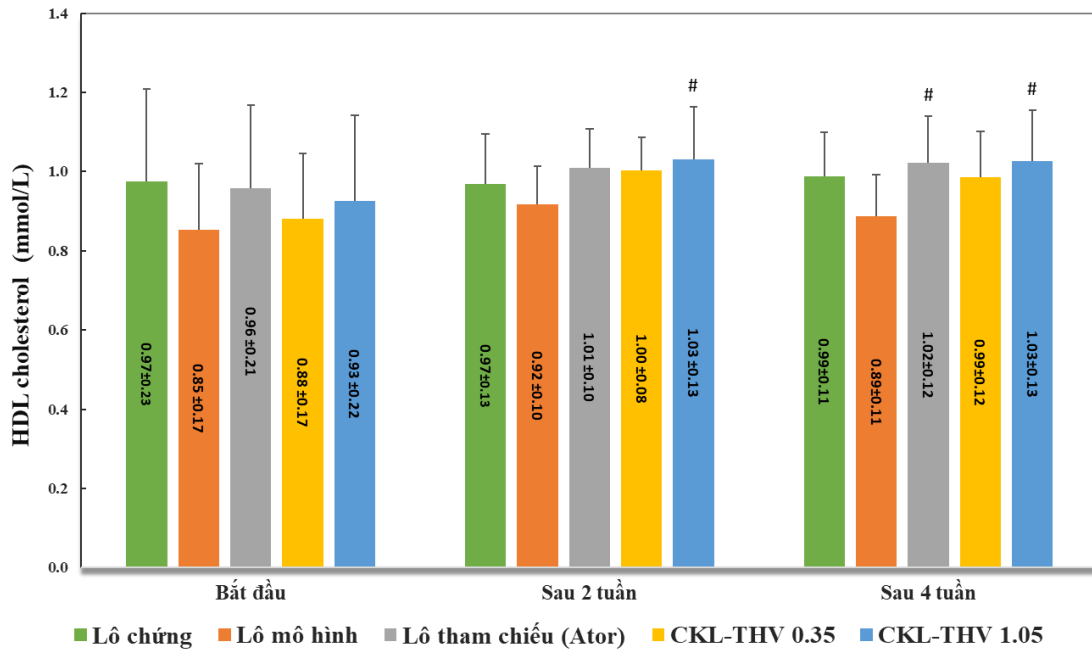
Ghi chú: giá trị p đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm LSD, so sánh nồng độ triglycerid giữa các lô chuột.

Kết quả ở biểu đồ 3.13 cho thấy:

So với lô chứng, nồng độ triglycerid máu chuột ở lô mô hình bắt đầu tăng sau 2 tuần sử dụng hỗn hợp dầu cholesterol ($p < 0,01$), tăng rõ rệt sau 4 tuần ($p < 0,001$). Các lô sử dụng atorvastatin và CKL-THV phải sau 4 tuần sử dụng hỗn hợp dầu cholesterol, chỉ số triglycerid mới tăng có ý nghĩa so với lô chứng ($p < 0,05$).

Sau 2 tuần sử dụng hỗn hợp dầu cholesterol, so với lô mô hình, nồng độ triglycerid ở lô tham chiếu và lô CKL-THV liều cao giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Sau 4 tuần, cả lô CKL-THV liều thấp cũng giảm chỉ số triglycerid so với lô mô hình ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt về nồng độ TG giữa các lô dùng atorvastatin và CKL-THV trong suốt thời gian nghiên cứu ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của CKL-THV lên nồng độ HDL-C máu chuột



Biểu đồ 3. 14. Nồng độ HDL-C ở các lô nghiên cứu theo thời gian

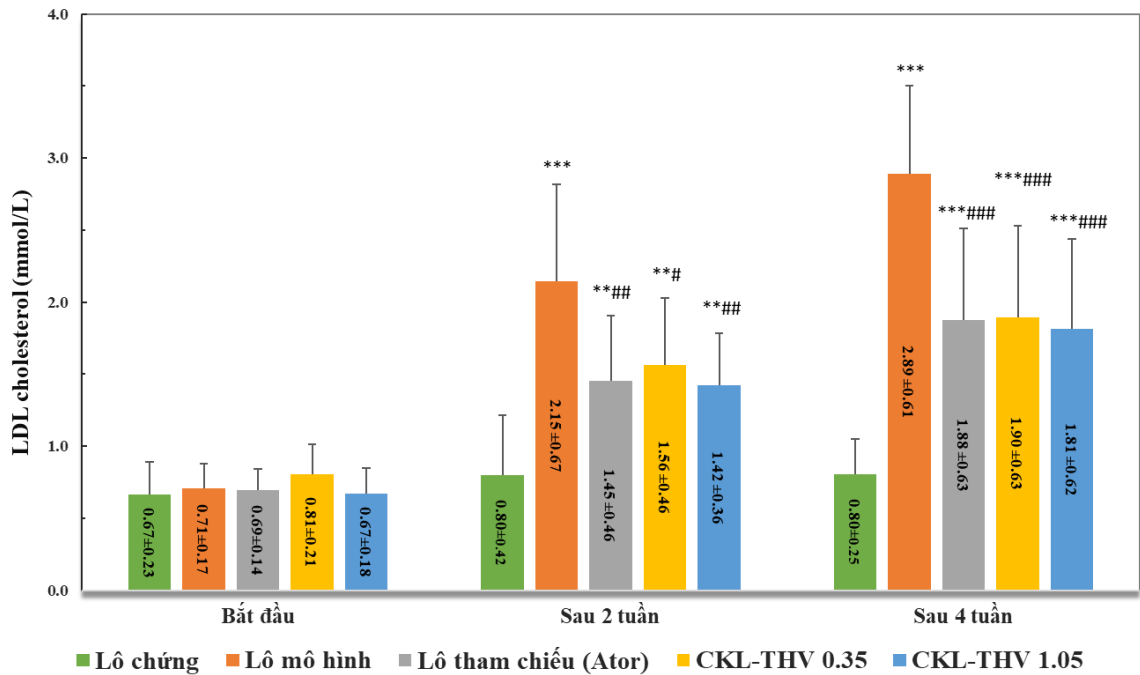
Ghi chú: giá trị *p* đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm LSD

Kết quả ở biểu đồ 3.14 cho thấy:

So với lô chứng, nồng độ HDL-C máu chuột ở tất cả các lô nghiên cứu đều không có thay đổi mang ý nghĩa thống kê trong suốt thời gian nghiên cứu ($p > 0,05$). Tuy nhiên, so với lô mô hình, nồng độ HDL-C tăng ở lô CKL-THV liều cao ngay từ sau 2 tuần sử dụng hỗn hợp dầu cholesterol ($p < 0,05$).

Atorvastatin làm tăng nồng độ HDL-C của chuột ở lô tham chiếu sau 4 tuần sử dụng hỗn hợp dầu cholesterol ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt về nồng độ HDL-C giữa các lô dùng atorvastatin và CKL-THV trong suốt thời gian nghiên cứu ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của CKL-THV lên nồng độ LDL-C máu chuột



Biểu đồ 3. 15. Nồng độ LDL-C ở các lô nghiên cứu theo thời gian

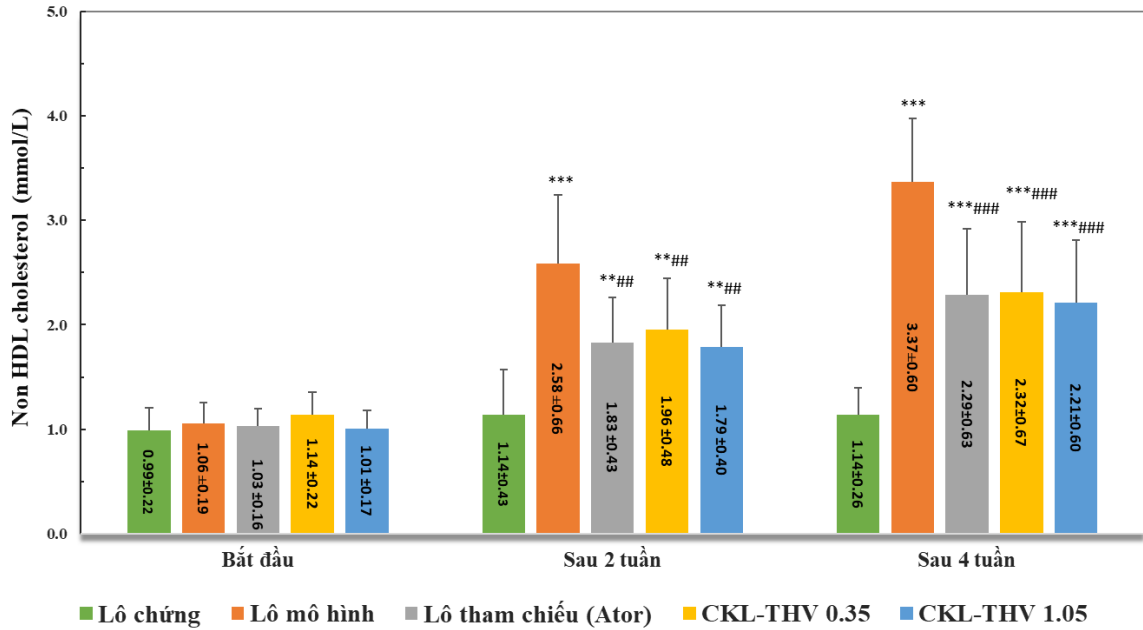
Ghi chú: giá trị p đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm LSD, so sánh nồng độ LDL cholesterol giữa các lô chuột.

Kết quả ở biểu đồ 3.15 cho thấy:

Sau khi sử dụng hỗn hợp dầu cholesterol, nồng độ LDL-C máu chuột ở tất cả các lô đều tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sau 2 tuần ($p < 0,01$). Mức ý nghĩa đạt $p < 0,001$ sau 4 tuần.

Cả CKL-THV và atorvastatin đều có tác dụng làm giảm LDL-C máu chuột trong lô tham chiếu và các lô trị so với lô mô hình. Sự thay đổi có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ tại thời điểm sau 2 tuần, và $p < 0,001$ sau 4 tuần. Không có sự khác biệt về nồng độ LDL-C giữa các lô dùng atorvastatin và CKL-THV trong suốt thời gian nghiên cứu ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của CKL-THV lên nồng độ non HDL-C máu chuột



Biểu đồ 3. 16. Nồng độ non HDL-C ở các lô nghiên cứu theo thời gian

Ghi chú: giá trị *p* đánh giá bằng kiểm định One-way ANOVA, hậu kiểm LSD

Kết quả ở biểu đồ 3.16 cho thấy: Sau khi sử dụng hỗn hợp dầu cholesterol, nồng độ non HDL-C ở tất cả các lô đều tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sau 2 tuần ($p < 0,01$). Mức ý nghĩa đạt $p < 0,001$ sau 4 tuần.

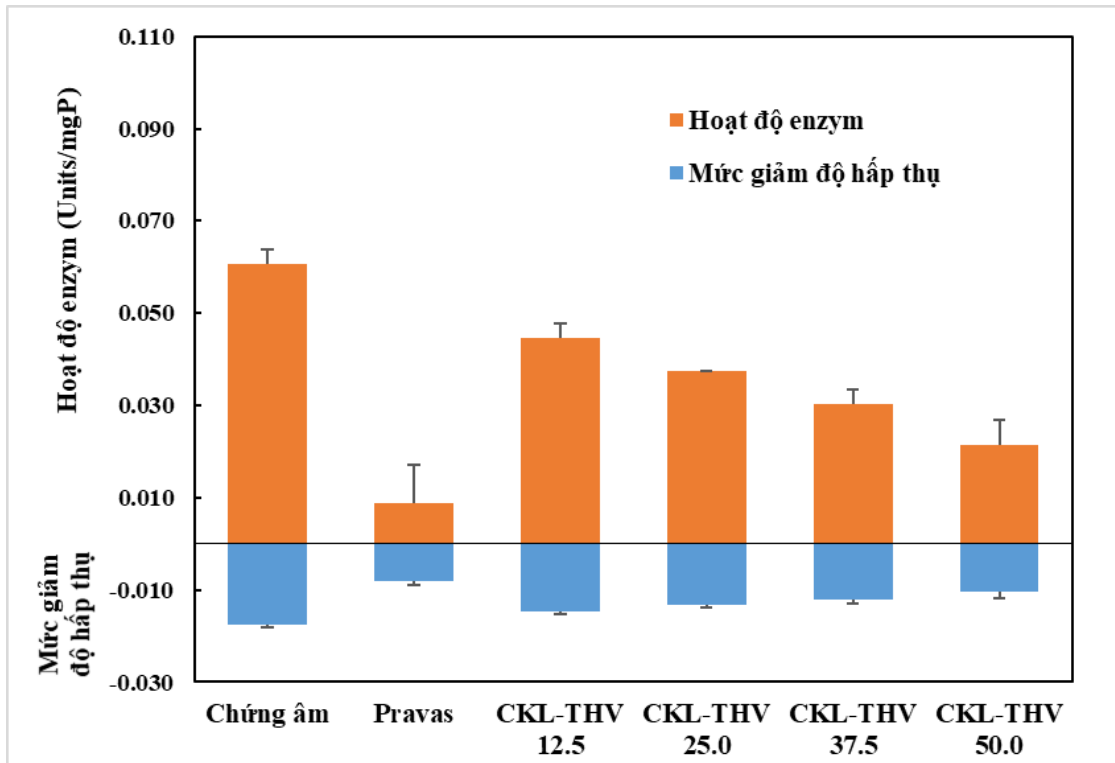
Cả CKL-THV và atorvastatin đều có tác dụng làm giảm non HDL-C máu chuột trong lô tham chiếu và các lô trị so với lô mô hình. Sự thay đổi có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$ tại thời điểm sau 2 tuần, và $p < 0,001$ sau 4 tuần.

Không có sự khác biệt về nồng độ non HDL-C giữa các lô dùng atorvastatin và CKL-THV trong suốt thời gian nghiên cứu ($p > 0,05$).

3.2.3. Nghiên cứu cơ chế tác dụng trên in vitro

3.2.3.1. Cơ chế ức chế enzym HMG CoA reductase

Sử dụng máy quang phổ UV-VIS để đo độ hấp thụ của NADPH theo thời gian mỗi 10 giây trong 5 phút, tại bước sóng 340 nm. Từ sự giảm độ hấp thụ của NADPH, xác định được hoạt tính ức chế enzym HMG-CoA reductase. Kết quả cụ thể như sau:



Biểu đồ 3. 17. Hoạt độ enzym HMG-CoA reductase và mức giảm độ hấp thụ của dung dịch phản ứng trong thử nghiệm *in vitro*

Ghi chú: Pravas: Dung dịch pravastatin chuẩn trong bộ kit, CKL-THV 50.0: Dung dịch CKL-THV nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$; CKL-THV37.5: Dung dịch CKL-THV nồng độ 37,5 $\mu\text{g/ml}$; CKL-THV 25.0: Dung dịch CKL-THV nồng độ 25 $\mu\text{g/ml}$; CKL-THV 12.5: Dung dịch CKL-THV nồng độ 12,5 $\mu\text{g/ml}$

Kết quả ở biểu đồ 3.17 cho thấy: Trong các dung dịch phản ứng, dung dịch chứng âm cho mức giảm độ hấp thụ NADPH là nhiều nhất. Dung dịch chứng dương (pravastatin) có mức giảm độ hấp thụ NADPH thấp nhất. Các dung dịch mẫu thử CKL-THV ở các nồng độ 12,5 $\mu\text{g/ml}$; 25 $\mu\text{g/ml}$; 37,5 $\mu\text{g/ml}$ và 50 $\mu\text{g/ml}$ cho mức giảm độ hấp thụ NADPH ít dần.

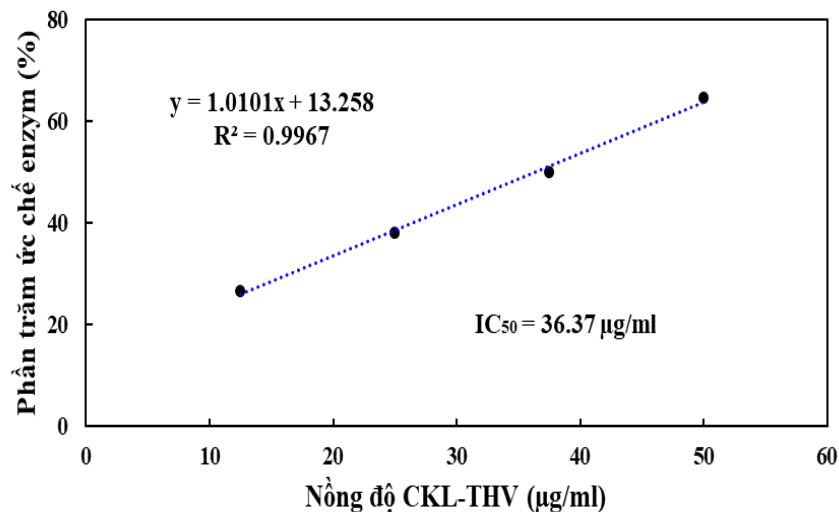
Hoạt độ enzym HMG-CoA reductase trong dung dịch chứng âm là mạnh nhất, chứng dương (pravastatin) là yếu nhất. Trong các dung dịch thử, nếu tăng nồng độ CKL-THV từ 12,5 đến 50 $\mu\text{g/ml}$, hoạt độ enzym HMG-CoA reductase giảm dần.

Bảng 3. 17. Phần trăm ức chế enzym HMG-CoA reductase của CKL-THV

Dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$)	Phần trăm ức chế (%) ($n = 3, \bar{x} \pm \text{SD}$)
CKL-THV 12,5	$26,5 \pm 1,31$
CKL-THV 25	$38,1 \pm 3,06$
CKL-THV 37,5	$50,0 \pm 4,55$
CKL-THV 50	$64,6 \pm 9,26$
Pravastatin	$85,6 \pm 12,92$

Kết quả ở bảng 3.17 cho thấy: Khi tăng nồng độ CKL-THV từ 12,5 $\mu\text{g/ml}$ lên 50 $\mu\text{g/ml}$, phần trăm ức chế enzym HMG-CoA reductase tăng dần từ 26,5% lên 64,6%. Dung dịch chứng dương pravastatin cho phần trăm ức chế enzym HMG-CoA reductase cao hơn các dung dịch CKL-THV (85,6%).

Dựa vào kết quả trên, tiến hành vẽ đồ thị hồi quy tuyến tính $y = ax + b$ đi qua tất cả các điểm với y là giá trị % ức chế, x là giá trị nồng độ CKL-THV. Sau đó tính nồng độ ức chế 50% hoạt tính enzym (%I), thu được kết quả sau:



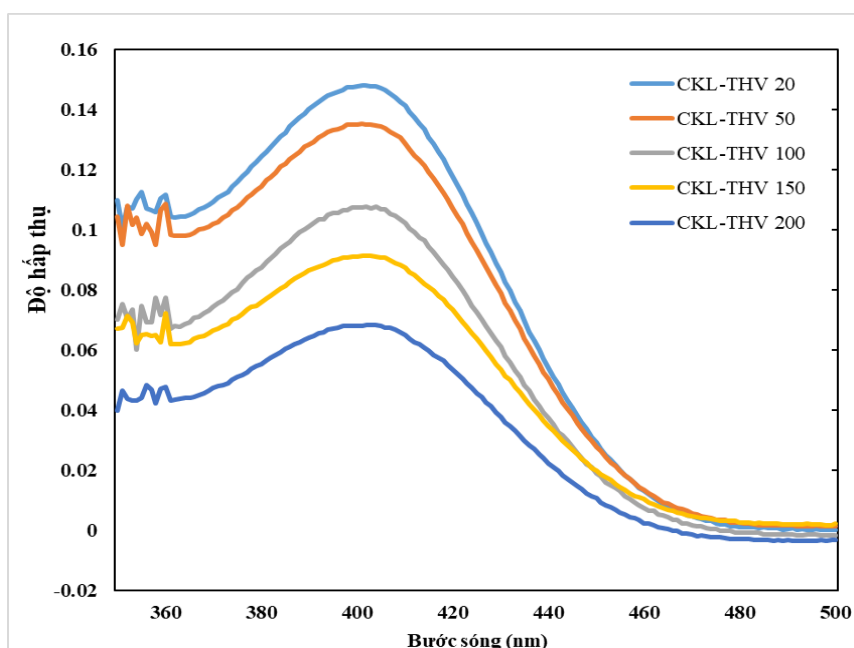
Biểu đồ 3. 18. Đường tuyến tính biểu thị mối tương quan giữa nồng độ CKL-THV và phần trăm ức chế HMG-CoA reductase

Kết quả ở biểu đồ 3.18 cho thấy phần trăm ức chế enzym HMG-CoA reductase tăng tuyến tính theo nồng độ CKL-THV từ 12,5 đến 50 $\mu\text{g/ml}$.

Phương trình hồi quy tuyến tính là $y = 1,0101x + 13,258$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9967$. Thay $y = 50$ vào phương trình trên, ta tính được giá trị x , đây chính là nồng độ ức chế 50% hoạt tính enzym HMG-CoA reductase của CKL-THV. Cụ thể, $IC_{50} = 36,37 \mu\text{g/ml}$.

3.2.3.2. Cơ chế ức chế enzym cholesterol esterase

Sử dụng máy quang phổ UV-VIS để đo độ hấp thụ của sản phẩm (p-nitrophenolat) sau phản ứng thủy phân cơ chất pNPB trong dải bước sóng từ 350 đến 500 nm, thu được kết quả sau:



Biểu đồ 3. 19. Độ hấp thụ trung bình của p-nitrophenolat khi sử dụng CKL-THV với các nồng độ khác nhau

Ghi chú: CKL-THV 20, 50, 100, 150, 200: Dung dịch CKL-THV nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$; 50 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 150 $\mu\text{g/ml}$; 200 $\mu\text{g/ml}$

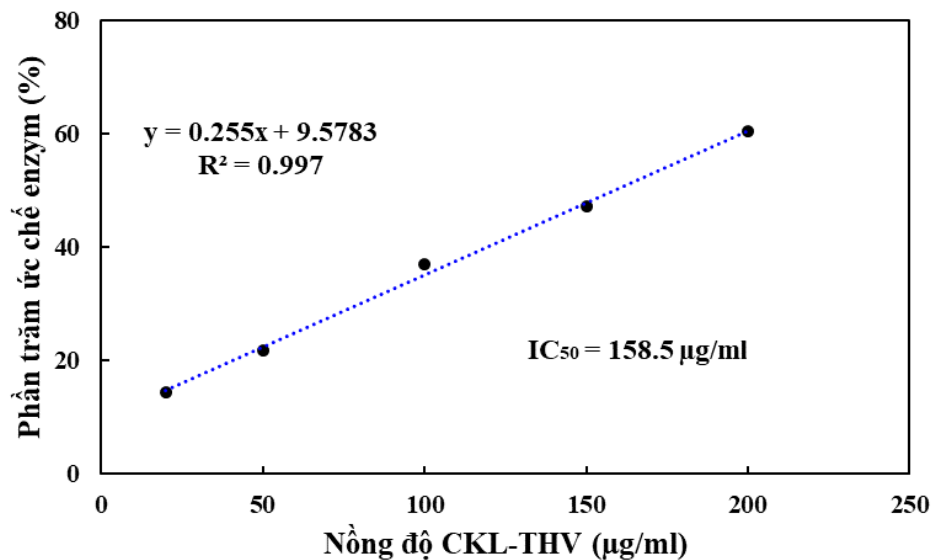
Kết quả ở biểu đồ 3.19 cho thấy: Khi sử dụng mẫu thử CKL-THV ở các nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$; 50 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 150 $\mu\text{g/ml}$ và 200 $\mu\text{g/ml}$, sản phẩm của phản ứng (p-nitrophenolat) đều hấp thụ cực đại ánh sáng UV-Vis ở bước sóng 405 nm. Khi nồng độ của dung dịch CKL-THV tăng dần (từ 20 $\mu\text{g/ml}$ lên 200 $\mu\text{g/ml}$) thì độ hấp thụ của p-nitrophenolat cũng giảm dần.

Bảng 3. 18. Phần trăm ức chế enzym cholesterol esterase của CKL-THV

Nồng độ CKL-THV ($\mu\text{g/ml}$)	Phần trăm ức chế (%) ($n = 3, \bar{x} \pm \text{SD}$)
20	$14,4 \pm 1,28$
50	$21,7 \pm 1,53$
100	$36,9 \pm 2,66$
150	$47,2 \pm 0,63$
200	$60,4 \pm 3,17$

Kết quả ở bảng 3.18 cho thấy: Khi tăng nồng độ CKL-THV từ 20 $\mu\text{g/ml}$ lên 200 $\mu\text{g/ml}$, phần trăm ức chế enzym cholesterol esterase tăng dần từ 14,4 % lên 60,4%. Phần trăm ức chế enzym cholesterol esterase tăng tuyến tính theo nồng độ dung dịch CKL-THV.

Dựa vào kết quả trên, tiến hành vẽ đồ thị hồi quy tuyến tính $y = ax + b$ đi qua tất cả các điểm với y là giá trị % ức chế, x là giá trị nồng độ CKL-THV. Sau đó tính nồng độ ức chế 50% hoạt tính enzym (%I), thu được kết quả sau:



Biểu đồ 3. 20. Đường tuyến tính biểu thị mối tương quan giữa nồng độ CKL-THV và phần trăm ức chế cholesterol esterase

Kết quả ở biểu đồ 3.20 cho thấy khi tăng nồng độ CKL-THV từ 20 $\mu\text{g/ml}$ lên 200 $\mu\text{g/ml}$, phần trăm ức chế enzym cholesterol esterase tăng tuyến tính với

nồng độ CKL-THV. Phương trình hồi quy tuyến tính là $y = 0,255x + 9,5783$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,997$. Thay $y = 50$ vào phương trình trên, ta tính được giá trị x , đây chính là nồng độ ức chế 50% hoạt tính enzym cholesterol esterase. Cụ thể, $IC_{50} = 158,5 \mu g/ml$.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

Các kết quả nghiên cứu bước đầu về CKL-THV đã cung cấp những bằng chứng khoa học có giá trị, góp phần làm sáng tỏ cơ sở dược lý cho việc ứng dụng kinh nghiệm dân gian trong phòng ngừa và hỗ trợ điều trị béo phì và rối loạn chuyển hóa lipid máu. Phần bàn luận dưới đây sẽ tập trung phân tích sâu hơn mối liên hệ giữa kết quả nghiên cứu và cơ sở khoa học hiện có, đồng thời đối chiếu với các tài liệu tham khảo để làm rõ tiềm năng ứng dụng cũng như những điểm cần tiếp tục nghiên cứu đối với chế phẩm CKL-THV.

4.1. Bàn luận về nghiên cứu độc tính

4.1.1. Về độc tính cấp

Nghiên cứu về độc tính cấp là nghiên cứu dược lý đầu tiên cần phải được tiến hành của một sản phẩm nhằm xác định độc tính xảy ra sau khi dùng thuốc một lần hoặc vài ba lần trong ngày [141]. Đánh giá độc tính cấp nhằm cung cấp thông tin cho việc xếp loại mức độ độc của thuốc, dự đoán triệu chứng và dự phòng biện pháp điều trị ngộ độc cấp. Bên cạnh đó, đánh giá độc tính cấp là cơ sở thiết lập mức liều cho các nghiên cứu độc tính và tác dụng cũng như phạm vi an toàn của chế phẩm nghiên cứu tiếp theo. Đánh giá độc tính cấp cần quan tâm đến các chỉ số: liều an toàn, liều dung nạp tối đa, liều gây ra độc tính có thể quan sát được, liều thấp nhất gây chết động vật (nếu có), liều gây chết 50% số động vật thí nghiệm (LD_{50}), những triệu chứng ngộ độc điển hình có thể quan sát được trên động vật thực nghiệm [135].

