

KHẢ NĂNG NGĂN NGỪA VÀ CHỐNG VIÊM CỦA CHIẾT XUẤT NƯỚC HÀNH ĐEN TRÊN MÔ HÌNH CHUỘT ĐƯỢC GÂY VIÊM KHỚP DẠNG THẤP VỚI FCA

TRẦN THỊ PHƯƠNG NHUNG^{1*}, TRẦN THỊ THANH NHÃ², TRƯƠNG THỊ MỸ ÚC¹, VŨ THỊ ÁNH TUYẾT¹, NGUYỄN TRƯỜNG SƠN¹, NGUYỄN THỊ KIM TRINH¹, QUẢNG TRẦN PHƯƠNG TUYỀN¹, TÔ MINH QUÂN¹, TRẦN HOÀI NINH¹, TRẦN PHẠM THÚY VY¹

¹ Viện Công nghệ sinh học và thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

² Khoa Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: tranthiphuongnhung@iuh.edu.vn

Tóm tắt. Viêm khớp dạng thấp là một rối loạn viêm mãn tính chủ yếu tấn công các khớp linh hoạt. Hành đen, sản phẩm chế biến mới từ hành tươi (*Allium cepa* L.), có nhiều