Trong nghiên cứu độc tính cấp, động vật nghiên cứu được dùng chế phẩm nghiên cứu với một liều thử duy nhất trong 24 giờ và theo dõi trong 72 giờ để xác định các triệu chứng ngộ độc (nếu có). Đường đưa thuốc sử dụng theo đúng như đường dự kiến sử dụng cho người trên lâm sàng sau này, thể tích tối đa có thể dùng cho động vật được quy định thay đổi tùy từng loài khác nhau. Trường hợp cần dùng với liều lớn hơn, có thể chia thành liều nhỏ, dùng 2-3 lần trong ngày, khoảng cách giữa các lần cách nhau ít nhất 2 giờ [135], [141]. Trong

nghiên cứu của chúng tôi, chuột nhắt trắng khỏe mạnh, trưởng thành được lựa chọn, đồng thời, để kết quả nghiên cứu bao hàm cho cả 2 giống, chúng tôi chọn cả chuột nhắt giống đực và giống cái đưa vào nghiên cứu. Chuột trong các lô được cho uống chế phẩm nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau với cùng thể tích cho uống sao cho chuột trong các lô được cho uống chế phẩm nghiên cứu với liều lượng tăng dần.

Chúng tôi nhận thấy để phân tán đều hỗn dịch CKL-THV qua kim cong đầu tù (kim chuyên dụng dành cho chuột nhắt uống thuốc), chỉ có thể sử dụng hỗn dịch chế phẩm với nồng độ cao nhất là 0,2 g/ml. Theo các hướng dẫn, với chuột nhắt, thể tích tối đa có thể dùng theo đường uống là 0,5 ml/10g thể trọng [135], [141]. Nếu cho chuột nhắt dùng liều duy nhất trong ngày với thể tích cho uống tối đa là 0,5ml/10g thể trọng thì liều CKL-THV cao nhất có thể được sử dụng là 10 g/kg thể trọng, gấp khoảng 16,67 lần so với liều dự kiến dùng trên người, đã quy đổi sang chuột nhắt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã cho chuột sử dụng chế phẩm nghiên cứu 3 lần trong ngày, mỗi lần cách nhau 3 giờ, với cùng thể tích cho uống là 0,2 ml/10g thể trọng để có thể làm giảm sự ảnh hưởng của việc cho uống một thể tích lớn/ lần đối với chuột, đồng thời có thể tăng liều tối đa lên 12 g/kg thể trọng. Như vậy, với mức liều này, chuột đã được cho uống CKL-THV cao hơn mức liều dùng dự kiến trên người đã quy đổi sang chuột nhắt là 20 lần.

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.1 cho thấy trong 72 giờ sau khi uống chế phẩm và trong suốt 7 ngày sau đó, chuột ở tất cả các lô đều bình thường, lông mượt, không có biểu hiện khó thở hay tím tái. Các hoạt động ăn uống, vận động và bài tiết bình thường. Không có chuột chết hay bất kì dấu hiệu bất thường hoặc ngộ độc nào. Chuột đã uống đến liều 12,0 g/kg thể trọng (gấp 20 lần liều điều trị dự kiến trên người đã quy đổi sang chuột nhắt) mà không có con nào chết, cũng như không thấy có bất kì biểu hiện bất thường nào. Do vậy, không xác định được LD₅₀ của CKL-THV. Mức liều 12,0 g/kg là mức liều rất cao, cho

phép khẳng định mẫu nghiên cứu có tính an toàn trong thử nghiệm độc tính cấp trên chuột nhắt trắng thực nghiệm. Đối chiếu theo phân loại độc tính cấp đường uống [142], CKL-THV được phân vào nhóm 5 ($LD_{50} > 5000$ mg/kg), là loại gần như không độc.

So sánh với các nghiên cứu về độc tính cấp của các chế phẩm Trà hoa vàng khác như cao chiết hoa *Camellia flava*, chiết xuất nước *Camellia euphlebia*, hay dịch chiết lá *Camellia hakodae*, nghiên cứu của chúng tôi cũng cho kết quả tương tự, không xác định được liều gây chết 50% động vật thí nghiệm [128], [133], [134].

Liều dung nạp tối đa là mức liều tối đa cho chuột uống với thể tích cao nhất và độ đậm đặc nhất có thể đưa được qua kim cong đầu tù dễ dàng. Liều dung nạp tối đa của CKL-THV trong nghiên cứu của chúng tôi (12,0 g/kg thể trọng) cao hơn so với của cao chiết hoa Trà hoa vàng *Camellia flava* (11,75 g/kg thể trọng) [128]. Tuy nhiên, khi so sánh với nghiên cứu của Nguyễn Hồng Hạnh và cộng sự, CKL-THV có liều dung nạp tối đa thấp hơn chế phẩm dạng dịch chiết lá *Camellia hakodae* (20,0 g/kg thể trọng) [134]. Nguyễn Hồng Hạnh sử dụng lá Trà hoa vàng chiết nóng, sau đó cô đặc dịch chiết và cho chuột sử dụng. Dịch chiết này không có tá dược, do đó lượng đưa vào cho chuột được nhiều hơn. Còn nghiên cứu của chúng tôi tiến hành trên chế phẩm cao khô lá Trà hoa vàng. Một trong những lợi thế lớn nhất của chế phẩm cao khô là khả năng tập trung các hoạt chất có trong dược liệu. Tỷ lệ hoạt chất trong cao khô thường cao hơn tỉ lệ hoạt chất trong dược liệu [15], [16]. Do vậy, nếu chỉ tính riêng phần dược liệu thì lượng cao tối đa cho cho chuột sử dụng sẽ ít hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Hồng Hạnh. Tuy nhiên, kết quả của cả 2 nghiên cứu đều không xác định được LD_{50} của chế phẩm, điều này cho thấy Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh dù là dùng dạng dịch chiết hay cao khô đều có tính an toàn cao trong các thử nghiệm độc tính cấp trên chuột nhắt trắng chủng Swiss.

4.1.2. Về độc tính bán trường diễn

Kết quả thử nghiệm độc tính cấp phía trên cho thấy CKL-THV an toàn với liều dung nạp tối đa là 12,0 g/kg thể trọng (gấp 20 lần liều điều trị dự kiến trên người đã quy đổi sang chuột nhắt). Theo Hướng dẫn của Bộ Y tế về đánh giá tính an toàn của thuốc có nguồn gốc thảo dược, nếu mẫu thử không thể hiện độc tính cấp hoặc rất ít độc, có thể lựa chọn mô hình thử độc tính bán trường diễn trên một loài động vật gặm nhấm [135]. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn cho phép đánh giá tác dụng không mong muốn của chế phẩm nghiên cứu, đồng thời cung cấp những thông tin về cơ quan đích bị tổn thương và xác định chế độ liều thích hợp cho các nghiên cứu dài hạn. Do vậy, để có cơ sở xác định khả năng dung nạp của chế phẩm nghiên cứu trên động vật thí nghiệm khi dùng chế phẩm dài ngày, chúng tôi tiến hành đánh giá thêm độc tính bán trường diễn của CKL-THV.

Chuột cống trắng là đối tượng phù hợp để nghiên cứu trong thời gian dài vì các chỉ số nghiên cứu tương đối ổn định. Thử nghiệm được tiến hành bằng cách cho động vật thí nghiệm sử dụng CKL-THV hàng ngày liên tục trong 90 ngày. Chúng tôi thiết kế hai mức liều dùng của CKL-THV là 0,35 g/kg thể trọng (tương đương mức liều dự kiến điều trị) và 1,05 g/kg thể trọng (gấp 3 lần liều dự kiến điều trị). Việc thiết kế các mức liều như vậy nhằm đảm bảo độ tin cậy của nghiên cứu và tuân theo qui định của Bộ Y tế trong đánh giá tính an toàn của chế phẩm thử [135]. Thử nghiệm được tiến hành song song với một nhóm chứng trong cùng điều kiện nuôi dưỡng, nhóm này được cho sử dụng nước cất hàng ngày với liều 10ml/kg thể trọng/24h. Thời gian nghiên cứu 90 ngày là đủ dài để đánh giá tính an toàn đối với các chế phẩm dự kiến sử dụng trên người trong thời gian trên 1 tháng, hoặc cho phép đánh giá thử nghiệm lâm sàng ở các giai đoạn sau. Các chỉ tiêu nghiên cứu bao gồm: tình trạng chung, sự thay đổi về cân nặng, các chỉ số huyết học, các chỉ số sinh hoá đánh giá chức năng gan, thận và đặc điểm giải phẫu bệnh của các tạng gan, lách, thận.

** Ảnh hưởng của CKL-THV đến tình trạng chung và thể trọng chuột*

Tình trạng chung và cân nặng của chuột là thông số phản ánh sức khỏe của động vật thực nghiệm. Đây là các chỉ số nghiên cứu bắt buộc phải theo dõi trước khi dùng chế phẩm nghiên cứu và theo dõi định kỳ trong suốt thời gian nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.2 cho thấy khi so sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm nghiên cứu, dù ở thời điểm bắt đầu nghiên cứu, sau 45 ngày hay sau 90 ngày thử nghiệm thì cũng không có sự khác biệt về trọng lượng giữa các lô. Trong 90 ngày thử nghiệm, chuột ở cả 3 lô đều hoạt động bình thường, lông mượt, các hoạt động ăn uống, bài tiết diễn ra bình thường, phân thành khuôn. Trọng lượng chuột ở các lô nghiên cứu đều tăng theo thời gian, có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Chuột ở cả 3 lô đều phát triển bình thường, các quá trình trao đổi chất không bị ảnh hưởng bởi chế phẩm nghiên cứu, lượng thức ăn, nước uống được đưa vào đều đặn hàng ngày, tạo điều kiện thuận lợi cho việc tăng cân. Như vậy, CKL-THV ở cả 2 mức liều 0,35 g/kg/24h và 1,05 g/kg/24h đều không ảnh hưởng tới tình trạng chung và sự phát triển cân nặng của chuột khi dùng chế phẩm liên tục trong 90 ngày.

** Ảnh hưởng của CKL-THV đến chức năng tạo máu*

Công thức máu ngoại vi là một xét nghiệm thường quy, số lượng và chất lượng các tế bào máu phản ánh tình trạng của cơ quan tạo máu [141]. Các biến đổi về chỉ số huyết học (nếu có) có thể phản ánh độc tính của chế phẩm lên tủy xương, lên đời sống hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu... Các chỉ số huyết học được đánh giá thường gồm số lượng hồng cầu (RBC), bạch cầu (WBC), tiểu cầu (PLT), hàm lượng huyết sắc tố (hemoglobin - HGB), tỉ lệ thể tích hồng cầu/thể tích máu toàn bộ (hematocrit – HCT) và thể tích trung bình hồng cầu (MCV). Nếu chế phẩm nghiên cứu tác động đến cơ quan tạo máu sẽ làm thay đổi số lượng và chất lượng các tế bào máu [141].

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.3, 3.4 và 3.5 cho thấy các lô sử dụng CKL-THV trong 90 ngày nghiên cứu đều không có sự thay đổi đáng kể về các chỉ số

huyết học khi so sánh với lô chứng. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về các chỉ số huyết học bao gồm số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hàm lượng huyết sắc tố, chỉ số hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu máu chuột giữa các lô ($p > 0,05$). Khi so sánh các chỉ số trên giữa các thời điểm nghiên cứu trong cùng một lô cũng không nhận thấy có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Các kết quả này bước đầu cho phép khẳng định chưa thấy có độc tính của CKL-THV trên tuỷ xương và các tế bào máu ngoại vi ở các liều nghiên cứu. CKL-THV không ảnh hưởng đến sự tạo hồng cầu, hình thái hồng cầu cũng như sức bền của tế bào hồng cầu; không ảnh hưởng đến bạch cầu và tiểu cầu là những dòng tế bào bảo vệ cơ thể đáp ứng đầu tiên với các tác nhân truyền nhiễm, tổn thương ở mô hoặc quá trình viêm.

Trong cơ thể, gan, thận là những cơ quan dễ bị tổn thương trong quá trình dùng thuốc, do liên quan nhiều đến quá trình chuyển hoá, thải trừ của thuốc. Có thể đánh giá sự tổn thương tế bào gan, thận thông qua kết quả xét nghiệm các chỉ số sinh hóa máu.

** Ảnh hưởng của CKL-THV chức năng gan*

Gan là tạng lớn nhất trong cơ thể, có nhiều chức năng đặc biệt quan trọng như chuyển hóa hóa sinh, tiêu hóa, khử độc và loại bỏ các sản phẩm chuyển hóa ra khỏi cơ thể [143]. Khi sử dụng thuốc, thuốc có thể gây độc, làm tổn thương tế bào gan. Để đánh giá ảnh hưởng của CKL-THV đến chức năng gan, chúng tôi sử dụng các chỉ tiêu sinh hóa như hoạt độ AST, hoạt độ ALT, nồng độ albumin, cholesterol toàn phần và triglycerid. Khi gan bị tổn thương, các chỉ tiêu nghiên cứu này đều có sự thay đổi.

Sự tổn thương tế bào gan làm tăng hoạt độ của một số enzym có nguồn gốc gan trong huyết thanh, quan trọng nhất là 2 enzym ALT (Alanin transaminase) và AST (Aspartat transaminase). ALT là enzym có nhiều nhất ở gan, khu trú trong bào tương của tế bào nhu mô gan. Khi tổn thương hủy hoại tế bào gan, thậm chí chỉ cần thay đổi tính thấm của màng tế bào gan, hoạt độ

ALT trong máu đã tăng cao. Hoạt độ ALT thường được sử dụng như dấu ấn sinh học đặc hiệu cho các bệnh ở gan. Khác với ALT, 2/3 AST khu trú trong ty thể (mitochondria) và chỉ ít hơn 1/3 lượng AST khu trú ở bào tương của tế bào. Khi tổn thương tế bào gan ở mức độ dưới tế bào, AST trong ty thể được giải phóng ra. Do đó, cả AST và ALT đều tăng cao so với bình thường, mức độ tăng của ALT cao hơn so và sớm hơn với AST [143]. Như vậy, hoạt độ AST và ALT là hai thông số quan trọng nhất để đánh giá tổn thương tế bào gan.

Trên chuyển hóa protein, gan tổng hợp toàn bộ albumin và một phần globulin huyết thanh. Albumin tham gia vào 2 chức năng chính là duy trì áp lực thẩm thấu trong huyết tương, đồng thời liên kết vận chuyển các chất có dạng phân tử nhỏ như bilirubin, các acid béo hoặc thuốc có bên trong máu. Khi gan bị tổn thương, chức năng gan bị suy giảm, dẫn tới giảm tổng hợp albumin [143]. Như vậy, sự thay đổi nồng độ albumin phản ánh sự thay đổi trên chuyển hóa protein của gan.

Trên chuyển hóa lipid, gan tổng hợp phần lớn cholesterol trong huyết thanh. Quá trình ester hóa cholesterol có thể diễn ra ở gan hoặc huyết tương. Lượng cholesterol ester hóa chiếm khoảng 60-70% lượng cholesterol toàn phần. Do vậy, khi tổn thương suy giảm chức năng gan thì tỷ lệ cholesterol ester hóa/cholesterol toàn phần sẽ giảm [143]. Ngoài ra, gan còn là cơ quan chủ yếu tham gia vào việc tổng hợp, chuyển hóa và điều tiết nồng độ triglycerid trong máu. Khi chức năng gan suy giảm, khả năng chuyển hóa lipid và kiểm soát mức triglycerid bị ảnh hưởng. Suy giảm chức năng gan còn làm giảm khả năng sản xuất và bài tiết VLDL, do vậy, triglycerid không thể được vận chuyển ra khỏi gan và đến các mô ngoại vi, dẫn đến tình trạng tăng triglycerid. Như vậy, các chỉ số cholesterol toàn phần và triglycerid vừa cho phép đánh giá chức năng gan, vừa cho phép đánh giá về chuyển hoá lipid trong cơ thể.

Các kết quả ở bảng 3.6 và 3.7 đều cho thấy hoạt độ ALT, AST, nồng độ albumin, cholesterol toàn phần và triglycerid trong máu chuột ở hai lô uống

CKL-THV không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và khi so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống chế phẩm 45 và 90 ngày. Điều này chứng tỏ CKL-THV sử dụng trên chuột cống trắng với liều 0,35 g/kg/24h và 1,05 g/kg/24h đều không gây tổn thương và hủy hoại các tế bào gan. CKL-THV không ảnh hưởng đến các chức năng gan trong chuyển hóa lipid và protein.

Kết quả mô bệnh học gan cũng phù hợp với kết quả xét nghiệm hóa sinh. Hình ảnh đại thể và vi thể gan ở cả hai lô uống CKL-THV đều có cấu trúc tế bào gan bình thường, khoảng cửa và mạch máu bình thường giống như lô chứng, không thấy xuất huyết hoặc ổ hoại tử, các tế bào gan không bị thoái hóa. Như vậy, sử dụng CKL-THV ở cả hai mức liều 0,35 g/kg/24h và 1,05 g/kg/24h trên chuột cống trắng chủng *Wistar* trong 90 ngày không gây tổn thương tế bào gan, không gây ảnh hưởng đến các chức năng gan.

** Ảnh hưởng của CKL-THV đến chức năng thận*

Thận là cơ quan quan trọng sống còn của cơ thể, có chức năng bài tiết các chất cặn bã bằng cơ chế lọc và tái hấp thu; tham gia điều hòa cân bằng acid base; tham gia chuyển hóa các chất và tổng hợp một số chất; đồng thời giữ chức năng nội tiết của cơ thể [144]. Do vậy, khi sử dụng thuốc, đặc biệt là khi sử dụng liều cao, trong thời gian dài, thận dễ bị tổn thương. Có thể đánh giá chức năng thận thông qua việc định lượng urea và creatinin. Nồng độ urea máu thay đổi tùy theo khẩu phần ăn, tăng nhất thời sau bữa ăn nhiều đạm. Creatinin là thành phần có nitơ trong máu ổn định nhất, không phụ thuộc vào chế độ ăn hoặc những thay đổi bệnh lý khác và chỉ phụ thuộc vào khả năng đào thải của thận [144]. Khi cầu thận bị tổn thương, nồng độ creatinin máu tăng sớm và tin cậy hơn urea máu. Do vậy, hiện nay, creatinin là chỉ số thường được dùng để đánh giá và theo dõi chức năng thận. Theo kết quả ở bảng 3.8, hàm lượng creatinin trong máu chuột ở cả 2 lô uống CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h và 1,05 g/kg/24h sau 45 và 90 ngày đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng. Khi so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống chế phẩm

45 và 90 ngày cũng không có sự khác biệt về chỉ số creatinin. Các kết quả này phù hợp với kết quả về mô bệnh học thận. Quan sát đại thể thận và cấu trúc vi thể thận của chuột thực nghiệm cho thấy ở hai lô uống CKL-THV, hình ảnh đại thể cấu trúc vi thể các vùng chức năng của thận bình thường như chuột lô chứng. Cấu trúc các vùng chức năng thận bình thường, các tế bào biểu mô ống thận không bị thoái hóa. Như vậy, sử dụng CKL-THV ở cả hai mức liều nghiên cứu 0,35 g/kg/24h và 1,05 g/kg/24h trên chuột cống *Wistar* trong 90 ngày không gây ảnh hưởng tới chức năng thận.

** Ảnh hưởng của CKL-THV đến chức năng của lách*

Lách là cơ quan bạch huyết lớn nhất của cơ thể, vừa có chức năng miễn dịch, vừa có chức năng phá huỷ các tế bào máu già cỗi. Những độc tính của thuốc gây ra cho cơ thể liên quan đến huyết học và miễn dịch (nếu có) cũng dễ dàng được nhận thấy ở lách. Quan sát đại thể lách và cấu trúc vi thể lách của chuột thực nghiệm ở hai lô uống CKL-THV thấy bình thường, không khác biệt so với lô chứng. Các lô trị sử dụng CKL-THV đều không thấy xuất huyết hoặc hoại tử. Như vậy, CKL-THV không ảnh hưởng tới cấu tạo và chức năng của lách khi dùng 90 ngày ở các mức liều 0,35 g/kg/24h và 1,05 g/kg/24h.

Tóm lại, các kết quả nghiên cứu về tình trạng chung, chỉ số huyết học, sinh hóa máu và hình ảnh đại thể, vi thể gan, thận, lách chuột cho thấy CKL-THV không ảnh hưởng đến tình trạng chung, sự phát triển thể trọng, các chức năng tạo máu, chức năng gan, thận, lách chuột nghiên cứu khi sử dụng các mức liều 0,35 g/kg/24h và 1,05 g/kg/24h, liên tục trong 90 ngày.

Khi so sánh với các kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn của chế phẩm Trà hoa vàng khác như *Camellia euphlebia*, chúng tôi nhận thấy CKL-THV *Camellia hakodae* an toàn hơn. Thử nghiệm độc tính bán trường diễn 14 ngày trên chuột nhắt và 28 ngày trên chuột cống ghi nhận một số tác dụng phụ của chiết xuất nước lá Trà hoa vàng *Camellia euphlebia* như buồn ngủ, đầy hơi, tăng số lượng hồng cầu và thoái hóa nhẹ tế bào gan [133]. Trong khi đó, CKL-

THV *Camellia hakodae* được nghiên cứu trong thời gian dài hơn (90 ngày), nhưng không gây ra bất kì sự thay đổi nào liên quan đến các chỉ số huyết học, sinh hóa, cũng như chức năng của các tạng gan, lách, thận chuột.

Tính an toàn của lá Trà hoa vàng *Camellia hakodae* đã được khẳng định bước đầu trong nghiên cứu của Nguyễn Hồng Hạnh và cộng sự. Nghiên cứu sử dụng dịch chiết nước nóng toàn phần từ lá trà khô, đánh giá độc tính bán trường diễn trong 28 ngày trên chuột cống chủng *Wistar*. Kết quả cho thấy, ngay cả ở liều cao (14,0 g/kg/24h), dịch chiết không ảnh hưởng tới trọng lượng cơ thể, các chỉ số huyết học, sinh hóa máu và không gây tổn thương hay thoái hóa tế bào gan, lách, thận [134]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nguyên liệu sử dụng vẫn là lá *Camellia hakodae*, nhưng được bào chế dưới dạng cao khô toàn phần (CKL-THV). Đây là một dạng bào chế đậm đặc hơn so với dịch chiết nước truyền thống bởi các hoạt chất tập trung trong dược liệu cao hơn, do đó liều dùng trong các thử nghiệm cũng thấp hơn. Ngoài ra, dạng bào chế cao khô cũng phù hợp hơn khi phát triển thành chế phẩm dùng đường uống. Thời gian thử nghiệm của chúng tôi kéo dài tới 90 ngày có thể đánh giá sâu hơn các biểu hiện tích lũy độc chất, biến đổi chuyển hóa hoặc tổn thương vi thể tại các cơ quan đích, từ đó đánh giá được tính an toàn của CKL-THV trong thời gian dài.

Kết quả cho thấy CKL-THV không gây thay đổi đáng kể về trọng lượng cơ thể, huyết học, sinh hóa hay các tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận trên chuột cống ngay cả khi sử dụng lặp lại trong thời gian gấp 3 lần so với nghiên cứu trước. Sự khác biệt về dạng bào chế và thời gian nghiên cứu cho phép đánh giá bao quát và toàn diện hơn về tính an toàn của dược liệu lá Trà hoa vàng *Camellia hakodae*. Trong khi nghiên cứu của Nguyễn Hồng Hạnh xác lập mức độ an toàn ban đầu của nguyên liệu thô, bào chế theo phương pháp truyền thống, thì nghiên cứu của chúng tôi xác nhận độ an toàn của chế phẩm tinh chiết cô đặc, sử dụng dài ngày, tạo nền tảng vững chắc cho định hướng phát triển CKL-THV thành chế phẩm hỗ trợ điều trị chuyển hóa mạn tính như béo phì và rối loạn lipid máu.

4.2. Bàn luận về tác dụng chống béo phì và hạ lipid máu

4.2.1. Về tác dụng chống béo phì *in vivo*

4.2.1.1. Về lựa chọn mô hình thử

Trong nghiên cứu của luận án này, chúng tôi lựa chọn phương pháp gây động vật béo phì bằng chế độ ăn giàu năng lượng HFD bởi tính phổ biến, khả thi và hiệu quả gây béo phì cao [50], [51]. Chế độ ăn HFD được coi là tác nhân chính gây nên sự tăng theo cấp số nhân của các bệnh chuyển hóa liên quan đến béo phì [51]. Theo các nghiên cứu, chế độ ăn HFD có hàm lượng chất béo 45% hoặc 60% thường được sử dụng để gây béo phì ở loài gặm nhấm [52]. Chúng tôi đã xây dựng chế độ ăn HFD để gây mô hình chuột béo phì có tổng giá trị năng lượng là 4495,8 Kcal, trong đó thành phần chất béo chiếm 48,08%. Chế độ ăn giàu chất béo làm tăng năng lượng vào cơ thể, gây mất cân bằng chế độ ăn uống, từ đó gây ra tình trạng béo phì. Chuột sau vài tuần sử dụng chế độ ăn HFD có thể phát triển các đặc điểm tương tự người mắc các hội chứng chuyển hóa như béo phì, tăng đường huyết, tăng lipid máu, tăng huyết áp, tổn thương nội mạc liên quan đến các bệnh tim mạch...[55].

Nghiên cứu của chúng tôi diễn ra trong 2 giai đoạn. Trong giai đoạn 1, chuột thí nghiệm được cho ăn chế độ ăn nhiều chất béo HFD trong 12 tuần để gây tình trạng béo phì. Sau đó các chuột béo phì được đưa vào thử nghiệm chính thức trong 8 tuần. Trong thử nghiệm chính thức, chuột tiếp tục được cho ăn chế độ HFD, đồng thời sử dụng thêm chế phẩm nghiên cứu hoặc chất đối chứng là orlistat hàng ngày. Sau đó đánh giá tác dụng chống béo phì dựa trên các chỉ tiêu nghiên cứu. Orlistat được chọn là thuốc đối chứng dương, sử dụng cho chuột ở lô tham chiếu. Đây là dẫn xuất dehydro của lipstatin, chất có tác dụng ức chế lipase sinh ra từ vi khuẩn *Streptomyces toxytricini*. Các lipase có tác dụng thủy phân chất béo thành monoglycerin và acid béo. Orlistat gây ức chế mạnh có chọn lọc enzym lipase tụy, vì vậy ức chế sự thoái giáng triglycerid trong thức ăn thành acid béo tự do có khả năng hấp thụ [17]. Thuốc không ảnh

hưởng tới các enzym khác ở ruột như trypsin, chymotrypsin, amylase tụy, cholesterolesterase và carboxyesterase. Do đó, các thành phần glucid, protid trong chế độ ăn vẫn được hấp thu bình thường.

Các chỉ tiêu chúng tôi sử dụng để đánh giá sơ bộ tình trạng béo phì của chuột bao gồm: trọng lượng chuột, chiều dài tính từ mũi đến hậu môn, vòng bụng chuột và chỉ số béo phì Lee. Chỉ số béo phì Lee được xác định là tỷ số giữa căn bậc ba của trọng lượng và chiều dài tính từ mũi đến hậu môn chuột. Cũng tương tự như chỉ số BMI được sử dụng để chẩn đoán tình trạng béo phì ở người, chỉ số Lee được sử dụng để chẩn đoán tình trạng béo phì ở chuột. Chuột được coi là béo phì khi chỉ số Lee lớn hơn 0,310 [139].

4.2.1.2. Về kết quả xây dựng mô hình động vật béo phì

Kết quả ở bảng 3.12 cho thấy tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm chính thức, các chuột được chia vào lô mô hình, lô sử dụng orlistat và các lô sử dụng CKL-THV đều tương đương nhau về trọng lượng, chiều dài, vòng bụng và chỉ số béo phì Lee. Sau 12 tuần ăn chế độ ăn HFD, chỉ số Lee trung bình của chuột ở 4 lô trên đều là 0,330, có sự khác biệt so với lô chứng ($p < 0,001$). Ngoài ra, các chỉ tiêu nghiên cứu khác như trọng lượng, vòng bụng chuột cũng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh cả 4 lô này với lô chứng (lô chứa chuột bình thường). Riêng chỉ tiêu chiều dài trung bình của chuột không thay đổi nhiều giữa các lô ($p > 0,05$) do chuột trong nghiên cứu là chuột trưởng thành, đã ổn định về chiều dài.

Theo bảng 2.4, thức ăn HFD được xây dựng có tổng giá trị năng lượng là 4495,8 Kcal, trong đó thành phần chất béo chiếm 48,08%. Động vật thí nghiệm sử dụng chế độ ăn này sẽ làm tăng tổng năng lượng nạp vào cơ thể. Chất béo bão hòa từ các thành phần như mỡ lợn, bơ, sữa bột nguyên kem, sữa đặc có khả năng làm tăng mức LDL cholesterol và tích tụ mỡ nội tạng, từ đó dẫn đến béo phì. Chuột được đưa vào giai đoạn thử nghiệm chính thức đều có chỉ số béo phì Lee $> 0,310$. Như vậy, chúng tôi đã xây dựng thành công mô

hình chuột béo phì bằng chế độ ăn giàu chất béo HFD. Các chuột đưa vào thử nghiệm giai đoạn chính thức đều là các chuột béo phì, đạt tiêu chuẩn.

4.2.1.3. Về tác dụng chống béo phì *in vivo* của CKL-THV

Ảnh hưởng của CKL-THV tới trọng lượng chuột béo phì

Tăng cân là dấu hiệu thường gặp của bệnh béo phì. Nghiên cứu của Mariana và cộng sự cho thấy phần lớn các nghiên cứu về béo phì do chế độ ăn giàu năng lượng đều coi sự khác biệt về tổng trọng lượng cơ thể tăng lên là thông số chính để đánh giá kết quả của sự phát triển bệnh béo phì [54]. Do vậy, giảm trọng lượng cơ thể là mục tiêu chính trong điều trị béo phì.

Kết quả nghiên cứu về tỷ lệ phần trăm thay đổi trọng lượng cơ thể chuột ở các lô nghiên cứu theo thời gian cho thấy chuột ở lô chứng, được cho ăn chế độ ăn thông thường vẫn phát triển bình thường, tăng 15,18% trọng lượng sau 8 tuần nghiên cứu. Trong khi đó, ở lô mô hình, chuột có tỉ lệ tăng trọng lượng cơ thể mạnh, sau 8 tuần, chuột tăng thêm 30,58% trọng lượng so với thời điểm bắt đầu của giai đoạn thử nghiệm chính thức. Như vậy, việc tiếp tục duy trì chế độ ăn HFD vẫn ảnh hưởng mạnh mẽ đến sự thay đổi trọng lượng của chuột thí nghiệm. Chế độ ăn HFD trong nghiên cứu được xây dựng với hàm lượng chất béo cao (48,08%), có thể làm tăng nồng độ neuropeptid Y (NPY), là hormon kích thích sự thèm ăn, do đó sẽ kích thích chuột ăn ngon miệng hơn, ăn nhiều hơn. NPY có tác dụng làm tăng dung nạp thức ăn và giảm hoạt động sinh nhiệt của cơ thể, do vậy làm tăng trọng lượng, gây béo phì [145].

Mặc dù chuột vẫn được duy trì chế độ ăn HFD, nhưng ở các lô sử dụng thuốc chứng dương orlistat và CKL-THV, trọng lượng chuột có giảm theo thời gian. Lô sử dụng orlistat cho mức độ giảm trọng lượng chuột sau 8 tuần là 5,18%, mức độ giảm mạnh hơn các lô sử dụng CKL-THV. Tuy nhiên, khi đánh giá về trọng lượng chuột giữa lô sử dụng orlistat và các lô sử dụng CKL-THV tại thời điểm kết thúc thử nghiệm, chưa nhận thấy có sự khác biệt. Orlistat không tác động đặc hiệu lên cơ chế no hay sự thèm ăn. Orlistat có tác dụng ức

ché enzym lipase tụy nên sẽ ức chế sự thủy phân chất béo thành monoglycerin và acid béo [17], [31]. Điều này dẫn tới giảm tỷ lệ hấp thụ chất béo 30% [30]. Việc giảm hấp thụ chất béo làm giảm lượng calo tiêu thụ, từ đó gây giảm cân.

Kết quả ở biểu đồ 3.1 và 3.2 cho thấy CKL-THV có làm giảm trọng lượng chuột béo phì. Lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h làm giảm 2,55% trọng lượng, lô sử dụng CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h làm giảm 3,09% trọng lượng chuột so với thời điểm bắt đầu thử nghiệm chính thức. Khi so sánh tại tuần cuối cùng kết thúc thử nghiệm, trọng lượng chuột ở cả 2 lô sử dụng CKL-THV đều có sự khác biệt so với lô mô hình ($p < 0,001$). Tác dụng làm giảm trọng lượng chuột béo phì của CKL-THV và orlistat được đánh giá là tương đương nhau ($p > 0,05$).

Trong CKL-THV có chứa polyphenol, đây là chất giúp tăng cường quá trình chuyển hóa năng lượng trong cơ thể, điều chỉnh tổng hợp lipid và điều chỉnh hệ vi khuẩn đường ruột. Ngoài ra, polyphenol còn có thể điều hòa các hormon như ghrelin và leptin, từ đó kiểm soát cảm giác thèm ăn, hỗ trợ giảm cân [146]. Một số polyphenol như catechin được cho là có hoạt tính sinh học cao trong việc giảm khối lượng cân nặng của cơ thể. Nghiên cứu của Chen J.H. và cộng sự về việc sử dụng catechin liều cao chiết xuất từ Trà trên phụ nữ béo bụng sau hai tuần điều trị cho thấy hiệu quả giảm cân đáng kể mà không có bất kỳ tác dụng bất lợi nào đã được ghi nhận [10].

Trong các nghiên cứu thực nghiệm, tác dụng giảm cân đã được ghi nhận khi khảo sát hiệu quả chống béo phì của một số chế phẩm từ các loài Trà hoa vàng khác. Cả dịch chiết nước và dịch chiết ethanol của hoa Trà hoa vàng *Camellia euphlebia* liều 100 và 400 mg/kg/24h đều làm giảm cân ở chuột nhắt béo phì so với lô mô hình sau 4 tuần [130]. Chuột béo phì được sử dụng chiết xuất ethanol của hoa *Camellia nitidissima* liều 150 và 300 mg/kg/24h trong 4 tuần làm giảm cân so với lô mô hình từ 46,34% đến 47,89% [131]. Chúng tôi

chưa so sánh được mức độ giảm cân giữa các loài Trà hoa vàng với nhau, do trong các nghiên cứu trước, các tác giả chỉ công bố tỷ lệ giảm cân của lô sử dụng chế phẩm so với lô mô hình. Trong khi đó, nghiên cứu của chúng tôi thực hiện việc so sánh tỷ lệ giảm cân trong cùng một lô tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm chính thức với thời điểm kết thúc thử nghiệm.

Trên loài Trà hoa vàng *Camellia hakodae*, hiện chỉ có nghiên cứu về tác dụng chống béo phì khi sử dụng chế phẩm dạng hỗn hợp dịch chiết chứa lá *Camellia hakodae* và Giảo cổ lam (tỉ lệ 1:1). Việc phối hợp hai dược liệu trên với liều 12 và 24 g/kg/24h cho thấy có hiệu quả giảm cân trên mô hình chuột nhắt trắng gây béo phì [132]. Như vậy, tác dụng giảm cân của chế phẩm CKL-THV trong nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn có cơ sở khoa học.

Ảnh hưởng của CKL-THV tới vòng bụng chuột béo phì

Cũng giống như trọng lượng, sự thay đổi vòng bụng của chuột ở các lô nghiên cứu cũng được chúng tôi lựa chọn là cơ sở đánh giá tác dụng chống béo phì của CKL-THV. Vòng bụng chuột được xác định tại các thời điểm sau 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần và 8 tuần sử dụng CKL-THV. Kết quả ở biểu đồ 3.3 cho thấy ở lô mô hình, vòng bụng chuột sau khi kết thúc thử nghiệm tăng 4,35% so với thời điểm bắt đầu thử nghiệm chính thức. Chuột ở lô mô hình được sử dụng chế độ ăn HFD hàng ngày. Chế độ ăn giàu chất béo này kích thích quá trình tạo mỡ và làm giảm quá trình oxy hóa mỡ. Khi lượng chất béo dư thừa không được sử dụng, cơ thể sẽ tích trữ chúng trong các tế bào mỡ ở bụng, do đó làm tăng số đo vòng bụng chuột.

Lô chuột sử dụng orlistat có số đo vòng bụng giảm 1,78% sau 8 tuần thử nghiệm chính thức. Trong khi đó, các lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 và 1,05 g/kg/24h chưa ghi nhận sự giảm số đo vòng bụng theo thời gian. Tuy nhiên, khi đánh giá riêng tại thời điểm kết thúc thử nghiệm, so với lô mô hình, các lô sử dụng CKL-THV đều có số đo vòng bụng giảm với mức ý nghĩa thống kê

$p < 0,01$. Polyphenol trong CKL-THV có thể giúp làm giảm mỡ bụng thông qua việc hạn chế sự hấp thu chất béo từ thực phẩm và tác động lên các vi sinh vật đường ruột. Tuy nhiên tác dụng này của CKL-THV vẫn kém hơn khi so sánh với orlistat ($p < 0,001$).

Ảnh hưởng của CKL-THV tới trọng lượng mỡ

Kết quả nghiên cứu ở biểu đồ 3.7 cho thấy, ở lô mô hình có sự tăng trọng lượng mỡ so với lô chứng ($p < 0,001$). Việc tiêu thụ thức ăn giàu năng lượng dẫn đến tăng cân và tích tụ mỡ bụng [55]. Chế độ ăn giàu chất béo cung cấp lượng calo dư thừa chủ yếu từ các acid béo bão hòa, làm tăng sự tích tụ mỡ trong cơ thể, đặc biệt là các mô mỡ nội tạng. Các mô này đóng vai trò quan trọng trong việc lưu trữ mỡ trong cơ thể và liên quan đến các rối loạn chuyển hóa. Khi ăn chế độ ăn giàu chất béo, các tế bào mỡ sẽ tăng trưởng cả về kích thước và số lượng, do vậy làm tăng khối lượng các mô mỡ này.

Lô sử dụng orlistat làm giảm trọng lượng mỡ so với lô mô hình ($p < 0,001$). Orlistat có tác dụng ức chế enzyme lipase, từ đó ngăn chặn sự phân giải triglycerid trong thực phẩm thành các acid béo tự do và monoglycerid, do vậy, chất béo không được hấp thụ mà bài tiết qua phân. Khi không hấp thụ được chất béo, cơ thể sẽ giảm lượng calo tiêu thụ và buộc phải sử dụng mỡ dự trữ trong cơ thể để đáp ứng nhu cầu năng lượng cho các hoạt động bình thường.

Kết quả ở biểu đồ 3.7 cho thấy so với lô mô hình, các lô sử dụng CKL-THV đều giảm trọng lượng mỡ ($p < 0,05$). CKL-THV là sản phẩm chứa nhiều polyphenol. Các polyphenol đã được chứng minh có thể giúp cải thiện quá trình tiêu hao năng lượng, ngăn cản quá trình trưởng thành của tiền tế bào mỡ thành tế bào mỡ, tăng biểu hiện của adiponectin (một loại hormon do mô mỡ trong cơ thể tiết ra, có vai trò điều chỉnh lượng glucose và phân hủy acid béo) [147]. Tuy nhiên, khi so sánh trọng lượng mỡ tại thời điểm kết thúc thử nghiệm giữa các lô sử dụng CKL-THV với lô sử dụng orlistat, chúng tôi nhận thấy vẫn có

sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$ khi so sánh với lô CKL-THV 0,35 g/kg/24h và $p < 0,01$ khi so sánh với lô CKL-THV 1,05 g/kg/24h). Điều này cho thấy tác dụng làm giảm trọng lượng mỡ của CKL-THV vẫn kém hơn so với orlistat.

Ảnh hưởng của CKL-THV tới chỉ số mỡ cơ thể và chỉ số béo phì Lee

Để đánh giá tác dụng chống béo phì của CKL-THV, chúng tôi còn đánh giá dựa trên 2 chỉ số nghiên cứu là chỉ số mỡ cơ thể và chỉ số béo phì Lee. Chỉ số mỡ cơ thể là giá trị phần trăm giữa tổng lượng mỡ và trọng lượng cơ thể chuột thí nghiệm. Chỉ số Lee được xác định là tỷ số giữa căn bậc ba của trọng lượng và chiều dài tính từ mũi đến hậu môn chuột. Việc sử dụng 2 chỉ số này để đánh giá tác dụng chống trị béo phì của chế phẩm cũng được sử dụng trong nhiều nghiên cứu [137], [148], [149].

Kết quả nghiên cứu ở biểu đồ 3.6 và 3.8 cho thấy tại thời điểm kết thúc thử nghiệm, chỉ số mỡ cơ thể chuột và chỉ số béo phì Lee ở lô mô hình tăng rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,001$). Sự tăng lượng calo và chất béo trong chế độ ăn HFD tạo điều kiện cho việc tích trữ năng lượng dư thừa dưới dạng mỡ. Theo các kết quả nghiên cứu về trọng lượng cơ thể (biểu đồ 3.1, 3.2) và trọng lượng mỡ (biểu đồ 3.7), chế độ ăn HFD làm tăng trọng lượng mỡ nội tạng, do vậy sẽ làm tăng chỉ số mỡ của cơ thể. Ngoài ra, do chiều dài chuột thay đổi không nhiều trong suốt thời gian thử nghiệm, nên chỉ số Lee của chuột cũng tăng cao.

Kết quả ở biểu đồ 3.6 và 3.8 cho thấy lô sử dụng orlistat làm giảm cả chỉ số mỡ và chỉ số béo phì Lee so với lô mô hình với mức ý nghĩa thống kê lần lượt là $p < 0,01$ và $p < 0,001$. Orlistat tác động thông qua cơ chế ức chế hấp thu chất béo bằng cách ức chế enzym lipase tụy. Các lô sử dụng CKL-THV đều có sự khác biệt về chỉ số mỡ và chỉ số Lee so với lô chứng ($p < 0,01$ đến $p < 0,001$). Tuy nhiên, khi so sánh với lô mô hình, chỉ có sự thay đổi về chỉ số Lee là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

Đánh giá sâu hơn về sự thay đổi chỉ số béo phì Lee của chuột ở các lô nghiên cứu theo thời gian, chúng tôi nhận thấy chỉ số Lee của chuột ở lô mô hình tăng 8,28% so với thời điểm bắt đầu thử nghiệm chính thức. Việc tăng chỉ số Lee theo thời gian phản ánh tình trạng béo phì tiến triển. Chuột được tiếp xúc thường xuyên với chế độ ăn HFD tạo điều kiện thuận lợi cho việc tăng hấp thụ chất béo, tích tụ mỡ, tăng số đo vòng bụng, tăng trọng lượng cơ thể. Chỉ số Lee của chuột sử dụng CKL-THV giảm từ 1,37 đến 1,66% so với thời điểm bắt đầu thử nghiệm chính thức. Chỉ số Lee được đánh giá phụ thuộc vào số đo cân nặng và chiều dài cơ thể chuột. Theo kết quả ở biểu đồ 3.2, sau 8 tuần, trọng lượng chuột ở các lô sử dụng CKL-THV đều giảm so với lô mô hình. Trong khi đó, các chuột nghiên cứu đều là chuột trưởng thành, chiều dài chuột thay đổi không đáng kể trong suốt thời gian nghiên cứu. Do trọng lượng cơ thể chuột giảm trong khi chiều dài thay đổi không đáng kể dẫn đến giảm chỉ số Lee.

Trong các nghiên cứu về tác dụng chống béo phì của Trà hoa vàng, chỉ có loài *Camellia nitidissima* đã công bố có tác dụng làm giảm chỉ số Lee ($p<0,05$) và một số chỉ số mỡ như chỉ số mỡ mào tinh hoàn ($p<0,01$), chỉ số mỡ sau phúc mạc ($p<0,01$) so với lô mô hình khi cho chuột béo phì sử dụng chiết xuất ethanol của hoa với các liều 75 mg/kg/24h, 150 mg/kg/24h và 300 mg/kg/24h [131]. Trong nghiên cứu của luận án, chúng tôi cũng nhận thấy có sự tương đồng về tác dụng của CKL-THV *Camellia hakodae* liều 0,35 và 1,05 g/kg/24h trên chỉ số Lee so với chiết xuất ethanol của hoa *Camellia nitidissima*. Các lô sử dụng CKL-THV đều giảm chỉ số Lee so với lô chứng và lô mô hình ($p<0,001$). Nghiên cứu về chỉ số mỡ, chúng tôi mới chỉ đánh giá được ảnh hưởng của CKL-THV trên chỉ số mỡ chung của cơ thể chứ chưa đánh giá được ảnh hưởng trên từng phần mỡ khác nhau của cơ thể như chỉ số mỡ mào tinh hoàn, chỉ số mỡ sau phúc mạc... Các lô sử dụng CKL-THV đều có sự khác biệt về chỉ số mỡ chung của cơ thể ($p<0,01$), tuy nhiên, khi so sánh với lô mô hình, chưa nhận thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Ảnh hưởng của CKL-THV tới trọng lượng các cơ quan

Kết quả ở bảng 3.13 cho thấy ở lô mô hình, trọng lượng tuyệt đối của các tạng tim, gan, thận, lách của chuột đều tăng so với lô chứng ($p < 0,001$). Chế độ ăn HFD gây tăng trọng lượng cơ thể, đồng thời làm tăng sự tích tụ mỡ trong cơ thể. Do vậy, các hoạt động trao đổi chất của cơ thể cũng như hoạt động của các hệ cơ quan cũng phải thay đổi theo: Tim tăng trọng lượng do phải làm việc nhiều hơn để bơm máu đến các cơ quan trong cơ thể; Gan cần cho quá trình dự trữ mỡ và quá trình chuyển hóa lipid; Thận và lách tăng kích thước do tác động gián tiếp từ sự thay đổi trong các cơ chế lọc và chuyển hóa.

Trọng lượng các tạng ở lô sử dụng orlistat và CKL-THV đều giảm so với lô mô hình ($p < 0,001$). Việc giảm trọng lượng các tạng liên quan đến việc giảm trọng lượng cơ thể chuột được điều trị bằng orlistat hoặc CKL-THV.

Khi so sánh với lô sử dụng orlistat, tác dụng làm giảm trọng lượng các tạng tim, gan, thận lách của lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h đều có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên khi sử dụng liều cao (1,05 g/kg/24h), trọng lượng các tạng gan, thận, lách giảm tương đương với lô orlistat, chỉ ghi nhận thấy sự khác biệt về mức giảm trọng lượng của tạng tim. Như vậy, CKL-THV có tác dụng làm giảm trọng lượng tim, gan, thận, lách ở chuột béo phì. Lô sử dụng CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h có tác dụng tương đương với orlistat về việc giảm trọng lượng các tạng gan, thận, lách.

Trọng lượng tương đối của các tạng phản ánh mức độ thay đổi của các tạng trong cơ thể so với sự thay đổi tổng thể về trọng lượng cơ thể. Khi tổng trọng lượng cơ thể tăng, trọng lượng tuyệt đối của các tạng có thể tăng lên, nhưng trọng lượng tương đối của các tạng thì chưa chắc có sự thay đổi. Khi đánh giá trọng lượng tương đối của các tạng ở lô mô hình so với lô chứng, chúng tôi chỉ ghi nhận có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của tạng tim và gan. Trọng lượng các tạng thận và lách có tăng so với lô chứng nhưng chưa tạo ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, khi so sánh với lô mô hình, chúng

tôi nhận thấy, chỉ có lô sử dụng orlistat mới làm giảm trọng lượng tương đối của tất cả các tạng tim, gan, thận, lách. Chưa ghi nhận sự khác biệt về trọng lượng tương đối các tạng ở lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h so với lô mô hình. Sử dụng CKL-THV liều cao (1,05 g/kg/24h) chỉ làm giảm trọng lượng tương đối của tạng gan so với lô mô hình ($p < 0,05$), còn các tạng khác không thay đổi. Như vậy, CKL-THV ảnh hưởng không nhiều đến trọng lượng tương đối của các tạng tim, gan, thận, lách của chuột béo phì.

Ảnh hưởng của CKL-THV tới các chỉ số lipid máu

Chế độ ăn giàu chất béo HFD làm thay đổi mạnh mẽ các chỉ số lipid máu của chuột. Kết quả nghiên cứu ở biểu đồ 3.9, 3.10 và 3.11 cho thấy ở lô mô hình, HFD làm tăng các chỉ số cholesterol toàn phần, triglycerid, LDL-C và non HDL-C, giảm chỉ số HDL-C có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,001$). Lý do dẫn đến các thay đổi trên có thể được giải thích như sau:

(1) Tăng cholesterol toàn phần: Khi ăn nhiều chất béo, gan sẽ tăng tổng hợp cholesterol để tạo ra các lipoprotein như LDL và VLDL, vận chuyển cholesterol và triglycerid, do vậy nồng độ cholesterol toàn phần tăng lên. Đồng thời, HFD còn làm giảm sự bài tiết cholesterol ra ngoài cơ thể, góp phần vào việc duy trì mức cholesterol cao trong máu.

(2) Tăng triglycerid: Chế độ ăn giàu chất béo làm tăng nồng độ TG trong máu qua nhiều cơ chế. Các acid béo từ thức ăn được hấp thụ và chuyển hóa tại gan thành triglycerid, sau đó được bao bọc trong VLDL và giải phóng vào máu. HFD kích thích gan sản xuất nhiều VLDL, đồng thời làm giảm hoạt động của lipoprotein lipase, enzym phân giải lipid trong máu dẫn đến sự tích tụ TG. Ngoài ra, HFD còn gây kháng insulin, làm tăng sản xuất TG tại gan. Do vậy, nồng độ TG trong máu tăng cao, có thể dẫn đến các rối loạn chuyển hóa. Ngoài ra, ảnh hưởng của béo phì đến chuyển hóa lipid còn phụ thuộc vào vị trí của mô mỡ. Tăng mô mỡ nội tạng và mô mỡ dưới da ở phần thân trên có liên quan đến mức tăng TG [150].

(3) Tăng LDL-C và non HDL-C: Do chế độ ăn HFD kích thích gan sản xuất nhiều LDL-C và VLDL để vận chuyển cholesterol và triglycerid nên nồng độ các chất này tăng lên. Ngoài ra, HFD cũng làm giảm thải LDL-C ra ngoài nên mức LDL-C trong máu tăng cao hơn. Non HDL-C là tổng của tất cả các loại lipoprotein không phải HDL, bao gồm LDL, VLDL (chủ yếu) và LDL. Do vậy, nồng độ non HDL-C cũng tăng cao trong máu.

(4) Giảm HDL-C: Chế độ ăn giàu chất béo gây ảnh hưởng tiêu cực đến chỉ số HDL-C, một cholesterol tốt trong máu. Khi ăn nhiều chất béo, đặc biệt là các chất béo bão hòa, cơ thể sẽ bị kháng insulin và tăng đề kháng insulin. Điều này làm giảm khả năng của gan trong việc điều hòa và tổng hợp lipoprotein, bao gồm HDL, lipoprotein có chức năng vận chuyển cholesterol dư thừa từ các mô về gan. Bên cạnh đó, HFD còn làm giảm hoạt động của enzym LCAT, enzym có vai trò trong việc hình thành HDL từ các lipoprotein khác. Khi LCAT giảm, quá trình tổng hợp HDL bị ảnh hưởng dẫn đến mức HDL-C máu giảm. Ngoài ra, việc tăng mỡ nội tạng do HFD có thể làm giảm chuyển hóa và bài tiết cholesterol qua HDL, góp phần làm giảm HDL tại gan.

Những thay đổi trên phản ánh tình trạng rối loạn chuyển hóa lipid và kháng insulin do chế độ ăn nhiều chất béo gây ra. Điều này có thể dẫn đến tăng nguy cơ mắc các bệnh tim mạch và các bệnh liên quan chuyển hóa khác.

Kết quả nghiên cứu cho thấy lô sử dụng orlistat làm giảm các chỉ số TC, TG, LDL-C, non HDL-C và tăng chỉ số HDL-C so với lô mô hình ($p < 0,001$). Như vậy, orlistat có tác dụng tích cực trong việc cải thiện các chỉ số lipid máu trên chuột bị gây béo phì. Orlistat là thuốc ức chế enzym lipase tụy, giúp ngăn cản quá trình phân hủy chất béo từ ruột, từ đó làm giảm hấp thu lipid từ thức ăn. Khi chất béo không được tiêu hóa và hấp thu hoàn toàn, nồng độ các lipid máu như TC, TG, LDL-C và non HDL-C giảm. Điều này giúp giảm sự tích tụ mỡ trong cơ thể, giảm nguy cơ mắc các bệnh tim mạch. Ngoài ra, orlistat cũng làm tăng mức HDL-C. HDL-C có vai trò vận chuyển cholesterol dư thừa từ các

mô và mạch máu về gan để đào thải ra ngoài cơ thể, từ đó giảm nguy cơ xơ vữa động mạch. Việc tăng HDL-C và giảm các chỉ số TC, TG, LDL-C, non HDL-C chứng tỏ orlistat có tác dụng rất tốt trong cải thiện chỉ số lipid máu, đồng thời góp phần làm giảm các yếu tố nguy cơ tim mạch, mang lại hiệu quả tích cực cho việc điều trị béo phì.

Các lô sử dụng CKL-THV cũng làm giảm các chỉ số TC, TG, LDL-C, non HDL-C, tăng HDL-C so với lô mô hình có ý nghĩa thống kê. CKL-THV là chế phẩm giàu polyphenol. Đây là nhóm chất thực vật có tính chất chống oxy hóa mạnh mẽ, có tác dụng chống viêm, giảm stress oxy hóa, giúp cải thiện chức năng tim mạch. Polyphenol được chứng minh có tác dụng kích hoạt AMPK (protein kinase hoạt hóa mono phosphat 5' adenosin) dẫn đến làm giảm cholesterol, tổng hợp acid béo và hình thành triglycerid [147].

Kết quả nghiên cứu ở các biểu đồ 3.9, 3.10, 3.11 cho thấy tác dụng làm giảm TC, TG, LDL-C, non HDL-C của CKL-THV trên chuột béo phì vẫn yếu hơn so với orlistat, tuy nhiên tác dụng làm tăng HDL-C lại tương đương. Đồng thời, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về các chỉ số TC, TG, LDL và non HDL giữa 2 lô sử dụng CKL-THV liều 0,35 và 1,05 g/kg/24h chứng tỏ tác dụng giảm lipid máu của CKL-THV có liên quan đến liều lượng. CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h có hiệu quả trên các chỉ số lipid máu tốt hơn liều 0,35 g/kg/24h.

Khi so sánh với các nghiên cứu khác, chúng tôi nhận thấy tác dụng cải thiện chỉ số lipid máu trên chuột béo phì gây bởi chế độ ăn HFD của một số loài Trà hoa vàng cũng được ghi nhận như *Camellia euphlebia*, *Camellia nitidissima* và *Camellia flava* [130], [131], [151]. Khi sử dụng cao chiết ethanol từ hoa của *Camellia euphlebia* liều 100 và 400 mg/kg/24h hoặc cao chiết nước từ hoa *Camellia euphlebia* liều 400 mg/kg/24h đều làm giảm đáng kể nồng độ TC, TG và LDL-C, đồng thời làm tăng nồng độ HDL-C ở chuột nhắt béo phì sau 4 tuần [130]. Sử dụng chiết xuất ethanol của hoa *Camellia nitidissima* liều 75, 150 và 300 mg/kg/24h trên chuột cống trắng gây béo phì, sau 4 tuần làm

giảm nồng độ TC và TG, đồng thời chỉ số HDL/LDL-C của chuột lại tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình [131]. Trong nghiên cứu gần đây của Nguyễn Hữu Lạc Thủy và cộng sự trên loài Trà hoa vàng *Camellia flava*, khi cho chuột nhắt trắng béo phì sử dụng cao đặc chiết xuất từ hoa (liều 0,1 g/kg/24h) và cao đặc chiết xuất từ lá (liều 1,0 g/kg/24h) trong 30 ngày làm giảm nồng độ TC và LDL máu chuột so với lô mô hình. Tuy nhiên, chỉ ghi nhận sự giảm nồng độ TG ở lô sử dụng cao hoa, còn lô dùng cao lá thì không làm giảm TG. Riêng chỉ số HDL-C, cả cao hoa và cao lá Trà hoa vàng *Camellia flava* đều không gây ảnh hưởng đáng kể [151]. Trên loài Trà hoa vàng *Camellia hakodae*, hiện mới chỉ ghi nhận tác dụng giảm nồng độ TC, TG và LDL-C khi sử dụng dưới dạng hỗn hợp dịch chiết lá với dược liệu giảo cổ lam [14]. Như vậy, các chế phẩm chiết xuất từ các loài Trà hoa vàng khác nhau đều có tác dụng chống béo phì. Mỗi chế phẩm thể hiện đặc tính và tác dụng trên các chỉ số lipid máu của chuột béo phì với liều lượng và hiệu quả khác nhau. CKL-THV *Camellia hakodae* là một chế phẩm chiết xuất theo phương pháp hiện đại, không chỉ có tác dụng giảm các chỉ số lipid máu mà còn làm giảm cân, giảm chỉ số béo phì Lee trên chuột béo phì nên rất có tiềm năng trong điều trị.

4.2.2. Về tác dụng hạ lipid máu in vivo

Quá trình chuyển hóa lipid trong cơ thể xảy ra chủ yếu theo hai con đường nội sinh và ngoại sinh. Khoảng 30% cholesterol trong cơ thể có nguồn gốc ngoại sinh do chế độ ăn cung cấp, còn 70% cholesterol trong cơ thể có nguồn gốc nội sinh được tổng hợp ở gan. Do vậy, để đánh giá các chế phẩm có tác dụng hạ lipid máu, cần tiến hành nghiên cứu trên các mô hình động vật đã được gây tăng lipid máu theo con đường nội sinh hoặc ngoại sinh.

Trong đánh giá rối loạn lipid máu, các chỉ số lipid máu cơ bản như cholesterol toàn phần, triglycerid, HDL-C và đặc biệt là LDL-C đều được phân tích. Chỉ số LDL-C từ lâu đã được coi như một đích điều trị của các bệnh lý tim mạch và rối loạn lipid máu. Theo một nghiên cứu dịch tễ học toàn cầu, nồng

độ LDL-C tăng cao trong huyết tương là yếu tố nguy cơ tử vong thứ 8 vào năm 2019 [6]. Ngoài LDL-C, chỉ số non HDL-C cũng được cho là có liên quan mật thiết tới nguy cơ mắc bệnh tim mạch. Thậm chí, một nghiên cứu mới đây còn cho thấy giá trị non HDL-C được cho là có liên quan tới nguy cơ mắc bệnh tim mạch cao hơn giá trị LDL-C [152]. Do vậy, để đánh giá tác dụng điều trị rối loạn lipid máu, chúng tôi phân tích dựa trên các chỉ số TC, TG, HDL-C và 2 giá trị được suy ra từ công thức Friedewald là LDL-C và non HDL-C.

Statin là thuốc được lựa chọn hàng đầu trong điều trị rối loạn lipid máu, có vai trò quan trọng cho cả mục tiêu LDL-C và non HDL-C, đồng thời giúp giảm các biến cố tim mạch. Chiến lược sử dụng statin được khuyến cáo dựa trên mức độ làm giảm LDL-C máu [43]. Các statin có tác dụng điều trị rối loạn lipid máu bằng cách ức chế cạnh tranh với HMG-CoA reductase, từ đó ngăn chặn con đường tổng hợp cholesterol trong tế bào. Ngoài ra, statin còn làm tăng tổng hợp LDL receptor ở màng tế bào, thúc đẩy quá trình nhập LDL vào trong tế bào và thải trừ lipid qua enzym ở lysosom. Các statin tuy có chung cơ chế tác dụng nhưng do ái lực với HMG-CoA reductase khác nhau nên các loại statin khác nhau có mức độ giảm LDL-C khác nhau và các liều statin khác nhau cũng có tỷ lệ giảm khác nhau [43]. Atorvastatin là một dẫn chất thuộc nhóm statin, được sử dụng rộng rãi để giảm cholesterol và ngăn ngừa bệnh tim mạch. Đồng thời, trong các thử nghiệm tiền lâm sàng, atorvastatin thường được dùng làm thuốc chứng dương trong các mô hình nghiên cứu các thuốc có tác dụng hạ lipid máu. So với các statin khác trong cùng nhóm, atorvastatin có hiệu lực cao trong việc giảm LDL-C, có thể giảm tới hơn 50% LDL-C nếu dùng với liều cao từ 40 - 80 mg/ngày, giảm từ 30 - 49% nếu dùng với liều 10 – 20 mg/ngày [43]. Dựa trên nhiều bằng chứng khác nhau, Meor và cộng sự đã so sánh được tác động của các statin theo liều dùng lên các chỉ số lipid, đặc biệt ở người châu Á. Nghiên cứu cho thấy atorvastatin cho hiệu quả giảm LDL-C và TG tốt hơn các chế phẩm trong cùng nhóm như simvastatin, pitavastatin, pravastatin, lovastatin

và fluvastatin [44]. Do đó, atorvastatin thường là lựa chọn tốt hơn cho những bệnh nhân có nguy cơ cao về tim mạch hoặc cần giảm mạnh cholesterol, đặc biệt là LDL-C. Về dược động học, mặc dù sinh khả dụng chỉ 12% nhưng atorvastatin có thời gian đạt nồng độ tối đa trong máu nhanh (1-2 giờ), và đặc biệt, thời gian bán thải dài hơn các thuốc khác trong cùng nhóm (14 giờ) [153]. Do đó, atorvastatin có khả năng duy trì nồng độ thuốc trong máu suốt 24 giờ, chỉ dùng 01 lần / ngày vào buổi sáng mà không cần phải dùng vào buổi tối như simvastatin hay lovastatin. Hơn nữa, atorvastatin thường có nhiều dạng thuốc generic với giá thành phải chăng, có thể là một lựa chọn kinh tế mà vẫn đảm bảo hiệu quả điều trị cao cho bệnh nhân. Với các ưu điểm nổi trội trên, trong các nghiên cứu *in vivo* về tác dụng điều trị rối loạn lipid máu, chúng tôi đã lựa chọn atorvastatin làm thuốc chứng dương để đánh giá tác dụng của CKL-THV.

4.2.2.1. Tác dụng điều trị rối loạn lipid máu nội sinh

Về kết quả gây mô hình động vật tăng lipid máu nội sinh

Theo con đường nội sinh, các tác nhân thường được sử dụng để gây tăng lipid máu là poloxamer P-407, tween 80 hoặc triton WR-1339. Mô hình gây tăng lipid máu bằng P-407 là phương pháp phổ biến và nhanh chóng giúp đánh giá hiệu quả của một thuốc mới hoặc sản phẩm mới có tác dụng điều trị rối loạn lipid máu [71], [67]. Ngoài ra, P-407 được cho là an toàn hơn và không gây độc tính trên động vật thực nghiệm như các tác nhân khác. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn poloxamer 407 như một chất xúc tác để gây mô hình rối loạn lipid máu nội sinh trên chuột nhắt trắng chủng Swiss.

Kết quả nghiên cứu cho thấy chuột ở tất cả các lô tiêm poloxamer P-407 đều ăn uống, vận động, bài tiết bình thường. P407 gây ức chế lipoprotein lipase huyết tương và cholesterol 7 α hydroxylase, làm tăng số lượng và hoạt động của 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzym A reductase, giảm số lượng receptor LDL tại gan. Do vậy, khi sử dụng P407 gây rối loạn lipid máu sẽ làm tăng cả cholesterol và triglycerid máu [67], [68]. Kết quả nghiên cứu ở lô mô hình cho

thấy có sự khác biệt rõ rệt về chỉ số lipid máu chuột so với lô chứng. Không chỉ nồng độ TC, TG mà cả nồng độ LDL-C và non HDL-C trong máu chuột ở lô mô hình đều tăng có ý nghĩa so với lô chứng ($p < 0,01$). Trong đó, nồng độ LDL-C tăng mạnh nhất (42,1%), tiếp theo là non HDL-C (tăng 36,8%), nồng độ TC (25,5%) và cuối cùng là TG (22,4%) so với lô chứng. Tuy nhiên, chưa có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê so với lô chứng về nồng độ HDL-C ($p > 0,05$). Như vậy, chúng tôi đã gây thành công mô hình rối loạn lipid máu nội sinh trên chuột nhắt trắng bằng P-407.

Về ảnh hưởng của CKL-THV lên các chỉ số lipid máu trong mô hình nội sinh

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.16 cho thấy cả hai liều CKL-THV (0,6 g/kg/24h và 1,8 g/kg/24h) đều có tác dụng cải thiện rõ rệt các chỉ số lipid máu trên mô hình chuột rối loạn lipid máu bởi P-407. Đây là mô hình thực nghiệm thường được sử dụng để sàng lọc nhanh các chất có khả năng ức chế enzym HMG-CoA reductase. Trong mô hình này, P-407 gây tăng mạnh tổng hợp cholesterol nội sinh, do đó việc CKL-THV làm giảm cholesterol toàn phần, giảm LDL-C và non HDL-C có thể phản ánh gián tiếp khả năng ức chế cho đường sinh tổng hợp cholesterol nội sinh. Cụ thể, nồng độ cholesterol toàn phần ở hai lô sử dụng CKL-THV lần lượt giảm 26,5% và 28,3% so với lô mô hình. Mức giảm triglycerid dao động từ 17,3% đến 21,2%. Đáng chú ý, cả hai liều CKL-THV đều làm giảm đáng kể LDL-C (34,3% và 38,4%), đồng thời làm giảm non HDL-C (31,1% và 33,8%). Mặc dù không có sự gia tăng HDL-C, việc duy trì chỉ số này ở mức tương đương với lô mô hình (giảm nhẹ 7%) cho thấy CKL-THV không ảnh hưởng đến các cholesterol tốt. So sánh với lô tham chiếu sử dụng atorvastatin – một thuốc điển hình ức chế HMG-CoA reductase – cho thấy hiệu quả của CKL-THV trên các chỉ số TC, TG, LDL-C và non HDL-C là tương đương, thậm chí có xu hướng vượt trội ở liều cao. Điều này gợi ý rằng CKL-THV có thể tác động lên cùng con đường chuyển hóa lipid, cụ thể là ức chế enzym HMG-CoA reductase.

Về mặt hóa học, nhóm hợp chất chính được tìm thấy trong lá Trà hoa vàng là polyphenol, có đặc tính chống oxy hóa mạnh và được chứng minh có tác dụng chống ung thư, chống viêm, giảm cân và hạ lipid máu [8], [9], [10]. Các hợp chất flavonoid và triterpenoid cũng là những ứng viên tiềm năng góp phần vào tác dụng làm giảm lipid máu [154], [155], [156]. Do đó, cần có nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học của CKL-THV để xác định được hoạt chất chính có liên quan đến tác dụng sinh học.

Như vậy, tác dụng hạ lipid máu theo cơ chế nội sinh của CKL-THV tương đương với atorvastatin và không phụ thuộc vào liều lượng. Kết quả này là căn cứ tiền đề để tiến hành những nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác dụng điều trị rối loạn lipid máu của CKL-THV.

4.2.2.2. Tác dụng điều trị rối loạn lipid máu ngoại sinh

Về kết quả gây mô hình động vật tăng lipid máu ngoại sinh

Theo con đường ngoại sinh, chúng tôi xây dựng mô hình dựa trên vai trò của các chất béo ngoại sinh trong chế độ ăn uống giàu năng lượng. Nhìn chung, các mô hình gây tăng lipid máu ngoại sinh tương đối giống tình trạng rối loạn lipid máu do ăn uống ở người, dễ thực hiện, và được sử dụng khá phổ biến. Tuy nhiên thời gian nghiên cứu thường dài, phải theo dõi liên tục để đánh giá được quá trình tăng lipid máu. Do đó chúng tôi lựa chọn đối tượng nghiên cứu là chuột cống trắng chủng *Wistar*. Chuột cống trắng trưởng thành thường không đáp ứng với việc bổ sung chỉ riêng cholesterol vào chế độ ăn. Do vậy, cần bổ sung thêm acid mật giúp tăng cường sự hấp thu cholesterol qua ruột, đồng thời bổ sung thêm hormon kháng giáp trạng để chỉ số cholesterol máu tăng cao rõ rệt và ổn định hơn. Tác giả Nguyễn Trọng Thông và cộng sự [75] đã cải tiến phương pháp gây tăng lipid máu trên động vật thí nghiệm của Nassiri [74], bằng cách điều chỉnh thành phần hỗn hợp dầu cholesterol (giảm lượng acid cholic xuống 10 lần, giảm lượng propyl thiouracil 6 lần). Mô hình này đã được nghiên cứu thành công, cho thấy tính khả thi cao, đồng thời chi phí nghiên cứu lại rẻ

hơn so với mô hình ban đầu. Do vậy, phương pháp này được chúng tôi lựa chọn để gây tình trạng rối loạn lipid máu theo con đường ngoại sinh trên động vật thực nghiệm. Từ đó, nghiên cứu tác dụng hạ cholesterol máu theo con đường ngoại sinh của chế phẩm nghiên cứu.

Kết quả nghiên cứu về chỉ số lipid máu (TC, TG, LDL-C, non HDL-C) ở lô mô hình cho thấy chuột cống trắng bắt đầu thể hiện tình trạng rối loạn lipid máu ngay sau 2 tuần sử dụng hỗn hợp dầu cholesterol. Cụ thể, so với lô chứng, ở lô mô hình nồng độ TC, LDL-C và non HDL-C tăng rõ rệt ($p < 0,001$), nồng độ TG tăng ($p < 0,01$). Sau 4 tuần, toàn bộ các chỉ số lipid máu trên đều tăng so với lô chứng với mức ý nghĩa $p < 0,001$. Chế độ ăn có bổ sung lượng cholesterol dư thừa làm tăng lượng cholesterol trên màng lưới nội chất tế bào gan, giảm LDL-R nên làm tăng LDL-C trong huyết tương. Sự có mặt của acid cholic làm tăng hấp thu cholesterol, đồng thời làm giảm tổng hợp acid mật từ cholesterol tự do. Cholesterol tự do được ester hóa để dự trữ, LDL-R bị thoái giáng dẫn đến tăng cholesterol và LDL trong máu. Thuốc kháng giáp trạng propylthiouracil làm nồng độ cholesterol huyết thanh tăng mạnh hơn.

Như vậy, chúng tôi đã xây dựng thành công mô hình chuột rối loạn lipid máu ngoại sinh trên chuột cống trắng bằng chế độ ăn giàu cholesterol. Các chuột biểu hiện rõ tình trạng rối loạn lipid máu thông qua các chỉ số TC, TG, LDL và non HDL.

Về ảnh hưởng của CKL-THV lên các chỉ số lipid máu

Chuột nghiên cứu tiếp tục được sử dụng chế độ ăn giàu cholesterol, đồng thời sử dụng thêm atorvastatin hoặc CKL-THV. Kết quả nghiên cứu cho thấy so với lô chứng, ở các lô chuột sử dụng CKL-THV và atorvastatin đều có sự tăng các chỉ số lipid máu (TC, TG, LDL và non HDL) với các mức ý nghĩa thống kê khác nhau. Trong đó chỉ số TC, LDL-C và non HDL-C tăng cao và sớm hơn TG. Chỉ số HDL-C của các lô gần như không có thay đổi so với lô chứng trong thời gian nghiên cứu.

Trong nghiên cứu này, atorvastatin được dùng với liều 10mg/kg/24h trên chuột cống trắng, là mức liều quy đổi tương đương với liều có tác dụng trên người. Các kết quả nghiên cứu về chỉ số lipid máu ở lô tham chiếu sử dụng Atorvastatin cho thấy: so với lô mô hình, chuột sử dụng atorvastatin liều 10mg/kg/ngày làm giảm các chỉ số lipid máu bắt đầu từ tuần thứ hai TC, LDL-C và non HDL-C ($p < 0,01$), TG ($p < 0,05$). Sang tới tuần thứ tư, các chỉ số này giảm rõ rệt TC, LDL-C và non HDL-C ($p < 0,001$), TG ($p < 0,05$). Riêng chỉ số HDL-C có tăng theo thời gian, nhưng sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê khi ở tuần thứ tư ($p < 0,05$). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với chuyên luận về tác dụng của atorvastatin làm ngăn cản tổng hợp cholesterol tại tế bào gan do ức chế enzym HMG-CoA reductase, từ đó làm giảm LDL-C, TG và tăng nhẹ HDL-C [48].

Các lô trị sử dụng CKL-THV liều 0,35g/kg/24h và 1,05g/kg/24h cũng cho kết quả làm giảm các chỉ số TC, TG, LDL-C và non HDL-C của chuột trong thời gian nghiên cứu. Sau 2 tuần, so với lô mô hình, CKL-THV liều 0,35g/kg/24h làm giảm các chỉ số non HDL-C ($p < 0,01$), TC và LDL-C ($p < 0,05$); Chỉ số TG có giảm nhẹ nhưng không có ý nghĩa ($p < 0,05$). Tuy nhiên, tới tuần thứ 4, tất cả các chỉ số trên đều giảm có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình: LDL-C và non HDL-C ($p < 0,001$), TC ($p < 0,01$), TG ($p < 0,05$). Như vậy, với mức liều 0,35g/kg/24h, CKL-THV làm giảm các chỉ số lipid máu, trong đó TC, LDL-C và non HDL-C có xu hướng giảm sớm và mạnh hơn TG. Mức liều này không làm ảnh hưởng tới chỉ số HDL-C của chuột trong suốt thời gian nghiên cứu.

Trong khi đó, ở lô chuột sử dụng CKL-THV liều 1,05g/kg/24h, tất cả các chỉ số lipid máu đều thay đổi có ý nghĩa so với lô mô hình ngay sau tuần thứ hai sử dụng: TC, LDL-C và non HDL-C ($p < 0,01$), TG ($p < 0,05$). Sang tới tuần thứ tư, xu hướng giảm các chỉ số mạnh hơn TC, LDL-C và non HDL-C ($p < 0,001$), TG ($p < 0,01$). Riêng chỉ số HDL-C trung bình của chuột tăng so với

lô mô hình tại cả hai thời điểm xét nghiệm sau 2 tuần và sau 4 tuần với mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$. Như vậy, với mức liều 1,05g/kg/24h, CKL-THV làm giảm tất cả các chỉ số lipid máu, trong đó TC, LDL-C và non HDL-C có xu hướng giảm mạnh hơn TG. Mức liều này có làm ảnh hưởng tới chỉ số HDL-C, làm tăng nồng độ cholesterol tốt trong máu chuột trong thời gian nghiên cứu ngay sau 2 tuần. Việc làm tăng HDL-C - một chỉ số bảo vệ tim mạch quan trọng – rất có ý nghĩa, điều này có thể bắt nguồn từ khả năng điều hòa chuyển hóa lipid toàn diện của CKL-THV, đặc biệt là nhờ các polyphenol có trong cao. Polyphenol được chứng minh có khả năng hoạt hóa enzyme LCAT xúc tác quá trình ester hóa cholesterol tự do trong HDL, giúp tăng trưởng và trưởng thành HDL-C [157].

Khi so sánh chỉ số lipid máu giữa các lô sử dụng CKL-THV liều 0,35g/kg/24h và 1,05g/kg/24h sau 2 tuần và sau 4 tuần, chúng tôi nhận thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So với lô tham chiếu sử dụng atorvastatin liều 10mg/kg/24h, chỉ số lipid máu ở các lô sử dụng CKL-THV cũng không có sự khác biệt. Như vậy, tác dụng hạ lipid máu theo con đường ngoại sinh của CKL-THV tương đương với atorvastatin liều 10mg/kg/24h, và không phụ thuộc vào liều 0,35g/kg/24h hay 1,05g/kg/24h. Kết quả này góp phần khẳng định về tác dụng làm giảm các chỉ số cholesterol xấu của chế phẩm cao khô chiết xuất từ lá Trà hoa vàng.

Các kết quả nghiên cứu về tác dụng hạ lipid máu của CKL-THV theo con đường nội sinh và ngoại sinh hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đó về Trà hoa vàng. Theo Trần Ninh và cộng sự, sử dụng Trà hoa vàng giúp giảm đến 35% hàm lượng cholesterol trong máu [11]. Các chế phẩm chiết xuất từ các loài Trà hoa vàng khác nhau cũng được chứng minh có tác dụng làm giảm nồng độ TC, TG và LDL-C như cao chiết nước và cao chiết ethanol từ hoa *Camellia euphlebia*, chiết xuất ethanol của hoa *Camellia nitidissima*, cao đặc chiết xuất từ hoa và cao đặc chiết xuất từ lá *Camellia flava* [130], [131],

[151]... Nghiên cứu về thành phần hóa học của Trà hoa vàng cho thấy các hợp chất chính tương tự như trà xanh như phenolic, flavonoid, saponin, polysaccarid, acid amin và tinh dầu đều xuất hiện trong các mẫu hoa và lá trà [7], [8]. Trong đó polyphenol là hợp chất quan trọng nhất có tác dụng chống oxy hóa, chống ung thư, chống viêm, giảm cân và hạ lipid máu [8], [9], [10]. Nguyễn Thanh Tuyền và cộng sự đã tìm thấy trong lá Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh có chứa polyphenol loại flavonid, đồng thời cũng đã phân lập được các hợp chất terpenoid (9 dẫn xuất triterpen pentacyclic và 2 dẫn xuất triterpen ursan) trong lá trà [122], [123]. Các hợp chất polyphenol và terpenoid đều có tiềm năng trong việc giảm cân và hạ lipid máu [8], [9], [10]. Trên thực nghiệm, Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh hiện mới chỉ được nghiên cứu sử dụng dưới dạng hỗn hợp dịch chiết nước của lá với dược liệu giao cổ lam trên chuột nhắt béo phì. Sau 2 tuần sử dụng, nồng độ TC và TG của chuột giảm đáng kể so với thời điểm trước nghiên cứu [132]. Ngoài ra, trên lâm sàng, một dạng chế phẩm khác từ lá Trà hoa vàng *Camellia hakodae* cũng được nghiên cứu sử dụng là dạng dịch chiết nước, điều chế theo phương pháp hãm. Lá Trà hoa vàng Hakodae được sấy khô bằng công nghệ sấy lạnh ở nhiệt độ 35°C, độ ẩm 5%. Sau đó lấy 20g lá khô hãm với nước sôi 100°C trong 30 phút bằng bình giữ nhiệt. Các bệnh nhân được chẩn đoán rối loạn lipid máu nguyên phát sử dụng dịch chiết lá Trà hoa vàng trên thay nước lọc hàng ngày. Sau 30 ngày, kết quả nghiên cứu cho thấy, nồng độ cholesterol toàn phần, triglycerid và LDL-C của bệnh nhân giảm đáng kể so với trước khi nghiên cứu ($p < 0,001$) [14]. Như vậy, Trà hoa vàng *Camellia hakodae* dù là dạng dịch chiết hay cao khô, sử dụng đơn độc hay dưới dạng phối hợp cũng đều có tác dụng hạ lipid máu.

4.2.3. Về cơ chế tác dụng *in vitro*

Các kết quả nghiên cứu trên thử nghiệm *in vivo* đã chứng minh chế phẩm CKL-THV *Camellia hakodae* Ninh có tác dụng chống béo phì và hạ lipid máu. Trong cả hai thử nghiệm trên, CKL-THV thể hiện tác dụng vượt trội trong việc

làm giảm đáng kể chỉ số lipid máu như cholesterol toàn phần, triglycerid, LDL-C và non HDL-C. Những kết quả này không chỉ khẳng định hiệu quả sinh học của chế phẩm mà còn đặt ra câu hỏi về cơ chế phân tử dẫn đến các tác dụng này, điều mà các nghiên cứu *in vivo* chưa thể trả lời được. Do vậy, việc tiến hành nghiên cứu cơ chế tác dụng của CKL-THV trên *in vitro* trở nên cần thiết.

Tác dụng hạ lipid máu có thể liên quan đến một số enzym quan trọng trong quá trình chuyển hóa lipid, ví dụ như lipoprotein lipase (LPL) tham gia vào quá trình phân giải triglycerid trong máu; enzym acetylCoA acetyltransferase (ACAT) xúc tác quá trình ester hóa cholesterol trong tế bào. Ngoài ra, enzym như lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) liên quan đến chuyển hóa HDL cũng có thể là mục tiêu tiềm năng để nghiên cứu. Tuy nhiên, dựa trên đặc điểm làm giảm cholesterol máu rõ rệt trong thử nghiệm *in vivo*, chúng tôi tập trung vào hai enzym HMG-CoA reductase và cholesterol esterase. HMG-CoA reductase là enzym kiểm soát quá trình sinh tổng hợp cholesterol nội sinh tại gan, một mục tiêu quen thuộc của các thuốc statin. Trong khi đó, cholesterol esterase đóng vai trò quan trọng trong việc thủy phân cholesterol ester ở ruột, ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình hấp thu cholesterol từ chế độ ăn. Nghiên cứu *in vitro* sẽ cung cấp bằng chứng trực tiếp về cơ chế tác dụng của chế phẩm CKL-THV, giúp giải thích được tại sao chế phẩm lại có thể giảm lipid máu hiệu quả trong các mô hình *in vivo*. Hơn nữa, việc xác định khả năng ức chế enzym sẽ mở ra hướng đi mới trong việc tối ưu hóa chế phẩm CKL-THV thành một ứng viên tiềm năng cho điều trị bệnh béo phì kèm rối loạn lipid máu trong tương lai.

4.2.3.1. Cơ chế ức chế enzym HMG-CoA reductase

Enzym HMG-CoA reductase là enzym có vai trò chuyển đổi HMG-CoA thành mevalonate, một tiền chất quan trọng trong tổng hợp cholesterol [79]. Sự gia tăng hoạt động của enzym này dẫn đến tăng cholesterol toàn phần và tăng LDL. Do vậy, khi ức chế enzym HMG-CoA reductase sẽ ức chế quá trình tổng

hợp cholesterol tại gan, làm giảm cholesterol máu. Để đánh giá cơ chế tác dụng này, chúng tôi sử dụng bộ kit thương mại sẵn có của Sigma (mã CS1090). Bộ kit sử dụng cơ chất HMG-CoA và phương pháp quang phổ UV-Vis. Đây là phương pháp nhanh chóng và khá đơn giản giúp xác định độ hấp thụ của NADPH trong thời gian diễn ra phản ứng thủy phân HMG-CoA bởi enzyme HMG-CoA reductase. Sự giảm độ hấp thụ của NADPH tại bước sóng 340 nm sẽ phản ánh quá trình chuyển đổi NADPH thành NADP^+ dưới tác động của enzyme, từ đó giúp xác định được hoạt tính của enzyme và khả năng ức chế enzyme của chế phẩm. Chất đối chứng dương sẵn có trong bộ kit là pravastatin, được sử dụng để so sánh với tác dụng ức chế enzyme HMG-CoA reductase của chế phẩm nghiên cứu. Pravastatin cũng là một thuốc thuộc nhóm statin, giống như atorvastatin hay simvastatin, đều có hiệu quả tốt trong việc điều chỉnh lipid máu. Các statin nói chung, đặc biệt là pravastatin là những thuốc có tác dụng mạnh làm giảm cholesterol máu, chúng có thể ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase ngay cả khi sử dụng với nồng độ rất thấp [82], [83].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng dãy các dung dịch CKL-THV có nồng độ tăng dần từ 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$; 37,5 $\mu\text{g/ml}$ tới 50 $\mu\text{g/ml}$ để đánh giá tác dụng ức chế HMG-CoA reductase. Sau khi phản ứng enzyme xảy ra, sử dụng máy quang phổ UV-Vis, đo độ hấp thụ của NADPH theo thời gian. Mức giảm độ hấp thụ NADPH phản ánh hoạt tính của enzyme HMG-CoA reductase trong phản ứng. Kết quả ở biểu đồ 3.17 cho thấy dung dịch chứng âm (dung dịch không có chất ức chế nhưng có enzyme tham gia phản ứng) cho mức giảm độ hấp thụ NADPH lớn nhất. Điều này chứng tỏ tác dụng của enzyme HMG-CoA reductase trong phản ứng là mạnh nhất. Dưới xúc tác của enzyme HMG-CoA reductase, NADPH bị oxy hóa nhiều thành NADP^+ .

Khi có chất ức chế, enzyme xúc tác cho phản ứng thủy phân (HMG-CoA reductase) sẽ bị giảm tác dụng. Do vậy, NADPH ít bị oxy hóa thành NADP^+ hơn, mức giảm độ hấp thụ của NADPH cũng sẽ ít hơn. Chất ức chế càng mạnh,

hoạt tính của enzym HMG-CoA reductase càng giảm, mức giảm độ hấp thụ của NADPH càng nhỏ. Kết quả nghiên cứu ở biểu đồ 3.17 cho thấy pravastatin cho mức giảm độ hấp thụ của NADPH thấp nhất, hoạt độ enzym trong phản ứng cũng thấp nhất. Do vậy, đây cũng chính là chất có tác dụng ức chế enzym HMG-CoA reductase mạnh nhất. Các dung dịch CKL-THV nồng độ từ 12,5 µg/ml đến 50 µg/ml cho mức giảm độ hấp thụ ít dần, hoạt độ enzym HMG-CoA reductase trong phản ứng cũng giảm dần. Điều này chứng tỏ chế phẩm CKL-THV có khả năng ức chế hoạt động của enzym HMG-CoA reductase và khả năng ức chế này có mối liên quan tới nồng độ của dung dịch.

Dựa vào mức giảm độ hấp thụ NADPH trong các phản ứng, chúng tôi tiến hành tính phần trăm ức chế enzym HMG-CoA reductase của CKL-THV ở các nồng độ khác nhau. Kết quả ở bảng 3.17 và biểu đồ 3.18 cho thấy: Khi tăng nồng độ CKL-THV từ 12,5 µg/ml lên 50 µg/ml, phần trăm ức chế enzym HMG-CoA reductase cũng tăng tuyến tính từ 26,5% lên 64,6%. So với chứng dương pravastatin thì khả năng ức chế enzym HMG-CoA reductase vẫn kém hơn. Tuy nhiên kết quả nghiên cứu này bước đầu đã chứng minh được CKL-THV có cơ chế giống với các chế phẩm thuộc nhóm statin.

Trong lá của Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh, Nguyễn Thanh Tuyền và cộng sự đã phân lập và xác định được 7 loại flavonoid, 9 dẫn xuất triterpene pentacyclic và hai dẫn xuất triterpene loại ursane mới [122], [123]. Các hợp chất flavonoid được chứng minh là có thể liên kết với enzym HMG-CoA reductase [158]. Một số hợp chất triterpen cũng đã được nghiên cứu và chứng minh có tác dụng ức chế HMG-CoA reductase [159]. Như vậy, *Camellia hakodae* Ninh được coi là loài có tiềm năng, có tác dụng ức chế enzym HMG-CoA reductase, từ đó ức chế tổng hợp cholesterol trong điều trị rối loạn lipid máu. Trong nghiên cứu này, phần trăm ức chế enzym HMG-CoA reductase của CKL-THV tăng tuyến tính theo nồng độ. Với nồng độ cao nhất (50 µg/ml), CKL-THV có khả năng ức chế enzym HMG-CoA reductase lớn nhất (64,6%).

So sánh với các các nghiên cứu khác, chúng tôi nhận thấy CKL-THV có khả năng ức chế enzym HMG-CoA reductase cao hơn chế phẩm chứa flavonoid khác như chiết xuất lá *Cajanus cajan* (47,87%), chiết xuất *Zingiber officinale* (35,27%) [82], chiết xuất lá rau diếp *Pistia Stratiotes* tinh khiết (34,74%) [81]. Dựa vào tỉ lệ phần trăm ức chế enzym HMG-CoA reductase của các dung dịch CKL-THV, chúng tôi xác định được nồng độ ức chế 50% hoạt tính enzym IC_{50} là 36,37 $\mu\text{g/ml}$. Giá trị này góp phần chứng tỏ CKL-THV có khả năng làm giảm tổng hợp cholesterol nội sinh trong cơ thể, có ý nghĩa tích cực trong điều trị rối loạn lipid máu.

4.2.3.2. Cơ chế ức chế enzym cholesterol esterase

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng cơ chất pNPB để đánh giá tác dụng ức chế enzym cholesterol esterase của CKL-THV. Cơ chất pNPB đã được nhiều tác giả lựa chọn trong nghiên cứu đánh giá tác dụng ức chế enzym cholesterol esterase *in vitro* [87], [90], [91], [92], [93], [94], [95]. Dựa vào độ hấp thụ của sản phẩm phản ứng, có thể đánh giá được tác dụng ức chế enzym cholesterol esterase của CKL-THV. Nếu độ hấp thụ càng lớn thì p-nitrophenol sinh ra càng nhiều, chứng tỏ chế phẩm có tác dụng ức chế enzym kém. Và ngược lại, nếu độ hấp thụ sản phẩm phản ứng càng nhỏ thì tác dụng ức chế enzym của chế phẩm nghiên cứu càng mạnh.

Theo phương pháp của Pietsch và Gutschow [87], ngoài cơ chất pNPB, dung dịch đệm natri phosphat 100 mM, pH 7,0 và dung môi acetonitril, các tác giả còn sử dụng thêm acid taurocholic như một chất nhũ hóa, tạo môi trường thuận lợi để enzym cholesterol esterase hoạt động. Nghiên cứu của Brimo và cộng sự có điều chỉnh về thành phần các dung dịch phản ứng, thay acid taurocholic bằng dung dịch Triton X-100 để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [90]. Acid taurocholic là một acid mật tự nhiên, có vai trò quan trọng trong việc thủy phân lipid và hấp thu chất béo tại ruột. Do có cấu trúc vừa thân nước, vừa thân dầu nên acid taurocholic giúp giảm sức căng bề mặt giữa lipid

và môi trường nước, tạo điều kiện thuận lợi cho enzym cholesterol esterase thủy phân cholesterol ester thành cholesterol tự do và acid béo tại ruột. Trong khi đó, triton X-100 là một chất hoạt động bề mặt tổng hợp, được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm, giúp hòa tan các phân tử kỵ nước và ly giải màng tế bào. Do cũng có tính chất thân nước và thân dầu giống acid taurocholic nên triton X-100 cũng có khả năng hòa tan các lipid khó tan, tạo dung dịch đồng nhất giúp enzym dễ dàng tiếp cận với cơ chất. Mặc dù acid taurocholic là một lựa chọn tự nhiên tối ưu cho các phản ứng enzym liên quan tới lipid, nhưng triton X-100 cũng được coi là một lựa chọn hợp lý trong phòng thí nghiệm bởi tính sẵn có và kinh tế.

Về điều kiện ủ dung dịch phản ứng, so với phương pháp của Pietsch và Gutschow, Brimo và cộng sự cũng tăng thời gian ủ phản ứng trước và sau khi thêm enzym [87], [90]. Việc tăng thời gian ủ trước khi thêm enzym giúp dung môi, chất hoạt động bề mặt và cơ chất hòa tan hoàn toàn và đồng đều. Tăng thời gian ủ sau khi thêm enzym giúp đảm bảo phản ứng enzym có đủ thời gian xảy ra và sản sinh ra lượng p-nitrophenol đủ để đo. Để đánh giá tác dụng ức chế enzym cholesterol esterase của CKL-THV, luận án sử dụng phương pháp của Pietsch và Gutschow, có sửa đổi bởi Brimo và cộng sự.

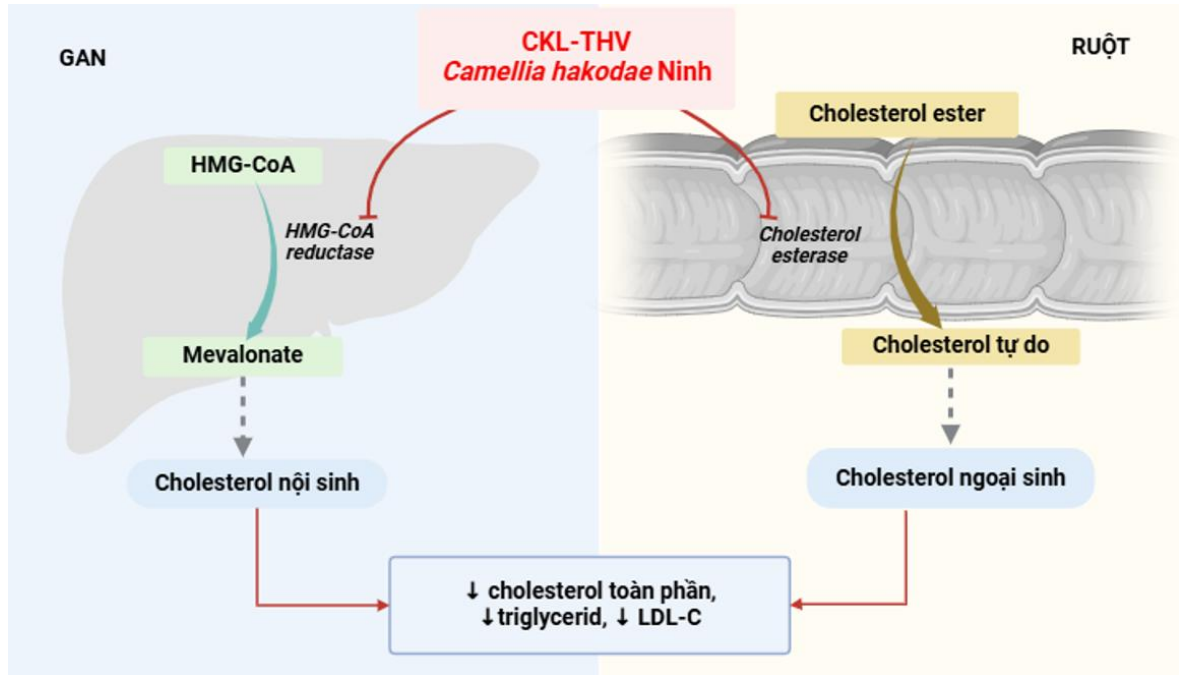
Tiến hành đánh giá tác dụng ức chế enzym cholesterol esterase *in vitro* của dãy các dung dịch CKL-THV có nồng độ tăng dần từ 20 µg/ml, 50 µg/ml; 100 µg/ml; 150 µg/ml tới 200 µg/ml. Sau khi phản ứng enzym xảy ra, sử dụng máy quang phổ UV-Vis để đo độ hấp thụ của sản phẩm phản ứng. Sản phẩm p-nitrophenolat hấp thụ cực đại ánh sáng tử ngoại khả kiến ở bước sóng 405 nm. Để đánh giá tính chính xác và tin cậy của nghiên cứu, chúng tôi lựa chọn cách đo độ hấp thụ trong dải bước sóng từ 350 đến 450 nm. Kết quả ở biểu đồ 3.19 cho thấy các dung dịch sau phản ứng enzym đều hấp thụ cực đại ánh sáng UV-Vis ở bước sóng 405 nm. Khi nồng độ của dung dịch CKL-THV tăng dần (từ 20 µg/ml lên 200 µg/ml) thì độ hấp thụ của p-nitrophenolat cũng giảm dần.

Điều này chứng tỏ chế phẩm CKL-THV có khả năng ức chế hoạt động của enzym cholesterol esterase và khả năng ức chế này có mối liên quan tới nồng độ của dung dịch ức chế.

Dựa vào độ hấp thụ của các sản phẩm sau phản ứng, tính phần trăm ức chế enzym của CKL-THV ở các nồng độ khác nhau. Kết quả ở bảng 3.18 và biểu đồ 3.20 cho thấy: Khi tăng nồng độ CKL-THV từ 20 $\mu\text{g/ml}$ lên 200 $\mu\text{g/ml}$, phần trăm ức chế enzym cholesterol esterase cũng tăng tuyến tính từ 14,4% lên 60,4%. Dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính, chúng tôi đã xác định được giá trị IC_{50} của CKL-THV là 158,5 $\mu\text{g/ml}$. Đây là nồng độ cần thiết để CKL-THV ức chế 50% hoạt tính enzym cholesterol esterase trong thử nghiệm *in vitro* trong phòng thí nghiệm.

Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy lá của Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh có chứa 7 loại flavonoid [122]. Đây là nhóm chất đại diện cho nhóm polyphenol. Các polyphenol được chứng minh có thể cải thiện đáng kể các chỉ số lipid của những bệnh nhân được chẩn đoán mắc rối loạn lipid máu, bao gồm cholesterol toàn phần, triglycerid, LDL cholesterol và HDL cholesterol [160]. Một số nghiên cứu đã chứng minh được tác dụng ức chế enzym cholesterol esterase của các chế phẩm có chứa polyphenol như: chiết xuất lá *Plectranthus glandulosus* có $\text{IC}_{50} = 25,14 \mu\text{g/ml}$ [91], chiết xuất lá và vỏ cây *Psychotria densinervia* có $\text{IC}_{50} = 34,75 \pm 3,87 \mu\text{g/ml}$, chiết xuất hoa *Camellia nitidissima* $\text{IC}_{50} = 200 \mu\text{g/ml}$ [94]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, CKL-THV ức chế enzym cholesterol esterase với $\text{IC}_{50} = 158,5 \mu\text{g/ml}$. Kết quả này cao hơn giá trị IC_{50} của các loài như *Plectranthus glandulosus* hay *Psychotria densinervia* nhưng lại thấp hơn giá trị IC_{50} của *Camellia nitidissima*, một loại trà xanh, cùng họ với Trà hoa vàng *Camellia hakodae*. Như vậy, CKL-THV có thể được coi là một chế phẩm tiềm năng, có tác dụng ức chế enzym cholesterol esterase tốt, góp phần làm giảm hấp thu cholesterol, từ đó giúp kiểm soát cholesterol máu và hỗ trợ chống béo phì.

Các kết quả đánh giá cơ chế tác dụng ức chế enzym HMG-CoA reductase và enzym cholesterol esterase trong các thử nghiệm *in vitro* trên góp phần cung cấp thêm bằng chứng về cơ chế tác dụng điều trị rối loạn lipid máu và chống béo phì của CKL-THV.



Hình 4. 1. Cơ chế tác dụng ức chế enzym của CKL-THV

Sơ đồ trên minh họa cơ chế tác dụng giảm lipid máu của CKL-THV bằng cách ức chế hai enzym quan trọng trong chuyển hóa lipid của cơ thể là HMG-CoA reductase và enzym cholesterol esterase. Ở gan, CKL-THV thể hiện là một chất ức chế HMG-CoA reductase, enzym kiểm soát quá trình tổng hợp cholesterol nội sinh. Bình thường, HMG-CoA reductase xúc tác chuyển HMG-CoA thành mevalonate, một tiền chất quan trọng để tổng hợp cholesterol. Khi sử dụng CKL-THV, hoạt tính của enzym này giảm, dẫn đến giảm lượng cholesterol nội sinh tại gan, từ đó dẫn đến giảm cholesterol toàn phần, LDL-C và non HDL-C. Các lipoprotein xấu như VLDL mang nhiều TG cũng giảm, do vậy TG giảm. Trong khi đó, tại ruột, CKL-THV tác động lên cholesterol esterase, enzym có vai trò phân giải cholesterol ester từ thức ăn thành

cholesterol tự do để hấp thu qua niêm mạc ruột. Sự ức chế enzyme này bởi CKL-THV làm quá trình phân giải cholesterol ester bị giảm, dẫn đến làm giảm lượng cholesterol tự do có sẵn, từ đó hạn chế sự hấp thu cholesterol ngoại sinh vào máu. Hai cơ chế này phối hợp với nhau, vừa làm giảm nguồn cholesterol nội sinh từ gan, vừa giảm nguồn cholesterol ngoại sinh từ chế độ ăn, dẫn đến hiệu quả tổng thể là giảm nồng độ cholesterol trong máu.

Như vậy, CKL-THV ức chế HMG-CoA reductase – enzyme tổng hợp cholesterol nội sinh tại gan, đồng thời cũng ức chế cholesterol esterase – enzyme thủy phân và hấp thu cholesterol ngoại sinh tại ruột. Đây là hai đích tác dụng rõ ràng, có liên quan đến giảm cholesterol toàn phần, từ đó gián tiếp làm giảm tích lũy năng lượng dư thừa, hỗ trợ giảm béo phì. Ngoài ra, giảm tích lũy mỡ cũng có thể cải thiện độ nhạy insulin và chuyển hóa lipid máu, góp phần giảm nồng độ TG, LDL-C và tăng HDL-C. Như vậy, CKL-THV vừa có cơ chế riêng biệt, vừa có cơ chế hiệp đồng tác dụng. Sự kết hợp này làm tăng giá trị ứng dụng của CKL-THV.

4.2.4. Bàn luận chung về tác dụng và cơ chế tác dụng của CKL-THV

CKL-THV là dạng cao chiết toàn phần, điều chế bằng phương pháp chiết siêu âm với dung môi ethanol 96%. Phương pháp này rất phù hợp trong việc chiết xuất các hợp chất có độ phân cực từ trung bình đến thấp, điển hình như polyphenol, triterpenoid, phytosterol hay các acid hữu cơ. Các nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh rất giàu polyphenol [120], [121], [122]. Đây là nhóm hoạt chất đã được chứng minh có tác dụng tăng chuyển hóa năng lượng, điều hòa chuyển hóa lipid, giảm tích tụ mỡ và điều chỉnh hệ vi khuẩn đường ruột [146], [161]. Chính vì vậy, polyphenol được xem là nhóm hoạt chất định hướng chính cho tác dụng hạ lipid máu và chống béo phì của CKL-THV. Tuy nhiên cũng không thể loại trừ sự đóng góp của các nhóm hợp chất khác như triterpenoid, phytosterol và một số acid hữu cơ khác cũng có khả năng điều hòa hấp thu lipid, giảm tổng hợp

cholesterol [154], [155], [156]. Đây cũng là một mặt hạn chế của nghiên cứu, cần nghiên cứu thêm về thành phần hóa học của CKL-THV để xác định được hoạt chất chính có liên quan đến tác dụng sinh học.

Các kết quả nghiên cứu từ thử nghiệm *in vivo* và *in vitro* cho thấy mối liên hệ rõ ràng và hợp lý giữa cơ chế tác dụng và hiệu quả chống béo phì, hạ lipid máu của CKL-THV trên thực nghiệm. Trong các thử nghiệm *in vitro*, CKL-THV thể hiện rõ tác dụng ức chế hai enzym then chốt trong chuyển hóa lipid là HMG-CoA reductase ($IC_{50} = 36,37 \mu\text{g/ml}$) và cholesterol esterase ($IC_{50} = 158,5 \mu\text{g/ml}$). Trong đó, HMG-CoA reductase là enzym kiểm soát tổng hợp cholesterol nội sinh tại gan, còn cholesterol esterase chịu trách nhiệm thủy phân cholesterol ester tại ruột, tạo điều kiện cho hấp thu cholesterol và acid béo. Khi cả hai enzym cùng bị ức chế, tác dụng hiệp đồng có thể xảy ra, làm giảm tổng lượng cholesterol máu từ cả hai con đường nội sinh và ngoại sinh, do đó ảnh hưởng đến nồng độ lipid máu và tích lũy mỡ tại các mô ngoại biên. Những kết quả này có mối liên hệ với các kết quả thu được từ thử nghiệm *in vivo*.

Cụ thể, trong thử nghiệm về tác dụng chống béo phì *in vivo*, CKL-THV làm giảm rõ rệt các chỉ số lipid máu như TC, TG, LDL-C, non LDL-C, và đồng thời làm tăng HDL-C, cho thấy hiệu quả điều hòa lipid máu. Mức độ tác động của CKL-THV phụ thuộc liều dùng, tuy chưa mạnh bằng orlistat – một thuốc ức chế lipase – nhưng vẫn cho thấy xu hướng tích cực, phù hợp với hoạt tính ức chế cholesterol esterase được ghi nhận trong thử nghiệm *in vitro*. Tác dụng giảm trọng lượng mỡ cơ thể, giảm trọng lượng các tạng và chỉ số béo phì Lee cũng có thể được lý giải qua việc làm giảm hấp thu lipid (do ức chế HMG-CoA reductase) và giảm tổng hợp cholesterol (do ức chế HMG-CoA reductase), góp phần giảm tích lũy lipid trong mô mỡ và các cơ quan đích. Đặc biệt, tác dụng giảm trọng lượng cơ thể (từ 2,55 đến 3,09%) và giảm chỉ số béo phì Lee (từ 1,37 đến 1,66%) của CKL-THV tương đương với orlistat và không phụ thuộc vào liều lượng, cho thấy hiệu quả ổn định của cao toàn phần. Tuy nhiên, tác

dụng của CKL-THV trên một số chỉ số như vòng bụng, chỉ số mỡ cơ thể, trọng lượng tương đối các tạng vẫn chưa thực sự rõ rệt, có thể do thời gian nghiên cứu còn ngắn, độ nhạy của chỉ số hoặc do cơ chế tác động là gián tiếp, chậm hơn so với cơ chế ức chế trực tiếp enzym lipase của orlistat.

Kết quả nghiên cứu trong hai thử nghiệm *in vivo* về tác dụng hạ lipid máu nội sinh và ngoại sinh cũng cho thấy mối liên hệ logic giữa cơ chế tác dụng *in vitro* và hiệu quả *in vivo* của CKL-THV. Cụ thể, CKL-THV có khả năng ức chế enzym HMG-CoA reductase ($IC_{50} = 36,37 \mu\text{g/ml}$), làm giảm sinh tổng hợp cholesterol tại gan. Điều này lý giải cơ chế nội sinh tác dụng hạ lipid máu của CKL-THV trên mô hình chuột Swiss tăng lipid máu bởi P-407. Việc CKL-THV làm giảm đáng kể TC, TG, LDL-C và non HDL-C ở mô hình này cho thấy hiệu quả ức chế tổng hợp cholesterol tại gan có ý nghĩa. Mặt khác, CKL-THV cũng ức chế enzym cholesterol esterase ($IC_{50} = 158,5 \mu\text{g/ml}$, làm giảm quá trình thủy phân cholesterol ester trong thức ăn, từ đó giúp giảm hấp thu cholesterol ngoại sinh. Điều này giải thích kết quả hạ lipid máu ngoại sinh trên mô hình chuột *Wistar* gây tăng lipid máu bằng hỗn hợp dầu cholesterol. Việc CKL-THV làm giảm sớm và mạnh TC, TG, LDL-C, non HDL-C đặc biệt làm tăng HDL-C ở liều cao (1,05 g/kg/24h) cho thấy CKL-THV có khả năng điều hòa lipid tốt.

Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy sự tương đồng và bổ trợ giữa cơ chế tác dụng *in vitro* và hiệu quả *in vivo* của CKL-THV. Khả năng ức chế enzym HMG-CoA reductase và cholesterol esterase trong thử nghiệm *in vitro* đã phần nào lý giải cơ chế chống tăng lipid máu theo cả hai con đường nội sinh và ngoại sinh, đồng thời góp phần làm giảm tích lũy mỡ và trọng lượng cơ thể ở động vật thực nghiệm. Kết quả trong thử nghiệm *in vitro* không chỉ lý giải cơ chế tác dụng của CKL-THV mà còn củng cố tin cậy cho kết quả thực nghiệm *in vivo*, làm cơ sở khoa học cho việc phát triển CKL-THV thành chế phẩm điều trị hỗ trợ béo phì và rối loạn lipid máu.

Những dữ liệu trên góp phần củng cố giả thuyết CKL-THV có “cơ chế kép” chống béo phì và hạ lipid máu. Đây là một lợi thế nổi bật, giúp phân biệt chế phẩm này với các dược liệu có cơ chế đơn lẻ, mở ra tiềm năng phát triển thành chế phẩm hỗ trợ “điều trị kép” rối loạn lipid máu và béo phì.

4.3. Tính ứng dụng và hạn chế của luận án

Chế phẩm CKL-THV *Camellia hakodae* Ninh không chỉ mang lại giá trị kinh tế cho ngành dược phẩm mà còn góp phần khai thác bền vững nguồn tài nguyên thực vật bản địa, nâng cao giá trị của cây Trà hoa vàng trong y học cổ truyền và hiện đại. Hơn nữa, với xu hướng ưa chuộng các sản phẩm thiên nhiên, chế phẩm này có tiềm năng lớn trong việc đáp ứng nhu cầu chăm sóc sức khỏe toàn diện, phòng chống béo phì, rối loạn lipid máu trong cộng đồng.

Đề tài luận án đã đánh giá được độc tính, tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu và một số cơ chế tác dụng trên thực nghiệm của cao khô lá cây Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh. Các kết quả nghiên cứu thực nghiệm trên cả *in vivo* và *in vitro* không chỉ chứng minh hiệu quả sinh học rõ ràng của chế phẩm mà còn góp phần lý giải cơ sở của những kinh nghiệm dân gian lâu đời trong việc sử dụng lá Trà hoa vàng như một loại “trà thuốc” giúp mát gan, tiêu mỡ, hỗ trợ tiêu hóa và phòng ngừa tăng lipid máu. Thực tế, trong y học cổ truyền tại một số địa phương ở miền núi phía Bắc Việt Nam, lá Trà hoa vàng thường được sử dụng dưới dạng hãm nước uống hoặc sắc để “tiêu thực”, “giải độc”. Kết quả nghiên cứu trên thực nghiệm của chúng tôi giúp chuyển những khái niệm truyền thống này thành các cơ chế sinh học cụ thể, tạo nên cầu nối vững chắc giữa y học cổ truyền gắn với tri thức bản địa và y học hiện đại. Việc chứng minh CKL-THV có “cơ chế kép” trên cả con đường nội sinh và ngoại sinh của chuyển hóa lipid, đồng thời có tính an toàn cao trong các thử nghiệm độc tính đã cho thấy tiềm năng phát triển CKL-THV thành sản phẩm hỗ trợ điều trị các bệnh rối loạn chuyển hóa như béo phì kèm rối loạn lipid máu.

Các kết quả nghiên cứu trên không chỉ cung cấp bằng chứng khoa học về tính an toàn và tác dụng của CKL-THV theo kinh nghiệm dân gian mà còn là cơ sở để định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo trong tương lai.

Mặc dù vậy, luận án vẫn còn tồn tại một số điểm hạn chế như sau:

(1) Chế phẩm nghiên cứu sử dụng là dạng cao toàn phần nên chưa xác định được nhóm hoạt chất chính đóng vai trò chủ đạo trong tác dụng sinh học quan sát được. Do đó, cũng chưa đánh giá được các hoạt chất chính tham gia vào tác dụng được lý chống béo phì và hạ lipid máu của CKL-THV.

(2) Trong nghiên cứu tác dụng chống béo phì *in vivo* trên mô hình chuột béo phì gây bởi chế độ ăn giàu năng lượng HFD, luận án chưa đánh giá được mức độ tiêu thụ thức ăn và thời gian tồn lưu thức ăn ở dạ dày chuột. Đây là hai thông số có thể ảnh hưởng đến chuyển hóa năng lượng và tích lũy lipid.

(3) Mặc dù các kết quả nghiên cứu trên *in vivo* cho thấy CKL-THV có khả năng làm giảm cholesterol toàn phần và triglycerid. Tuy nhiên, luận án chưa đánh giá được cơ chế tác dụng ức chế enzym lipase trên thử nghiệm *in vitro* – một trong những cơ chế quan trọng liên quan đến hấp thu chất béo tại ruột non. Việc bổ sung dữ liệu này sẽ giúp xác nhận hoặc bác bỏ giả thiết về tác dụng của CKL-THV theo hướng tương tự các thuốc như orlistat.

Những hạn chế trên chính là khoảng trống khoa học của đề tài luận án, cần được tiếp tục nghiên cứu thêm nhằm hoàn thiện hồ sơ phát triển chế phẩm CKL-THV theo định hướng ứng dụng.

4.4. Đóng góp mới của luận án

Tính mới của nghiên cứu này thể hiện qua việc đánh giá chế phẩm cao khô lá cây Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh với những đặc điểm nổi bật, đem lại giá trị khoa học và tiềm năng ứng dụng vượt trội so với các chế phẩm được nghiên cứu trước đây.

Thứ nhất, tính mới thể hiện ở dạng bào chế và phương pháp bào chế của đối tượng nghiên cứu. Trong nghiên cứu của luận án, chúng tôi không sử dụng dịch chiết nước lá Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh như các nghiên

cứu trước đây, mà sử dụng chế phẩm cao khô lá Trà hoa vàng làm vật liệu nghiên cứu. Một trong những lợi thế lớn nhất của chế phẩm cao khô là khả năng tập trung các hoạt chất có trong dược liệu. Tỷ lệ hoạt chất trong cao khô thường cao hơn tỉ lệ hoạt chất trong dược liệu [15], [16]. Bên cạnh đó, do tỉ lệ hàm ẩm trong cao khô không quá 5% nên CKL-THV có khả năng bảo quản lâu dài, khó bị phân hủy, bị tác động bởi nhiệt độ, thời gian [15], [16]. Ngoài ra, sử dụng cao khô cũng dễ dàng kiểm soát liều lượng và tiện lợi hơn trong quá trình vận chuyển. Một điểm nổi bật nữa của chế phẩm nghiên cứu là việc sử dụng đơn độc lá Trà hoa vàng trong công thức điều chế mà không kết hợp với các dược liệu khác. Điều này giúp đảm bảo tính đồng nhất và ổn định chế phẩm, đồng thời giảm sự tương tác giữa các thành phần dược liệu khác nhau, không ảnh hưởng đến tác dụng sinh học của dược liệu lá Trà hoa vàng.

Việc bào chế CKL-THV bằng phương pháp chiết siêu âm với ethanol 96% có nhiều ưu điểm so với dạng truyền thống sử dụng dịch chiết nước nóng. Trước hết, chiết siêu âm là một kỹ thuật hiện đại sử dụng sóng siêu âm tần số cao để phá vỡ thành tế bào thực vật, giúp giải phóng hoạt chất một cách hiệu quả, từ đó nâng cao hiệu suất chiết xuất và rút ngắn thời gian chiết so với phương pháp đun sôi thông thường. Ethanol 96% là dung môi hữu cơ có độ phân cực trung bình, có khả năng hòa tan cả các hợp chất phân cực và không phân cực, do đó rất hiệu quả trong việc chiết xuất các nhóm chất có hoạt tính sinh học cao như polyphenol, flavonoid và triterpenoid có trong lá Trà hoa vàng. Trong khi đó, phương pháp chiết nước nóng chủ yếu thu được các hợp chất phân cực cao, khiến phổ hoạt chất thu được bị giới hạn và hiệu quả dược lý có thể không được tối ưu. Hơn nữa, cao khô chiết ethanol có thể dễ dàng chuẩn hóa về hàm lượng hoạt chất, từ đó đảm bảo tính nhất quán về chất lượng, độ ổn định và liều dùng trong các nghiên cứu. Ngược lại, dạng dịch chiết nước nóng truyền thống tồn

tại ở dạng lỏng, thể tích lớn, dễ bị biến đổi sinh học, khó bảo quản và không thuận tiện cho người sử dụng.

Thứ hai, tính mới thể hiện ở việc đánh giá tính an toàn tác dụng của chế phẩm nghiên cứu. Luận án đã đánh giá được tính an toàn của cao khô lá cây Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh trong thử nghiệm độc tính cấp và độc tính bán trường diễn trên thực nghiệm. Hai tác dụng chống béo phì và hạ lipid máu theo con đường nội sinh và ngoại sinh của CKL-THV cũng được đánh giá trên thử nghiệm *in vivo*. Ngoài ra, nghiên cứu của luận án tiến thêm một bước quan trọng khi làm sáng tỏ cơ chế tác dụng của CKL-THV thông qua sự ức chế hai enzym then chốt HMG-CoA reductase và cholesterol esterase trên thử nghiệm *in vitro*, điều mà các nghiên cứu trước đây chưa thực hiện đầy đủ. Sự kết hợp giữa đánh giá hiệu quả sinh học và cơ chế phân tử cung cấp cái nhìn toàn diện, khẳng định tiềm năng của chế phẩm CKL-THV như một cơ chế kép trong điều trị rối loạn lipid máu và béo phì.

Thứ ba, nghiên cứu của luận án mở ra tiềm năng phát triển sản phẩm mới dựa trên nguyên liệu bột CKL-THV, với khả năng ứng dụng thực tiễn cao trong lĩnh vực dược phẩm. Cao khô dễ dàng chuyển thành các dạng bào chế hiện đại như viên nén, viên nang hoặc dạng bột hòa tan, giúp thuận tiện cho sử dụng. Kết quả thu được không chỉ làm nổi bật giá trị khoa học mà còn đặt nền tảng vững chắc để hoàn thiện hồ sơ tiền lâm sàng. Từ đó, có thể tiến tới giai đoạn thử nghiệm lâm sàng, bước cuối cùng trước khi được phê duyệt và đưa chế phẩm CKL-THV lưu hành trên thị trường. Việc phát triển thành công một sản phẩm từ nguồn gốc tự nhiên, kết hợp công nghệ chiết xuất hiện đại và cơ chế tác dụng rõ ràng, sẽ đóng góp đáng kể vào việc cung cấp giải pháp điều trị an toàn, hiệu quả cho các bệnh lý liên quan đến chuyển hóa lipid, đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của cộng đồng.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu trên thực nghiệm của chế phẩm cao khô lá cây Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh, một số kết luận được đưa ra như sau:

1. Cao khô lá cây Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh an toàn trong thử nghiệm độc tính cấp và độc tính bán trường diễn trên thực nghiệm

CKL-THV an toàn trong thử nghiệm độc tính cấp trên chuột nhắt trắng chủng Swiss. Mức liều tối đa được sử dụng là 12,0 g/kg thể trọng/24h mà không có chuột nào chết, cũng như không thấy có bất kì biểu hiện bất thường nào, do đó không xác định được liều LD₅₀.

CKL-THV an toàn trong thử nghiệm độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng chủng *Wistar*. Cụ thể, CKL-THV ở các mức liều 0,35 g/kg/24h và 1,05 g/kg/24h không gây ảnh hưởng tới sự phát triển chung của chuột, không ảnh hưởng tới các chỉ số huyết học, sinh hóa máu và chức năng gan, thận, lách của chuột trong thời gian 90 ngày nghiên cứu.

2. Cao khô lá cây Trà hoa vàng *Camellia hakodae* Ninh có tác dụng hỗ trợ điều trị béo phì và hạ lipid máu

- CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h và 1,05g/kg/24h có tác dụng hỗ trợ điều trị béo phì trên động vật thực nghiệm trong thử nghiệm *in vivo*, thể hiện ở các điểm sau:

- (1) Làm giảm 2,55% đến 3,09% trọng lượng chuột béo phì, tương đương với orlistat và không phụ thuộc vào liều dùng.
- (2) Làm giảm vòng bụng của chuột so với lô mô hình. Tuy nhiên, trong cùng lô, chưa làm giảm số đo vòng bụng chuột béo phì trong thời gian nghiên cứu.
- (3) Làm giảm trọng lượng mỡ cơ thể, không phụ thuộc vào liều lượng sử dụng. Tuy nhiên chưa làm giảm chỉ số mỡ của cơ thể.

- (4) Làm giảm từ 1,37% đến 1,66% chỉ số béo phì Lee, tác dụng này tương đương với orlistat và không phụ thuộc vào liều dùng.
- (5) Làm giảm trọng lượng tuyệt đối các tạng tim, gan, thận, lách, hiệu quả thay đổi theo liều dùng. Tuy nhiên chỉ ghi nhận sự giảm trọng lượng tương đối của tạng gan khi sử dụng CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h.
- (6) Làm giảm các chỉ số lipid máu TC, TG, LDL-C, non HDL-C và tăng chỉ số HDL-C. Tác dụng này kém orlistat và hiệu quả tác dụng thay đổi theo liều dùng.

- CKL-THV có tác dụng hạ lipid máu trên động vật thực nghiệm theo con đường nội sinh và ngoại sinh trong thử nghiệm *in vivo*, thể hiện ở các điểm sau:

- (1) CKL-THV liều 0,6 g/kg/24h và 1,8 g/kg/24h làm giảm các chỉ số TC, TG, LDL-C và non HDL-C ở chuột nhắt trắng chủng *Swiss* gây tăng lipid máu nội sinh bằng P-407.
- (2) CKL-THV liều 0,35 g/kg/24h và 1,05g/kg/24h làm giảm các chỉ số TC, TG, LDL-C, non HDL-C sớm và mạnh hơn TG trên chuột cống chủng *Wistar* gây tăng lipid máu ngoại sinh bằng hỗn hợp dầu cholesterol. CKL-THV liều 1,05 g/kg/24h làm tăng nồng độ HDL-C có ý nghĩa.

- CKL-THV có cơ chế tác dụng ức chế enzym HMG-CoA reductase và cholesterol esterase trong thử nghiệm *in vitro*. Khả năng ức chế enzym HMG-CoA reductase của CKL-THV ($IC_{50} = 36,37 \mu\text{g/ml}$) mạnh hơn khả năng ức chế enzym cholesterol esterase ($158,5 \mu\text{g/ml}$).

KIẾN NGHỊ

Các nghiên cứu về độc tính và tác dụng chống béo phì, hạ lipid máu của CKL-THV trên thực nghiệm chỉ là nghiên cứu bước đầu. Để có thể đưa CKL-THV sử dụng trên lâm sàng cần có các nghiên cứu tiếp theo. Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu và những hạn chế còn tồn tại, một số kiến nghị được đề xuất như sau:

1- Tiến hành phân tích thành phần hóa học chi tiết của CKL-THV nhằm xác định các hợp chất đặc hiệu, từ đó phân lập và xác định cấu trúc các hoạt chất chính có liên quan đến tác dụng sinh học.

2- Tiếp tục nghiên cứu thêm cơ chế tác dụng chống béo phì của CKL-THV thông qua thử nghiệm *in vitro*, đặc biệt là khả năng ức chế enzym lipase tụy – một trong những cơ chế quan trọng trong điều trị béo phì.

3- Triển khai các nghiên cứu lâm sàng nhằm đánh giá tính an toàn, khả năng dung nạp và hiệu quả bước đầu của CKL-THV trên người, từ đó, làm cơ sở cho việc sử dụng chế phẩm điều trị béo phì và rối loạn lipid máu.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ
ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

- 1. Ngô Thị Mỹ Bình, Nguyễn Hoàng Ngân, Nguyễn Hồng Hạnh (2023),**
“Đánh giá độc tính bán trường diễn của cao khô lá cây Trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh)”, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 529 (2), tr. 118 - 123.

- 2. Ngô Thị Mỹ Bình, Nguyễn Hoàng Ngân, Nguyễn Hồng Hạnh (2023),**
“Nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng hạ lipid máu nội sinh của cao khô lá cây Trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh) trên động vật thực nghiệm”, *Tạp chí Y Dược học quân sự*, tập 48, số chuyên đề Dược học, tr. 354 - 363.

- 3. Ngo Thi My Binh, Nguyen Hoang Ngan, Do Thi Huong Lan, Nguyen Hong Hanh, Nguyen Thanh Ha Tuan (2024),** “Anti-hyperlipidemic Effect of *Camellia hakodae* Ninh Extract in an *In Vivo* Rat Model”, *Trop J Nat Prod Res*, 8 (11), p. 9199-9205.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Obesity Federation (2023), *World Obesity Atlas 2023*, 1-13.
2. Liang Y. L., Xiyidan A., Ying Y. Z., et al. (2023), Epidemic trends of dyslipidemia in young adults: a real-world study including more than 20,000 samples, *Lipids in Health and Disease*, 22: 1-10.
3. Harold E. B., Peter P. T., Penny M. K. E., et al. (2013), Obesity, adiposity, and dyslipidemia: a consensus statement from the National Lipid Association., *Journal of Clinical Lipidology*, 7 (4): 304-383.
4. Remco F., Houshang M., Erik S. G. S., et al. (2011), Obesity and Dyslipidemia, *Medical Clinics of North America*, 95 (5): 893-902.
5. Trương Hồng Sơn, Lưu Liên Hương, Lê Việt Anh, et al. (2022), Thực trạng rối loạn cholesterol máu ở người trưởng thành thừa cân béo phì độ tuổi từ 40 đến 60 tuổi, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 516 (1): 258-263.
6. Angela P., Manuela C., Elena O., et al. (2021), *Global epidemiology of dyslipidaemias*, *Nature Reviews Cardiology*, 1-12.
7. Trình Thi Diep (2022), Yellow camellias: A review of chemical constituents and biological activities, *Dalat University Journal of Science*, 12 (3): 117-144.
8. Lin J. N., Lin H. Y., Yang N. S., et al. (2013), Chemical constituents and anticancer activity of yellow camellias against MDA-MB-231 human breast cancer cells, *J Agric Food Chem*, 61 (40): 9638-9644.
9. Bing W., Li G., Jianguang M., et al. (2018), Essential oils and ethanol extract from *Camellia nitidissima* and evaluation of their biological activity, *Journal of food science technology*, 55 (12): 5075-5081.
10. Chen I. J., Liu C. A., Chiu J. P., et al. (2016), Therapeutic effect of high-dose green tea extract on weight reduction: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial, *J Clinical nutrition*, 35 (3): 592-599.

11. Trần Ninh, Hakoda N. (2009), *Các loài trà của vườn quốc gia Tam Đảo*, 27-105.
12. Tran Ninh, Le Nguyet Hai Ninh (2013), *The Yellow Camellias of the Tam Dao National Park*, The 3rd International Academic Forum on Yellow Camellias, 122-128.
13. Trần Thị Thu Hà, Vũ Thị Luận (2021), Nghiên cứu hiện trạng phân bố và đặc điểm tái sinh của loài Trà hoa vàng hakodae (*Camellia hakodae* Ninh) tại Thái Nguyên, *Tạp chí Khoa học công nghệ*, 2: 98-105.
14. Nguyễn Hồng Hạnh, Ngô Thị Mỹ Bình, Hoàng Lan Hiệp, et al. (2020), Đánh giá tác dụng điều trị rối loạn lipid máu của lá trà hoa vàng Hakodae-Ninh Tam Đảo, *Tạp chí Sinh lý học*, 24 (3): 54-61.
15. Trường Đại học Y Dược - Đại học Thái Nguyên (2020), Các dạng thuốc bào chế bằng phương pháp chiết xuất, *Bào chế và Sinh dược học (tập 1)*, Nhà xuất bản Đại học Thái Nguyên, 146-180.
16. Nguyễn Văn Hân, Bùi Thị Thúy Luyện (2022), Kỹ thuật sản xuất cao dược liệu, *Kỹ thuật chiết xuất dược liệu*, Nhà xuất bản Y học, 58-78.
17. Bộ Y tế (2022), Quyết định về việc ban hành tài liệu chuyên môn "Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh béo phì", Quyết định số 2892/QĐ-BYT
18. Vidhu V. T. (2017), Genetic and epigenetic causes of obesity, *Adolesc Med State Art Rev*, 28 (2): 379–405.
19. Bộ Y tế (2015), Bệnh béo phì, *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh nội tiết - chuyển hóa*, Nhà xuất bản Y học, 247-254.
20. Ancel K., Flaminio F., Martti J. K., et al. (2014), Indices of relative weight and obesity, *International Journal of Epidemiology*, 43 (3): 655-665.
21. Lan T. H. P., Thai Q. L., Nguyen D. N., et al. (2010), Similarity in Percent Body Fat Between White and Vietnamese Women: Implication for a Universal Definition of Obesity, *Obesity*, 18 (6): 1242-1246.

22. Volkan Y., Constantine T., Martin F., et al. (2015), European Guidelines for Obesity Management in Adults *Obesity Facts*, 8: 402-424.
23. Dominique D. S., Luca B., Dror D., et al. (2019), European Practical and Patient-Centred Guidelines for Adult Obesity Management in Primary Care, *Obesity Facts*, 12: 40-66.
24. Eduardo G., Raj S., Ruben H., et al. (2022), AGA Clinical Practice Guideline on Pharmacological Interventions for Adults With Obesity, *Gastroenterology*, 163 (5): 1198-1125.
25. Caroline M. A., Louis J. A., Daniel H. B., et al. (2015), Pharmacological management of obesity: an endocrine Society clinical practice guideline, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100 (2): 342-362.
26. Garvey W. T., Mechanick J. I., Brett E. M., et al. (2016), American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology comprehensive clinical practice guidelines for medical care of patients with obesity, *Endocrine Practice*, 22: 1-203.
27. Hermann T., Euan W., Volkan Y., et al. (2015), 2014 EASO Position Statement on the Use of Anti-Obesity Drugs *Obesity Facts*, 8: 166-174.
28. Nuha A. E., Grazia A., Vanita R. A., et al. (2023), Obesity and Weight Management for the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2023, *Diabetes Care*, 46 (1): 128-139.
29. Marlene C., Rachelle H., Malak G., et al. (2023), Pharmacotherapy of obesity: an update on the available medications and drugs under investigation, *The Lancet*, 58: 1-29.
30. Homayoun L. D., Mark D. A., Gerald W. S. (2016), FDA-Approved Anti-Obesity Drugs in the United States, *The American Journal of Medicine*, 129 (8): 879. e871-e876.
31. Young J. T., Sang Y. L. (2021), Long-Term Efficacy and Safety of Anti-Obesity Treatment: Where Do We Stand?, *Metabolism*, 10: 14-30.

32. Nguyễn Trọng Thông (2023), Thuốc hạ lipoprotein máu, *Dược lý học lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, 530-541.
33. Nguyễn Ngọc Khôi, Đặng Nguyễn Đoan Trang (2023), Rối loạn chuyển hóa lipid máu, *Dược lâm sàng và điều trị*, Nhà xuất bản Y học, 129-159.
34. Albert S., Camille L., Maria T. S. F., et al. (2021), Modification of High-Density Lipoprotein Functions by Diet and Other Lifestyle Changes: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials, *J Clin Med*, 10 (24): 1-43.
35. James M. R., Rod F., Graeme H., et al. (2020), Atherosclerosis and lipoprotein metabolism, *Rang & Dale's Pharmacology*, Elsevier, 310-318.
36. Hội tim mạch học Việt Nam, Phân hội xơ vữa động mạch Việt Nam (2024), Khuyến cáo của Hội Tim mạch học Việt Nam Điều trị rối loạn lipid máu 2024:
37. European Society of Cardiology, European Atherosclerosis Society (2019), ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk, *European Heart Journal*, 00: 1-78.
38. Yehuda H., Paul S. J., Chris K. G., et al. (2020), AACE/ACE Consensus Statement: Consensus statement by the american association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology on the management of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease algorithm – 2020 executive summary, *Endocrine Practice*, 26 (10): 1-29.
39. Nguyễn Dương Khang, Trương Quang Bình (2023), Mục tiêu LDL-C cần đạt: Có phải ngày càng nghiêm ngặt?, *J Vietnam Cardiol*, 106: 83-92.
40. European Society of Cardiology (2021), ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice, *European Heart Journal*, 42: 3227-3337.

41. Hội tim mạch học Việt Nam (2022), Khuyến cáo về dự phòng bệnh lý tim mạch trong thực hành lâm sàng (Bản tóm tắt): 1-41.
42. Heinz L., Klaus M., Lutz H. (2018), Drugs Used in hyperlipoproteinemias, *Color Atlas of Pharmacology*, Thieme, 170-174.
43. American College of Cardiology, American Heart Association (2019), Guideline on the Management of Blood Cholesterol: 1-22.
44. Meor F. R. M. A. S., Intan N. S., Johnson S., et al. (2017), Effects of Different Types of Statins on Lipid Profile: A Perspective on Asians, *Int J Endocrinol Metab*, 15 (2): 1-9.
45. Mary J. M., John P.K (2015), Agents Used in Dyslipidemia, *Basic & Clinical Pharmacology*, Mc Graw Hill Education, 889-911.
46. Reiner Z. (2013), Managing the residual cardiovascular disease risk associated with HDL-cholesterol and triglycerides in statin - treated patients: a clinical update, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23 (9): 799-807.
47. Katsiki N., Nikolic D., Montalto G., et al. (2013), The Role of Fibrate Treatment in Dyslipidemia: An Overview, *Current Pharmaceutical Design*, 19 (17): 3124 - 3131.
48. Holly E. G., Donald K. B. (2018), Drug Therapy for Dyslipidemias, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basic of therapeutics*, Mc Graw Hill Medical, 605-618.
49. Food and Drug Administration (2021), FDA approves add-on therapy for patients with genetic form of severely high cholesterol, 15/2/2025, <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-add-therapy-patients-genetic-form-severely-high-cholesterol-0>.
50. Tania M., Tiago F., Elisabete N. G., et al. (2022), Obesity Rodent Models Applied to Research with Food Products and Natural Compounds, *Obesities*, 2 (2): 171-204.

51. Inês P., André A., Sara N., et al. (2020), Diet-induced rodent models of obesity-related metabolic disorders—A guide to a translational perspective, *Obesity Reviews*: 1-29.
52. Marianela B. P., Dolors S., Laura H. (2020), Dietary Options for Rodents in the Study of Obesity, *Nutrients*, 12 (3234): 1-19.
53. Megan R. S., Eric B. N., Linderholm A. L., et al. (2018), Obesogenic diets alter metabolism in mice, *PLoS ONE*, 13 (1): 1-17.
54. Mariana M. D., Sandra A. R., Lisiane L. C., et al. (2021), Diet-induced obesity in animal models: points to consider and influence on metabolic markers, *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 13 (32): 1-15.
55. Cláudia M., Manuela M., Sonia N., et al. (2016), High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat, *Adipocyte*, 5 (1): 11-21.
56. Vinicius V. D., Eduardo N. T., Manoel R. M. T. (2006), Experimental model to induce obesity in rats, *Acta Cirurgica Brasileira*, 21 (6): 425-429.
57. Sarah L. J., Donna M. S., Bert J. T., et al. (2007), Intake Compensates for Resting Metabolic Rate Variation in Female C57BL/6J Mice Fed High-fat Diets, *Animal Physiology*, 15 (3): 600-606.
58. Thomas A. L., Stephen C. W. (2012), Overview of Animal Models of Obesity, *Current Protocols in Pharmacology*, 58 (1): 1-22.
59. Djiane J., Attig L. (2008), Role of leptin during perinatal metabolic programming and obesity, *J Physiol Pharmacol*, 59 (1): 55-63.
60. Viktor R. D., Nazar M., Olga I., et al. (2006), The leptin - deficient (ob/ob) Mouse a new animal model of peripheral neuropathy of typ 2 diabetes and obesity, *Diabetes*, 55 (12): 3335-3343.
61. John S., Catherine H., Sharon M., et al. (2008), The contribution of animal models to the study of obesity, *Laboratory Animals*, 42: 413-432.

62. Hans G. J. (2010), The Genetic Basis of Obesity and Type 2 Diabetes: Lessons from the New Zealand Obese Mouse, a Polygenic Model of the Metabolic Syndrome, *Results and Problems in Cell Differentiation*, 52 (1): 1-11.
63. Yoo M. K., Juan J. A., YongJun J., et al. (2007), Assessment of the anti-obesity effects of the TNP-470 analog, CKD-732, *Journal of Molecular Endocrinology*, 38 (4): 455-465.
64. Chun-Min L., Alexandra K., Linda C. S., et al. (2010), Cholecystokinin knockout mice are resistant to high-fat diet-induced obesity, *Gastroenterology*, 138 (5): 1997-2005.
65. Subasini U., Thenmozhi S., Venkateswaran V., et al. (2014), Phytochemical analysis and anti hyperlipidemic activity of nelumbo nucifera in male wistar rats, *Internatinal Journal of Pharmacy Teaching & Practices*, 5 (1): 935-940.
66. Viện dược liệu (2006), Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 295-297.
67. Johnston T. P., Korolenko T. A., Sahebkar A. (2004), The P-407-induced murine model of dose-controlled hyperlipidemia and atherosclerosis: a review of findings to date, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 43 (4): 595-606.
68. Thomas P. Johnston, Tatyana A. Korolenko, Amirhossein Sahebkar (2017), The P-407-Induced Mouse Model of Dose-Controlled Hyperlipidemia and Atherosclerosis: Twenty-five Years Later, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 70 (5): 339-352.
69. Hoàng Thị Kim Quý, Bùi Thị Thúy Luyện, Trần Trọng Biên, et al. (2022), Đánh giá tác dụng hạ lipid máu của viên hoàn giọt chứa đan sâm, tam thất Việt Nam trên thực nghiệm, *Tạp chí Nghiên cứu Dược và thông tin thuốc*, 13 (4): 2-7.

70. Phan Hồng Minh, Hồ Mỹ Dung, Lê Anh Tuấn, et al. (2024), Tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu của cao chiết lá ổi trên thực nghiệm, *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 182 (9): 164-171.
71. Đoàn Thị Nhu (2006), Phương pháp nghiên cứu dược lý thuốc chống tăng lipid máu và thuốc tác dụng trên vữa xơ động mạch, *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo*, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, 131-138.
72. Tạ Thu Thủy, Mai Phương Thanh, Phạm Thị Vân Anh, et al. (2015), Nghiên cứu tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu và chống xơ vữa động mạch của cao lỏng Đại An trên thực nghiệm, *Tạp chí nghiên cứu y dược học cổ truyền Việt Nam*, 46: 37-44.
73. Si-Yuan P., Zhi-Ling Y., Hang D., et al. (2009), Ethanol extract of fructus schisandrae decreases hepatic triglyceride level in mice fed with a high fat/cholesterol diet, with attention to acute toxicity, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: 1-6.
74. Nassiri A. M., Zamansoltani F., Abbasi E., et al. (2009), Effects of Urtica dioica extract on lipid profile in hypercholesterolemic rats, *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 7 (5): 428-433.
75. Nguyễn Trọng Thông, Vũ Thị Ngọc Thanh (2013), Xây dựng mô hình gây rối loạn lipid máu bằng hỗn hợp dầu cholesterol chứa lượng thấp acid cholic trên chuột cống trắng, *Tạp chí Nghiên cứu Dược và thông tin thuốc*, 5: 179-182.
76. Tôn Mạnh Cường, Trương Việt Bình, Nguyễn Tuấn Bình, et al. (2021), Tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu của viên nang linh quế truật cam–nhị trần thang gia vị trên chuột cống trắng, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 502 (2): 246-252.
77. Lê Huyền Trang, Phạm Việt Hoàng, Trần Văn Thanh, et al. (2024), Đánh giá tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu ngoại sinh của viên nang cứng

tiêu tích giáng phèi - HV trên chuột cống trắng, *Tạp chí Y học cộng đồng*, 65 (7): 13-19.

78. Nguyễn Hoàng Ngân, Phùng Văn Bằng, Lê Hồng Phú, et al. (2023), Đánh giá tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu ngoại sinh của viên nang bào chế từ tỏi đen, búp giấm, trạch tả và giảo cổ lam trên chuột cống trắng, *Tạp chí Y Dược học quân sự*, Số chuyên đề dược học năm 2023: 117-187.
79. Trường Đại học Y Hà Nội (2020), Chuyển hóa lipid và vận chuyển lipid trong máu, *Hóa sinh*, Nhà xuất bản Y học, 132-158.
80. Trường Đại học Y Dược - Đại học Thái Nguyên (2022), Chuyển hóa lipid, *Hóa sinh*, Nhà xuất bản Y học, 119-130.
81. Sabri S., Miftahul J., Herpandi, et al. (2022), In vitro Inhibitory HMG-CoA Reductase Activity of Purified Polyphenol Compounds from Water Lettuce (*Pistia Stratiotes*) Leaf Extract, *Tropical Journal of Natural Product Research*, 6 (7): 1131-1134.
82. Wresdiyati T., Papilaya M.C., Laila S.R., et al. (2023), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitory activity of Indonesian *Cajanus cajan* leaves and *Zingiber officinale* extracts, *Food Research*, 7 (1): 139-144.
83. Inten P., Efriyana O., Tengku S. T. M., et al. (2020), Inhibitory effects of tangeretin and trans-ethyl caffeate on the HMG-CoA reductase activity: Potential agents for reducing cholesterol levels, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27 (8): 1947-1960.
84. Mozzicafreddo M., Cuccioloni M., Eleuteri A. M., et al. (2010), Rapid reverse phase -HPLC assay of HMG-CoA reductase activity, *Journal of Lipid Research*, 51: 2460-2463.
85. Honda A., Mizokami Y., Matsuzaki Y., et al. (2007), Highly sensitive assay of HMG-CoA reductase activity by LC-ESI-MS/MS, *Journal of Lipid Research*, 48: 1212-1220.

86. Agnieszka E. S., Mykhailo G. (2013), A simple method for the determination of the cholesterol esterase activity, *Biochimica polonica*, 60 (3): 401-403.
87. Pietsch M., Gutschow M. (2002), Alternate Substrate Inhibition of Cholesterol Esterase by Thieno[2,3-d][1,3]oxazin-4-ones, *The journal of Biological chemistry*, 277 (5): 24006–24013.
88. Gururaja G. M., Deepak Mundkinajeddu, Shekhar M. Dethé, et al. (2015), Cholesterol esterase inhibitory activity of bioactives from leaves of *Mangifera indica* L, *Pharmacognosy Research*, 7 (4): 355-362.
89. Adisakwattana S., Intrawangso J., Hemrid A., et al. (2012), Extracts of Edible Plants Inhibit Pancreatic Lipase, Cholesterol Esterase and Cholesterol Micellization and Bind Bile Acids, *Food Technol Biotechnol*, 50 (1): 11-16.
90. Brimo H. A., Nayal R. (2016), In vitro Screening of the Pancreatic Cholesterol Esterase Inhibitory Activity of Some Medicinal Plants Grown in Syria, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 8(8): 1432-1436.
91. Djamila Z., Sylvie L. W. N., Sylviane L. P. K., et al. (2022), In Vitro Antilipidic and Antithrombotic Activities of *Plectranthus glandulosus* (Lamiaceae) Leaves Extracts and Fractions, *BioMed Research International*, 2022: 1-14.
92. Glory O. A., Modupe N. A., Mfon J. B. (2019), Evaluation of in vitro Cholesterol esterase inhibitory and in vivo Anti-hyperlipidemic activity of aqueous extract of *Plukenetia conophora* Mull. Arg. (Euphorbiaceae), *International Journal of Phytomedicine*, 11 (1): 1-7.
93. Waqas N. B., Priti M., Bincy B., et al. (2021), New insights into the cholesterol esterase- and lipase-inhibiting potential of bioactive peptides

- from camel whey hydrolysates: Identification, characterization, and molecular interaction, *Journal of Dairy Science*, 104 (7): 7393 - 7405.
94. Zhang H. L., Wu Q. X., Wei X., et al. (2020), Pancreatic lipase and cholesterol esterase inhibitory effect of *Camellia nitidissima* Chi flower extracts in vitro and in vivo, *Food Bioscience*, 37: 1-8.
 95. Sultan P., Didem D. O. (2022), Investigation of Antidiabetic Effect of *Pistacia atlantica* Leaves by Activity-Guided Fractionation and Phytochemical Content Analysis by LC-QTOF-MS, *Frontiers in Pharmacology*, 13: 1-14.
 96. Jean R. M., Djamila Z., Hadidjatou D., et al. (2022), In Vitro Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Digestive Enzymes Inhibition Activities of Hydro-Ethanollic Leaf and Bark Extracts of *Psychotria densinervia* (K. Krause) Verdc, *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2022: 1-12.
 97. Muhammad Z. A., Mohamad F. M. (2021), Traditional herbal medicines used in obesity management: A systematic review of ethnomedicinal surveys, *Journal of Herbal Medicine*, 28: 1-22.
 98. Wenli S., Mohamad H. S., Qi C. (2021), Natural Dietary and Medicinal Plants with Anti-Obesity Therapeutics Activities for Treatment and Prevention of Obesity during Lock Down and in Post-COVID-19 Era, *Applied sciences*, 11 (17): 1-23.
 99. Sham T. T., Chan C. O., Wang Y. H., et al. (2014), A Review on the Traditional Chinese Medicinal Herbs and Formulae with Hypolipidemic Effect, *BioMed Research International*, 2014: 1-21.
 100. Rahoui W., Merzouk H., El H. I. A., et al. (2018), Beneficial effects of Aloe vera gel on lipid profile, lipase activities and oxidant/antioxidant status in obese rats, *Journal of Functional Foods*, 48: 525-532.

101. Lu K. Y., Lin S. Z., Kingsley T. P. D., et al. (2021), 3-N-butylphthalide protects against high-fat-diet-induced obesity in C57BL/6 mice and increases metabolism in lipid-accumulating cells, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139: 1-17.
102. Liucen W., Qian Y., Fenglian C., et al. (2021), Bupleuri radix extract ameliorates impaired lipid metabolism in high-fat diet-induced obese mice via gut microbia-mediated regulation of FGF21 signaling pathway, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 135: 1-17.
103. Jihang C., Pou K. L., Hoi Y. L., et al. (2019), Biochemical mechanisms of the anti-obesity effect of a triterpenoid-enriched extract of *Cynomorium songaricum* in mice with high-fat-diet-induced obesity, *Phytomedicine*, 153038: 1-9.
104. Dalal A. A., Magdi A. O., Ghedeir M. A., et al. (2021), *Moringa peregrina* leaf extracts produce anti-obesity, hypoglycemic, anti-hyperlipidemic, and hepatoprotective effects on high-fat diet fed rats, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28 (6): 3333-3342.
105. Mohaddese M. (2019), *Morus alba* (mulberry), a natural potent compound in management of obesity, *Pharmacological Research*, 146: 1-7.
106. Harpal S., Ashwani K. S., Muskan G., et al. (2020), *Tinospora cordifolia* attenuates high fat diet-induced obesity and associated hepatic and renal dysfunctions in rats, *PharmaNutrition*, 13: 1-10.
107. Lee H. S., Lim S. M., Jung J. I., et al. (2019), *Gynostemma Pentaphyllum* Extract Ameliorates High-Fat Diet-Induced Obesity in C57BL/6N Mice by Upregulating SIRT1, *Nutrients*, 11 (2475): 1-15.
108. Chao S., Nan L., Ruru R., et al. (2021), Progress in the Medicinal Value, Bioactive Compounds, and Pharmacological Activities of *Gynostemma pentaphyllum*, *Molecules*, 26 (6249): 1-35.

109. Dai N., Zhao F.F., Fang M., et al. (2022), Gynostemma pentaphyllum for dyslipidemia: A systematic review of randomized controlled trials, *Frontiers in Pharmacology*, 13 (917521): 1-16.
110. Lijiao W., Xiangjin W., Jhang J., et al. (2023), Mechanism of rhubarb in the treatment of hyperlipidemia: A recent review, *De Gruyter*, 18: 1-13.
111. Ying H., Xingjuan C., Mu H., et al. (2022), Medicinal and edible plants in the treatment of dyslipidemia: advances and prospects, *Chinese Medicine*, 17 (113): 1-28.
112. Simin F., Zhuqing D., Anna B. L., et al. (2018), Intake of stigmasterol and β -sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1863 (10): 1-25.
113. Liu Y., Huan Y., AAjiao H., et al. (2021), A Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry, Pharmacology, Application, Quality Control, Processing, Toxicology, and Pharmacokinetics of the Dried Rhizome of Atractylodes macrocephala, *Frontiers in Pharmacology*, 12: 1-21.
114. Lei L., Jin C., Zhang A., et al. (2022), Polysaccharides from Rhizoma Atractylodis Macrocephalae: A Review on Their Extraction, Purification, Structure, and Bioactivities, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 22: 1-11.
115. Tran Duc Manh, Nguyen Toan Thang, Hoang Thanh Son, et al. (2019), Golden Camellias: A Review, *Archives of Current Research International*, 16 (2): 1-8.
116. Đỗ Văn Tuấn (2015), Một số kết quả bảo tồn hai loài trà hoa vàng Tam Đảo (*Camellia tamdaoensis* Hakoda et Ninh) và Trà vàng Petelo (*Camellia petelotii* (Merr.)Sealy) thuộc chi chè (*Camellia* L.) tại vườn

Quốc gia Tam Đảo, *Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 6*: 1791-1797.

117. Luong Van Dung, Le Anna, Nguyen Thi Hanh, et al. (2016), *Camellia thuongiana* - a new yellow camellia species from Viet Nam, *Dalat university journal of science*, 6 (3): 338-344.
118. Jiang L. N., Li J. Y., Fan Z. Q., et al. (2020), Content Analysis of Polyphenols in Flowers of Yellow Camellia, 33 (4): 117-126.
119. Wei J.B, Li X., Song H., et al. (2015), Characterization and determination of antioxidant components in the leaves of *Camellia chrysantha* (Hu) Tuyama based on composition–activity relationship approach, *Journal of Food and Drug Analysis*, 23 (1): 40-48.
120. Nguyen Thanh Tuyen, Tran Van Hieu, Pham Gia Dien, et al. (2020), *Flavonoids from the Camellia hakodae Ninh flowers*, 2020 International Camellia Congress, Goto, Japan, 196-202.
121. Nguyen Thi Tuyen, Tran Van Hieu, Pham Gia Dien, et al. (2019), A new sexangularetin derivative from *Camellia hakodae*, *Natural Product Communications*, 14 (9): 1-4.
122. Nguyen Thanh Tuyen, Pham Gia Dien, Nguyen The Hung, et al. (2024), A new flavanoneglycoside with antimicrobial and cytotoxic activities from *Camellia hakodae*Ninh leaves, *Vietnam Journal of Science and Technology*, (4): 686-696.
123. Nguyen Thanh Tuyen, Cao Duc Tuan, Tran Hong Ngoc, et al. (2024), Pentacyclic triterpenes from the leaves of *Camellia hakodae* Ninh, *Natural Product Research*, 38 (1): 1-6.
124. Song L., Wang X., Zheng X., et al. (2011), Polyphenolic antioxidant profiles of yellow camellia, *Food Chemistry*, 129 (2): 351-357.

125. Xiaoying H., Hongzhi D., Rui Y., et al. (2018), The antitumor activity screening of chemical constituents from *Camellia nitidissima* Chi, *International journal of molecular medicine*, 41: 2793-2801.
126. Rui Y., Yuing G., Jinwei Z., et al. (2018), Phytochemicals from *Camellia nitidissima* chi flowers reduce the pyocyanin production and motility of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Frontiers in Microbiology*, 8: 1-13.
127. Zhennan W., Ying H., Rui Y., et al. (2020), Anti-inflammatory activity of 3-cinnamoyltribuloside and its metabolomic analysis in LPS-activated RAW 264.7 cells, *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20 (329): 1-13.
128. Nguyễn Quốc Thái, Nguyễn Hữu Lạc Thủy, Hà Thị Thu Phương, et al. (2023), Khảo sát độc tính cấp và đánh giá tác dụng hạ đường huyết của cao hoa trà hoa vàng (*Camellia flava*) trên mô hình gây tăng đường huyết trên chuột nhắt trắng bằng alloxan, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 527 (1B): 316-319.
129. Nguyễn Hồng Hạnh, Nguyễn Hoàng Ngân, Nguyễn Thị Thanh Tú (2022), Tác dụng hạ glucose máu của hỗn hợp dịch chiết Trà hoa vàng, Giáo cổ lam, Dây thìa canh lá to, Xạ đen trên chuột nhắt trắng gây đái tháo đường type 2, *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 160 (12V1): 259-267.
130. Dongye H., Ping Z., Xuan S., et al. (2017), Hypolipidemic activity of *Camellia euphlexia* flower extract in high-fat-fed mice, *Plant Foods for Human Nutrition*, 72 (4): 372-379.
131. Zhang H. L., Wu Q. X., Qin X. M. (2020), *Camellia nitidissima* Chi flower extract alleviates obesity and related complications and modulates gut microbiota composition in rats with high-fat-diet-induced obesity, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100 (12): 4378-4389.
132. Nguyễn Hồng Hạnh, Nguyễn Thanh Hà Tuấn, Nguyễn Thị Thanh Tú (2022), Hiệu quả giảm cân và hạ lipid máu của hỗn hợp dịch chiết lá Trà

hoa vàng và Giảo cổ lam trên chuột nhắt trắng gây béo phì, *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 156 (8): 164-172.

133. Dongye H., Yongping X. (2022), Toxicological evaluation of *Camellia euphlebia* leaves aqueous extract using acute and subacute toxicity studies in mice and genotoxicity studies, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022: 1-10.
134. Nguyen Hong Hanh, Nguyen Hoang Ngan, Truong Van Cuong (2020), Assessment of acute and sub-chronic toxicity of *Camellia hakodae* Ninh leaves aqueous extracts in experimental animals, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 14 (7): 203-211.
135. Bộ Y tế (2015), Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT "Quyết định về việc ban hành tài liệu chuyên môn "Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu"
136. Organization of Economic Co-operation and Development - OECD (2018), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents.
137. Whycliffe M. A., Cromwell M. K., Joan M. N., et al. (2019), Anti-obesity effects of dichloromethane leaf extract of *Gnidia glauca* in high fat diet-induced obese rat, *Heliyon*, 5: 1-15.
138. Bộ Y tế (2007), Một số nguyên tắc xây dựng bảng thành phần thực phẩm Việt Nam, *Bảng thành phần thực phẩm Việt Nam (Vietnamese food composition table)*, Nhà xuất bản Y học, 6 - 10.
139. Lee M. O. (1929), Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results, *American Physiological Society*, 89 (1): 24-33.
140. Lê Hoàng Bích Nga, Trần Thị Thắm, Lê Thu Hằng, et al. (2023), Đánh giá giá trị sử dụng một số công thức tính toán nồng độ low density lipoprotein cholesterol máu, *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 171 (10): 186-194.

141. Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, Nhà xuất bản Y học, 15-27.
142. United Nations (2011), Acute toxicity, *Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)*, United Nations, 109-120.
143. Tạ Thành Văn (2013), Hóa sinh lâm sàng bệnh gan mật, *Hóa sinh lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, 180-224.
144. Tạ Thành Văn (2013), Hóa sinh lâm sàng bệnh thận - tiết niệu, *Hóa sinh lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, 206-224.
145. Kamiji M. M., Inui A. (2007), Neuropeptide Y Receptor Selective Ligands in the Treatment of Obesity, *Endocrine Reviews* 28 (6): 664-684.
146. Simon O. A., Fred K. O., Nam H. K., et al. (2023), Insights on Dietary Polyphenols as Agents against Metabolic Disorders: Obesity as a Target Disease, *Antioxidants*, 12 (416): 1-36.
147. Nour Y., Nawal A., Majed J., et al. (2018), The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols, *Nutrients*, 10 (11): 1-23.
148. Jeany P., Putri D. A., Hazrina P. A., et al. (2024), The effects of brown rice as functional food on Lee Index, adipose tissues and PRDM16 levels in obesity model *Rattus norvegicus*, *Healthcare in Low-resource Settings*: 1-17.
149. Phạm Thị Vân Anh, Lương Xuân Hưng, Phạm Quốc Sự, et al. (2023), Tác dụng giảm cân của Mubella trên chuột nhắt trắng gây béo phì bằng chế độ ăn giàu chất béo và olanzapin, *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 169 (8): 260-270.
150. Jensen M. D. (2008), Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity, *J Clin Endocrinol Metab*, 93 (11): s57-s63.
151. Nguyễn Hữu Lạc Thủy, Khưu Minh Hiền, Nguyễn Hào Khang, et al. (2024), Đánh giá tác dụng giảm béo phì của cao lá và cao hoa Trà hoa vàng (*Camellia flava* (Pitard) Sealy) trên mô hình béo phì trên chuột nhắt

trắng bằng chế độ ăn giàu chất béo, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 543: 212-216.

152. Sangmo H., Kyungdo H., Jung H. P., et al. (2023), Higher Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol Was Higher Associated With Cardiovascular Disease Comparing Higher LDL-C in Nine Years - Follow Up: Cohort Study, *Journal of Lipid and Athrosclerosis*, 12 (2): 164 - 174.
153. Lucia C. C., Jose L. C. (2020), Pharmacokinetic Aspects of Statins, *Statin Therapy*, IntechOpen, 1-19.
154. Jihang C., Pou K. L., Hoi Y. L., et al. (2019), Biochemical mechanisms of the anti-obesity effect of a triterpenoid-enriched extract of *Cynomorium songaricum* in mice with high-fat-diet-induced obesity, *Phytomedicine*, 153038: 1-9.
155. Carlos E. C., Márcia R. S. T. K. (2017), Phytosterols in the Treatment of Hypercholesterolemia and Prevention of Cardiovascular Diseases, *Arq Bras Cardiol*, 109 (5): 475-482.
156. Yongwang Y., Qing L., Ling S., et al. (2022), Chlorogenic acid improves glucose tolerance, lipid metabolism, inflammation and microbiota composition in diabetic db/db mice, *Frontiers in Endocrinology*, 17: 1-10.
157. Álvaro H., Sara F.C., Marta F., et al. (2014), Olive Oil Polyphenols Enhance High-Density Lipoprotein Function in Humans - A Randomized Controlled Trial, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34: 2115 - 2119.
158. Saputra I. P. B. A., Arjita I. P. D. (2024), The Potential of Flavonoid Derivative Compounds as Inhibitors of the HMG-CoA Reductase Enzyme for Candidate of Hypercholesterolemia Drugs, *Journal of Research in Science Education*, 10 (5): 2286-2293.
159. Jinjin Z., Ke M., Junjie H., et al. (2018), Eight new triterpenoids with inhibitory activity against HMG-CoA reductase from the medical

mushroom *Ganoderma leucocontextum* collected in Tibetan plateau, *Fitoterapia*, 130 (2018): 79-88.

160. Yatian J., Qian Z., Yihua Z., et al. (2024), Effects of Polyphenol-Rich Foods on Lipids and Oxidative Stress Status in Patients with Hyperlipidemia: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials, *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, 17: 3167-3179.
161. Manisha S., Thilini T., Ravi S., et al. (2020), Managing Obesity through Natural Polyphenols: A Review, *Future Foods*, 100002: 1-51.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Bản giám định tên khoa học của mẫu nghiên cứu

VIỆN SINH THÁI VÀ
TÀI NGUYÊN SINH VẬT
PHÒNG THỰC VẬT

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

Kính gửi: ThS. **Ngô Thị Mỹ Bình** – Trường Đại học Y- Dược, Đại học Thái Nguyên.

Chúng tôi nhận được đề nghị giám định tên khoa học cho mẫu tiêu bản ThS. Ngô Thị Mỹ Bình vào ngày 10 tháng 04 năm 2022. Chúng tôi đã tiến hành giám định

Người giám định: **TS. Bùi Hồng Quang**

Các thông tin về mẫu vật: 02 mẫu vật mang số hiệu (MB01, 10/03/2022) ở dạng tiêu bản tươi, khô, có đủ tiêu chuẩn để định loại bao gồm cơ quan sinh sản (hoa), và cơ quan sinh dưỡng (lá) và các thông tin ghi chép được tại thực địa. Mẫu giám định sẽ được lưu giữ tại phòng tiêu bản thực vật (HN) Viện sinh thái và Tài nguyên sinh vật 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội.

Nơi thu mẫu: xã Tam Quan, huyện Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc

Ngày, tháng thu mẫu: 10/03/2022

Người thu mẫu: Ngô Thị Mỹ Bình

Kết quả giám định mẫu thực vật mang số hiệu (MB-01, 10/03/2022)

Tên khoa học: họ Trà (Theaceae) *Camellia hakodae* NINH

Tên Việt Nam: Trà hoa vàng Hakoda. Chúng tôi xin gửi tới ThS. Ngô Thị Mỹ Bình – Trường Đại học Y- Dược, Đại học Thái Nguyên.

Hà Nội, ngày 22 tháng 03 năm 2022

Người giám định



Bùi Hồng Quang

Xác nhận của Viện sinh thái và
Tài nguyên sinh vật

PHÓ VIỆN TRƯỞNG

Trương Xuân Lam

Phụ lục 2. Bản tiêu chuẩn cơ sở của cao khô lá cây Trà hoa vàng

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

BỘ QUỐC PHÒNG HỌC VIỆN QUÂN Y	CAO KHÔ LÁ CÂY TRÀ HOA VÀNG	Số: TC-CTHV-2021
		Có hiệu lực từ ngày ký

Nguồn gốc: Cao khô lá cây trà hoa vàng là sản phẩm được chiết xuất, làm khô từ lá trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh). Cao khô lá cây trà hoa vàng được bảo chế theo phương pháp chiết siêu âm với dung môi ethanol 96%, dịch chiết được loại tạp, cô đặc sau đó phun sấy để được bột cao khô.

I. YÊU CẦU KỸ THUẬT

1.1. Nguyên liệu

Lá cây trà hoa vàng (<i>Camellia hakodae</i> Ninh)	Đạt TCCS
Ethanol 96%	Đạt TC DDVN V

1.2. Yêu cầu chất lượng

1.2.1. **Tính chất:** Bột khô tơi, màu vàng nâu, mùi thơm nhẹ, vị hơi chát.

1.2.2. **Mất khối lượng do làm khô:** Không quá 5,0%.

1.2.3. **Tro toàn phần:** Không quá 5,0%.

1.2.4. **Kim loại nặng:** Không quá 20 ppm.

1.2.5. **Định tính:** Phải có phép thử định tính của polyphenol

1.2.6. **Định lượng:** Hàm lượng polyphenol toàn phần không nhỏ hơn 50 mgGAE/g cao khô.

1.2.7. **Độ nhiễm khuẩn:** Tổng số vi sinh vật hiếu khí không quá 10^4 CFU/g; tổng số nấm không quá 10^2 CFU/g; Không quá 10^2 CFU vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong 1 g. Không có *Salmonella* trong 10 g. Không có *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* trong 1 g.

II. PHƯƠNG PHÁP THỬ

2.1. Tính chất

Thử bằng cảm quan, chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.

2.2. Độ ẩm

Tiến hành theo phương pháp “Mất khối lượng do làm khô”, phụ lục 9.6-ĐDVN V; dùng khoảng 1,0 g bột cao.

Cách tiến hành:

Dùng dụng cụ sấy thủy tinh rộng miệng đáy bằng có nắp mài làm bì đựng mẫu thử; sấy khô bì trong ở 105°C đến khối lượng không đổi rồi cho vào thiết bị hút ẩm đến nhiệt độ phòng, cân để xác định khối lượng bì (m_0). Cân ngay vào bì này một lượng chính xác khoảng 1,0 g mẫu cao m_1 (g), sai số $\pm 10\%$. Lượng mẫu thử được dàn mỏng thành lớp có độ dày không quá 5 mm. Rồi đem sấy ở 105°C trong 4h đến khối lượng không đổi m_2 (g). Sau khi sấy phải làm nguội tới nhiệt độ phòng cân trong bình hút ẩm có silica gel rồi cân ngay. Làm khô đến khối lượng không đổi, tức là sự chênh lệch khối lượng sau khi sấy thêm 1 giờ trong tủ sấy so với lần sấy trước đó không quá 0,5 mg. Tiến hành thí nghiệm 3 lần lấy giá trị trung bình. Công thức tính:

$$X1 \% = \frac{m_0 + m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$$

2.3. Tro toàn phần

Tiến hành theo phụ lục 9.8- ĐDVN V.

Cho 2-3g cao đem thử vào một chén sứ hoặc chén platin đã nung và cân bì. Nung ở nhiệt độ không quá 450°C tới khi không còn carbon, sau đó làm nguội rồi cân lượng thu được. Bằng cách này mà tro chưa loại được hết carbon thì dùng một ít nước nóng cho vào khối chất đã than hóa, dùng thìa thủy tinh khuấy đều, sau đó lọc qua giấy lọc không tro. Rửa thìa thủy tinh và giấy lọc, tập trung nước rửa vào dịch lọc. Cho giấy lọc và cặn vào chén nung rồi nung đến khi thu được tro màu trắng hoặc gần như trắng. Hợp dịch lọc vào cặn trong chén nung, đem bốc hơi đến khô rồi nung ở nhiệt độ không quá 450°C đến khi khối lượng không đổi. Tính tỷ lệ phần trăm của tro toàn phần theo cao được liệu đã làm khô.

2.4. Kim loại nặng

Tiến hành theo phương pháp 3, phụ lục 9.4.8, ĐDVN V.

Cách tiến hành:

Dung dịch thử: Lấy 1,0 g mẫu thử cho vào một chén nung sứ. Thêm 4 ml dung dịch magesi sulfat 25 % trong acid sulfuric 1 M (TT). Trộn đều bằng một thìa thủy tinh nhỏ rồi đun nóng cẩn thận. Nếu hỗn hợp là một chất lỏng thì làm bay

hơi từ từ trên cách thủy đến khô. Đốt dần dần để chế phẩm cháy hết và tiếp tục đốt cho đến khi thu được cặn có màu gần trắng hay ít nhất là xám nhạt. Tiến hành nung ở nhiệt độ không quá 800°C. Để nguội. Làm ẩm cặn bằng vài giọt dung dịch acid sulfuric 1M (TT). Bốc hơi, nung lại và để nguội. Toàn bộ thời gian nung không được quá 2h. Hòa tan cặn trong dung dịch acid hydrocloric 2 M (TT) 2 lần, mỗi lần dùng 5 ml. Thêm 0,1 ml dung dịch phenolphthalein (TT), cho từng giọt amoniac (TT) đến khi có màu hồng. Để nguội, thêm acid acetic băng (TT) đến khi dung dịch mất màu và thêm thừa 0,5 ml nữa. Lọc nếu cần và pha loãng dung dịch với nước thành 20 ml.

Dung dịch đối chiếu: Tiến hành theo chỉ dẫn ở phần dung dịch thử, dùng 2ml dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT) như đã ghi trong chuyên luận thay cho chế phẩm. Thêm 2 ml dung dịch thử vào 10 ml dung dịch thu được.

Dung dịch kiểm tra: Tiến hành theo chỉ dẫn ở phần dung dịch thử, dùng lượng chế phẩm như lượng dùng để chuẩn bị dung dịch thử và thể tích dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT) như thể tích dùng để chuẩn bị dung dịch đối chiếu. Thêm 2 ml dung dịch thử vào 10 ml dung dịch thu được.

Dung dịch mẫu trắng: Hỗn hợp gồm 10 ml nước và 2 ml dung dịch thử. Lấy 12 ml của mỗi dung dịch trên, thêm 2 ml dung dịch đệm acetat pH 3,5 (TT). Lắc đều và thêm dung dịch thu được vào 1,2 ml dung dịch thioacetamid (TT), lắc đều ngay. Quan sát các dung dịch sau 2 min.

Tính thích hợp của phép thử: Dung dịch đối chiếu phải có màu nâu nhạt khi so sánh với dung dịch mẫu trắng và dung dịch kiểm tra phải có màu ít nhất là đậm bằng màu của dung dịch đối chiếu.

Đánh giá kết quả: Màu nâu của dung dịch thử, nếu có, không được đậm hơn màu của dung dịch đối chiếu. Nếu như khó đánh giá kết quả, lọc các dung dịch qua màng lọc 0,45 µm. Tiến hành lọc chậm và đều với áp lực lên piston nhẹ nhàng và liên tục. So sánh màu sắc của các vết trên màng lọc thu được từ các dung dịch.

2.5. Định tính

Lấy 0,5 g cao khô THV hòa tan và pha loãng vừa đủ 100 ml. Hút chính xác khoảng 10,0 ml dung dịch này và thêm nước pha loãng vừa đủ 100ml. Lấy chính xác 1,0ml dung dịch vào bình định mức 10 ml, thêm 5,0 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu, lắc đều, để 5-8 phút. Bổ sung thêm 4 ml dung dịch Na_2CO_3 bão hòa lắc đều. Để yên trong 60 phút.

Kết quả: Chế phẩm sau phản ứng với thuốc thử có màu xanh và có cực đại hấp thụ tại vùng bước sóng 755- 765 nm.

2.6. Định lượng

Tiến hành định lượng polyphenol toàn phần bằng phương pháp đo quang, sử dụng chất chuẩn là acid gallic và thuốc thử Folin-Cioalteu theo TCVN 9745-1-2013 (ISO 14502-1-2005).

Nguyên tắc: Trong thành phần thuốc thử Folin-Cioalteu có phức hợp phospho wolfram – phosphomolybdat. Phức hợp này bị khử bởi các hợp chất polyphenol tạo thành sản phẩm phản ứng có màu xanh dương, hấp thụ cực đại ở bước sóng 765nm. Hàm lượng polyphenol có trong mẫu tỉ lệ thuận với cường độ màu.

Tiến hành:

- Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0,5g cao khô, hòa tan và pha loãng vừa đủ 100ml. Hút chính xác khoảng 10,0ml dung dịch này và thêm nước pha loãng vừa đủ 100ml để tạo mẫu thử có nồng độ 0,5mg/mL.

- Chuẩn bị mẫu chuẩn: Cân $(0,110 \pm 0,001)$ g axit gallic ngâm một phân tử nước ($M = 188,14$) cho vào bình định mức một vạch 100 ml. Hòa tan trong nước, pha loãng đến vạch và trộn. Dùng pipet chuyển các thể tích dung dịch chuẩn gốc axit gallic vào bình định mức một vạch 100 ml theo bảng 1. Pha loãng đến vạch bằng nước và lắc.

Bảng 1 - Dung dịch chuẩn axit gallic pha loãng

Dung dịch chuẩn axit gallic	Thể tích của dung dịch gốc axit gallic (ml)	Nồng độ danh định của chất chuẩn pha loãng ($\mu\text{g/ml}$)
A	1,0	10
B	2,0	20
C	3,0	30
D	4,0	40
E	5,0	50

- Phản ứng tạo màu:

+ Mẫu chuẩn: Hút 1,0 ml mẫu chuẩn acid galic cho vào bình định mức 10ml. Thêm 5,0 ml thuốc thử Folin-Cioalteu, lắc đều, để yên 5-8 phút. Bổ sung thêm 4ml dung dịch Na_2CO_3 bão hòa, lắc đều, để yên trong 60 phút.

+ Mẫu thử: Hút 1,0 ml mẫu thử cho vào bình định mức 10ml. Thêm 5,0 ml thuốc thử Folin-Cioalteu, lắc đều, để yên 5-8 phút. Bổ sung thêm 4ml dung dịch Na_2CO_3 bão hòa, lắc đều, để yên trong 60 phút.

+ Mẫu trắng: Hút 1,0 ml nước cất cho vào bình định mức 10ml. Thêm 5,0 ml thuốc thử Folin-Cioalteu, lắc đều, để yên 5-8 phút. Bổ sung thêm 4ml dung dịch Na_2CO_3 bão hòa, lắc đều, để yên trong 60 phút.

Đo độ hấp thụ của các dung dịch trên ở bước sóng 765nm.

- Xây dựng đường chuẩn và phương trình hồi quy tuyến tính của acid gallic: Dụng đường chuẩn tuyến tính phù hợp nhất từ khối lượng của axit gallic khan trong các chất chuẩn A, B, C, D và E dựa vào mật độ quang của dung dịch chuẩn axit gallic sau khi trừ đi mật độ quang của mẫu trắng thuốc thử. Phương trình đường chuẩn có dạng $y = ax + b$.

- Nồng độ polyphenol tổng (C) được tính theo công thức:

$$C = \frac{(Y-b)}{a} \times \frac{H}{100} (\mu\text{g/ml})$$

Trong đó: + a, b: hệ số của phương trình đường chuẩn

+ Y: độ hấp thụ quang của dung dịch đo quang của mẫu thử

+ H: độ tinh khiết của chất chuẩn (%)

- Hàm lượng polyphenol toàn phần (X) có trong cao THV khô tuyệt đối được tính theo công thức:

$$X = \frac{C \times 10^{-3} \times V \times K}{M_{dl} \times (100-a) \times 10^{-2}} (\text{mgGAE/g cao khô})$$

Trong đó: + C: nồng độ dung dịch đo quang của mẫu thử ($\mu\text{g/ml}$)

+ V: thể tích dung môi hòa tan (ml)

+ K: hệ số pha loãng ($K=10$)

+ M_{dl} : khối lượng cao khô (g)

+ a: độ ẩm cao khô (%)

2.7. Độ nhiễm khuẩn

Tiến hành thử theo phương pháp đĩa thạch, Phụ lục 13.6, “Thử giới hạn nhiễm khuẩn”- DDVN V.

2.7.1. Chuẩn bị môi trường

Tên môi trường	Mục đích sử dụng
Dung dịch casein đậu tương	Phát hiện vi khuẩn hiếu khí và vi nấm Môi trường tăng sinh <i>Staphylococcus aureus</i>
Môi trường lỏng enterobacteria-Mossel	Tăng sinh vi khuẩn gram âm dung nạp mật
Môi trường lỏng MacConkey	Tăng sinh <i>E.coli</i>
Môi trường lỏng Salmonella Rappaport Vassiliadis	Tăng sinh salmonella
Thạch casein đậu tương	Đếm tổng số vi sinh vật hiếu khí
Thạch Sabouraud -dextrose	Đếm tổng số nấm
Thạch glucose muối mật tím đỏ	Phát hiện vi khuẩn gram dung nạp mật (enterobacteria)
Thạch MacConkey	Phát hiện <i>E. coli</i>
Thạch xylose, lysin, deoxycholat	Phát hiện salmonella
Thạch manitol Manitol	Môi trường phát hiện <i>Staphylococcus aureus</i>

2.7.2. Xác định tổng số vi sinh vật

Cách tiến hành:

Lấy 10 g mẫu cao khô nghiền nhỏ rồi phân tán trong 100ml dung dịch casein đậu tương. Lấy 1 ml hỗn dịch mẫu thử cho vào đĩa petri (tiến hành với 2 đĩa) sau đó rót vào mỗi đĩa 10-15 ml môi trường thạch casein đậu tương và thạch Sabouraud -dextrose.

Ủ môi trường thạch casein đậu tương để phát hiện vi sinh vật hiếu khí ở 30° C – 35° C trong 3-5 ngày. Ủ môi trường thạch Sabouraud -dextrose phát hiện nấm men/mốc ở 20°C - 25°C trong 5-7 ngày.

Đánh giá kết quả:

- Khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường thạch casein đậu tương được xác định là vi sinh vật hiếu khí
- Khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường thạch Sabouraud -dextrose được xác định là nấm mốc/men.
- Trên các đĩa mẫu trắng không được phát hiện thấy sự phát triển của khuẩn lạc.

2.7.3. Xác định vi sinh vật gây bệnh

Xác định vi khuẩn Gram âm dung nạp mật

Chuẩn bị mẫu thử và tiền ủ:

Lấy 1,0 g mẫu thử pha loãng 10 lần trong dung dịch casein đậu tương. Trộn đều và ủ ở 20-25°C trong khoảng 2-5h. Lấy 1ml hỗn dịch và tiến hành tăng sinh trong 100ml môi trường enterobacteria-Mossel. Ủ ở 30-35°C trong 24h. Sau đó cấy chuyển sang môi trường thạch muối mật tím đỏ. Ủ ở 30-35°C trong 18h-24h.

Mẫu thử không có *enterobacteria* nếu không thấy khuẩn lạc mọc trên môi trường.

Phân lập và cấy chuyển: cấy lượng mẫu thử đã được chuẩn bị theo phần *Chuẩn bị mẫu thử và tiền ủ* tương ứng chứa 0,1 g; 0,01 g và 0.001 g thuốc vào thể tích thích hợp môi trường lỏng tăng sinh Enterobacteria-Mossel. Tiến hành ủ ở 30-35°C trong 24h-48h. Cấy chuyển từ mỗi ống môi trường trên sang môi trường thạch muối mật tím đỏ. Ủ ở 30-35°C trong 18h-24h.

Đánh giá kết quả: Khuẩn lạc mọc trên môi trường chứng tỏ kết quả dương tính. Ghi lượng nhỏ nhất của chế phẩm mà ở đó cho kết quả dương tính và lượng lớn nhất của chế phẩm mà ở đó cho kết quả âm tính. Xác định số lượng vi khuẩn gram âm dung nạp mật theo công bảng sau:

Kết quả đối với lượng sản phẩm			Số vi khuẩn có trong 1 g sản phẩm
0,1 g	0,01 g	0,001 g hoặc	
+	+	+	$> 10^3$
+	+	-	$< 10^3$ và $> 10^2$
+	-	-	$< 10^2$ và > 10
-	-	-	< 10

Xác định Escherichia coli

Chuẩn bị mẫu thử và tiền ủ: Lấy không dưới 1 g, pha loãng 10 lần như mô tả trong phần chuẩn bị mẫu thử. Cấy 10 ml tương ứng với 1 g mẫu thử vào một thể tích phù hợp môi trường lỏng casein đậu tương, trộn đều và ủ ở 30-35°C trong 18h-24h.

Phân lập và cấy chuyển: Lắc bình môi trường lỏng casein đậu tương, cấy chuyển 1 ml môi trường lỏng casein đậu tương sang 100 ml môi trường lỏng MacConkey và ủ ở 42°C đến 44°C trong 24 h đến 48 h. Tiếp tục cấy chuyển sang đĩa môi trường thạch MacConkey và ủ ở 30-35°C trong 18h đến 72h. Đánh giá kết quả: Khuẩn lạc mọc trên môi trường cho thấy mẫu thử có thể có *E. coli*. Tiếp tục xác định bằng nhiều phản ứng sinh hóa khác. Mẫu thử không có *E. coli* nếu không có khuẩn lạc mọc trên môi trường hoặc các phản ứng sinh hóa để xác định *E. coli* có kết quả âm tính.

Xác định salmonella

Chuẩn bị mẫu thử và tiền ủ: Lấy lượng 10g mẫu thử và cấy vào một thể tích phù hợp môi trường lỏng casein đậu tương, trộn đều và ủ ở 30°C - 35°C trong 18h đến 24h.

Phân lập và cấy chuyển:

Cấy chuyển 0,1ml môi trường lỏng casein đậu tương sang 10ml môi trường tăng sinh *Salmonella* Rappaport Vassiliadis và ủ ở 30°C - 35°C trong 18h đến 24h. Tiếp tục cấy chuyển sang đĩa môi trường thạch xylose, lysin, deoxycholat và ủ ở 30°C - 35°C trong 18h đến 48h.

Đánh giá kết quả:

Khuẩn lạc màu đỏ, có hoặc không có trung tâm màu đen mọc trên môi trường cho thấy mẫu thử có thể có *Salmonella*. Tiếp tục xác định bằng nhiều phản ứng sinh hóa khác.

Mẫu thử không có *Salmonella* nếu không có khuẩn lạc có đặc điểm mô tả ở trên mọc trên môi trường hoặc các phản ứng sinh hóa để xác định *Salmonella* có kết quả âm tính

Phát hiện staphylococcus aureus

Chuẩn bị mẫu thử và tiền ủ: Lấy không dưới 1g mẫu thử, pha loãng 10 lần.

Cấy 10ml hoặc 1 lượng tương ứng với 1g mẫu thử vào một thể tích phù hợp môi trường lỏng casein đậu tương, trộn đều, ủ ở 30°C - 35°C trong 18h đến 24h.

Phân lập và cấy chuyển:

Cấy chuyển sang đĩa môi trường thạch muối manitol và ủ ở 30°C - 35°C trong 18h đến 72h.

Đánh giá kết quả: Khuẩn lạc màu vàng hoặc trắng có vòng màu vàng bao quanh mọc trên môi trường cho thấy mẫu thử có thể có *S.aureus*. Tiếp tục xác định bằng phản ứng sinh hóa sau:

- Các khuẩn lạc nghi ngờ đem đi nhuộm Gram, bắt màu gram (+)
- Phản ứng catalaza: Lấy khuẩn lạc từ thạch và cho vào một giọt dung dịch hydro peroxit trên lam kính. Sự hình thành bọt khí chứng tỏ phản ứng dương tính.

Mẫu thử không có *S.aureus* nếu không có khuẩn lạc có đặc điểm mô tả ở trên mọc trên môi trường hoặc các phản ứng sinh hóa để xác định *S.aureus* có kết quả âm tính

III. ĐÓNG GÓI, GHI NHÃN, BẢO QUẢN

Đóng trong túi polyethylen (PE) 2 lớp, hàn kín.

Nhãn rõ ràng, đúng quy chế.

Bảo quản nơi khô ráo, thoáng mát, tránh ánh sáng.

Hạn dùng: 24 tháng kể từ ngày sản xuất.

Hà Nội, ngày 08 tháng 4 năm 2022

CƠ QUAN XÂY DỰNG
TIÊU CHUẨN

NGƯỜI XÂY DỰNG
TIÊU CHUẨN


Nguyễn Công Bằng

CƠ QUAN
THẨM ĐỊNH TIÊU CHUẨN




VIỆN TRƯỞNG
Trần Xuân Đức



Phụ lục 3. Phương pháp định lượng các chỉ số sinh hóa máu

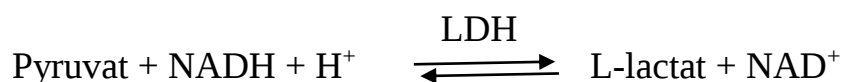
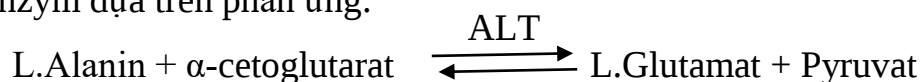
(Theo QĐ số 320/QĐ-BYT ngày 23/01/2014 của Bộ trưởng Bộ Y tế)

Mẫu máu thử nghiệm được lấy từ xoang hốc mắt chuột, sau đó đem ly tâm 3000 vòng trong 15 phút ở nhiệt độ phòng, lấy huyết tương. Huyết tương được ủ với thuốc thử đặc hiệu trước khi đo quang để định lượng các chỉ số sinh hóa máu.

Máy móc, hóa chất được cài đặt và chuẩn trước khi thực hiện các phân tích. Đưa bệnh phẩm vào phân tích theo protocol của máy. Chờ và đọc kết quả.

❖ Đo hoạt độ Alanin transaminase (ALT)

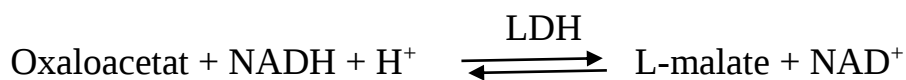
Hoạt độ enzym ALT trong máu được xác định theo phương pháp động học enzym dựa trên phản ứng:



Hoạt độ ALT được đo bằng sự giảm nồng độ NADH ở bước sóng 340nm theo thời gian.

❖ Đo hoạt độ Aspatat transaminase (AST)

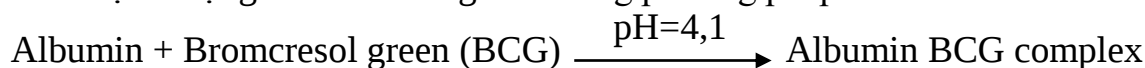
Hoạt độ enzym AST trong máu được xác định theo phương pháp động học enzym dựa trên phản ứng:



Hoạt độ AST được đo bằng sự giảm nồng độ NADH ở bước sóng 340nm theo thời gian.

❖ Định lượng Albumin

Định lượng albumin trong máu bằng phương pháp so màu.



Phức hợp Albumin BCG có màu xanh tỷ lệ thuận với nồng độ albumin trong mẫu thử được đo ở bước sóng 570 nm.

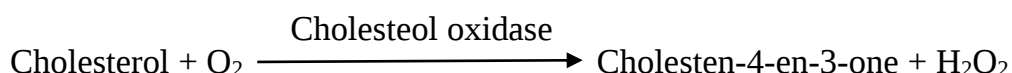
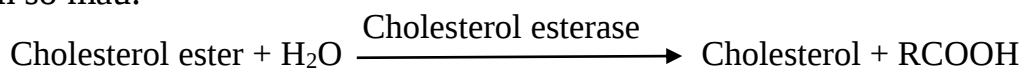
❖ Định lượng Creatinin

Creatinin là sản phẩm của quá trình thoái hóa creatin phosphat và creatin ở cơ. Creatinin máu được định lượng theo phương pháp Jaffe (đo điểm đầu và cuối)



❖ Định lượng Cholesterol toàn phần

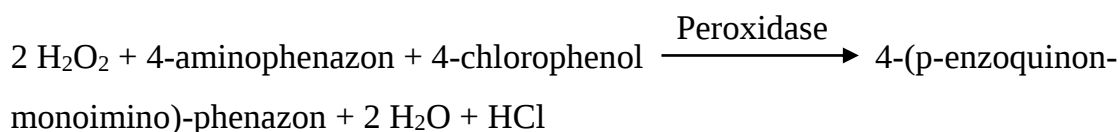
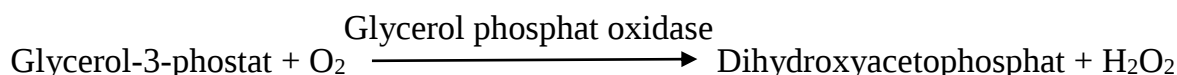
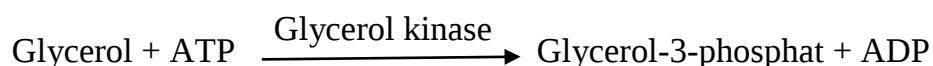
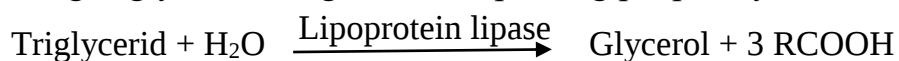
Cholesterol toàn phần trong máu được định lượng theo phương pháp enzym so màu.



Độ mạnh chất màu tỷ lệ với nồng độ cholesterol và có thể đo được bằng quang phổ ở bước sóng từ 480 – 520 nm.

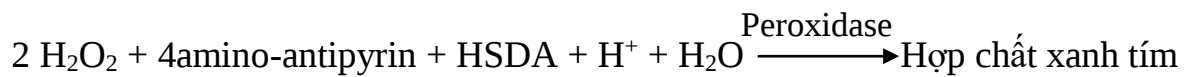
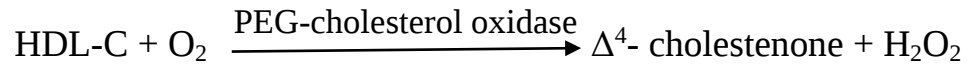
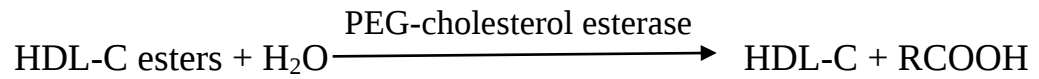
❖ Định lượng Triglycerid

Định lượng triglycerid trong máu theo phương pháp enzym so màu:



❖ **Định lượng HDL-C**

HDL-C được định lượng theo phương pháp enzym so màu:



(PEG: polyethylen glycol

HSDA: Sodium N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilin)

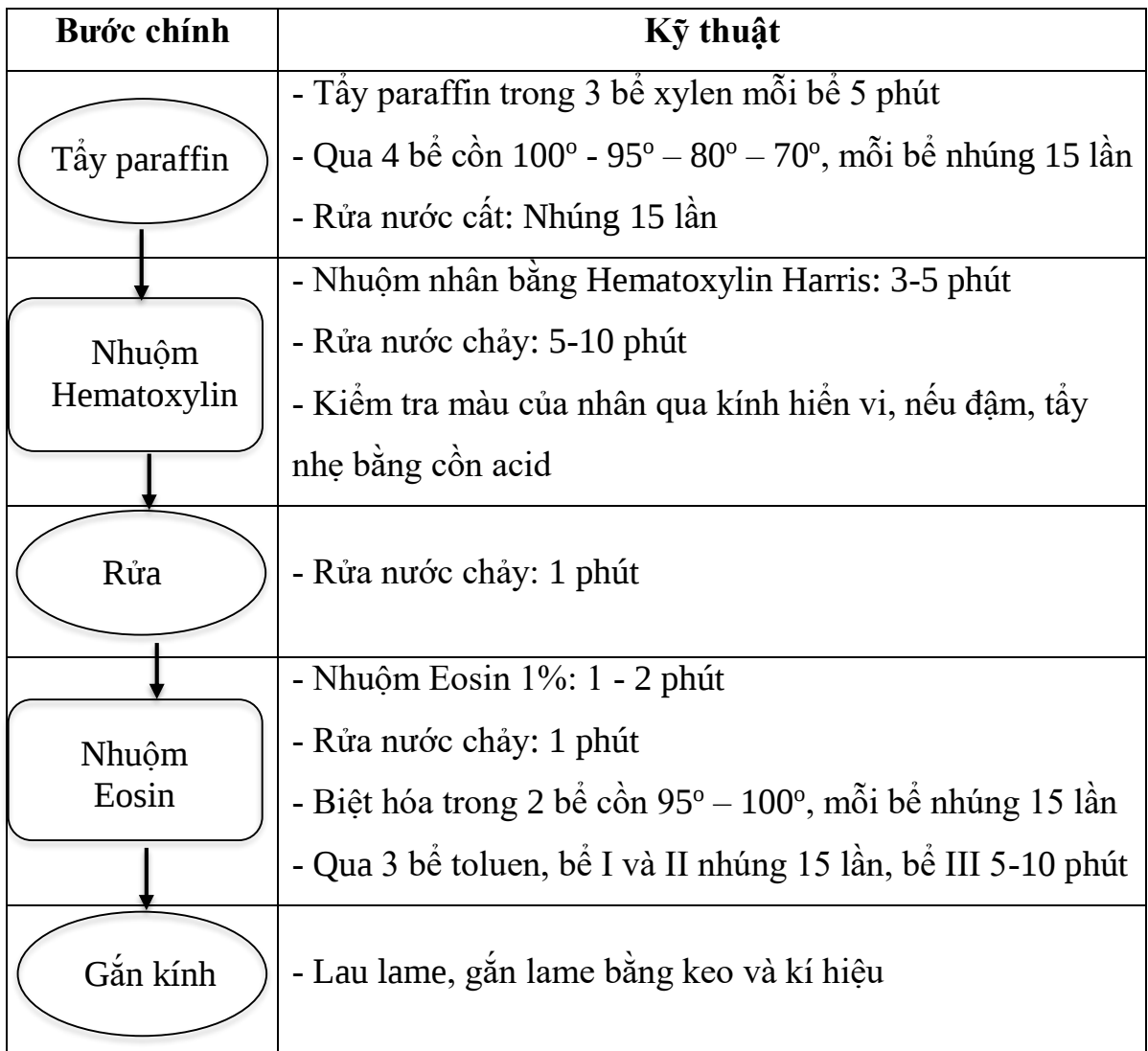
Phụ lục 4. Quy trình nhuộm mô H&E

(Theo QĐ số 5199/QĐ-BYT ngày 25/12/2013 của Bộ trưởng Bộ Y tế)

Nguyên tắc: Nhuộm H&E là phương pháp nhuộm hai màu liên tiếp.

Hematoxylin nhuộm nhân: Hematoxylin sau khi bị oxy hóa mất 2 nguyên tử H tạo thành anion Hematein mang điện tích âm, có ái lực mạnh đối với các thành phần cation mang điện tích dương ở nhiễm sắc chất trong nhân (dải màu có thể từ xanh đến tím). *Eosin nhuộm tế bào chất:* Eosin bắt màu bằng lực hút tĩnh điện giữa Eosin và các thành phần của bào tương (dải màu từ hồng đến đỏ).

Tiến hành:

Bước chính	Kỹ thuật
 Tẩy paraffin	- Tẩy paraffin trong 3 bể xylen mỗi bể 5 phút - Qua 4 bể cồn 100° - 95° - 80° - 70°, mỗi bể nhúng 15 lần - Rửa nước cất: Nhúng 15 lần
Nhuộm Hematoxylin	- Nhuộm nhân bằng Hematoxylin Harris: 3-5 phút - Rửa nước chảy: 5-10 phút - Kiểm tra màu của nhân qua kính hiển vi, nếu đậm, tẩy nhẹ bằng cồn acid
Rửa	- Rửa nước chảy: 1 phút
Nhuộm Eosin	- Nhuộm Eosin 1%: 1 - 2 phút - Rửa nước chảy: 1 phút - Biệt hóa trong 2 bể cồn 95° - 100°, mỗi bể nhúng 15 lần - Qua 3 bể toluen, bể I và II nhúng 15 lần, bể III 5-10 phút
Gắn kính	- Lau lame, gắn lame bằng keo và kí hiệu

Phụ lục 5. Bảng quy đổi năng lượng thành phần thức ăn HFD

TT	Thành phần		Tỉ lệ	Hàm lượng (g)	Hệ số quy đổi	Năng lượng (kcal)
1	Tinh bột	Carbohydrat	100%	400	4	1600
2	Mỡ lợn	Chất béo	100%	200	9	1800
3	Cá	Protein	50%	300	4	600
		Chất béo	2%		9	62.1
4	Bơ	Chất béo	82%	30	9	221.4
5	Sữa bột nguyên kem	Protein	20%	20	4	16
		Chất béo	22.80%		9	41.04
		Carbohydrat	48.40%		4	38.72
6	Sữa đặc	Carbohydrat	7.10%	20	4	5.68
		Chất béo	8%		9	14.4
		Carbohydrat	56.20%		4	44.96
7	Lạc	Chất béo	50%	5	9	22.5
		Carbohydrat	20%		4	4
		Protein	25%		4	5
8	Cholesterol	Chất béo	-	10	0	0
9	Cystein	Protein		5	4	20
10	Vit và chất khoáng	Vit và chất khoáng		10	0	0
	Tổng			1000		4495.8

Phụ lục 6. Một số hình ảnh trong nghiên cứu



Hình ảnh cho chuột nhắt, chuột cống uống chế phẩm nghiên cứu bằng kim cong đầu tù chuyên dụng



Hình ảnh lấy máu xoang hốc mắt chuột



Hình ảnh chăm sóc và nuôi chuột



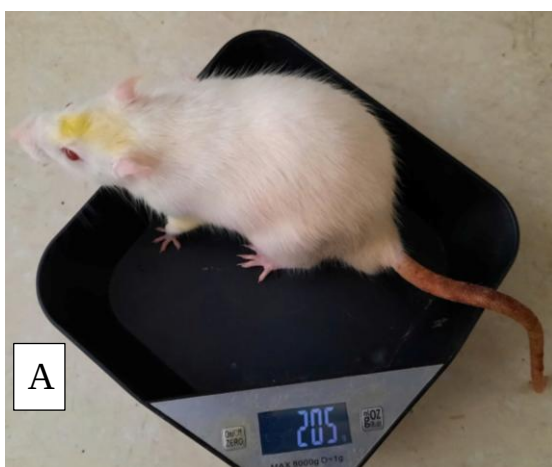
Hình ảnh phẫu tích chuột



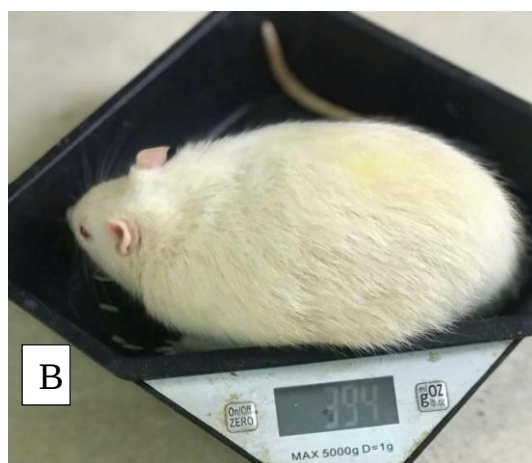
Hình ảnh các viên thức ăn cho chuột trong chế độ ăn HFD



Hình ảnh đo chiều dài và chu vi vòng bụng chuột



A



B

Hình ảnh chuột bình thường (A) và chuột béo phì (B)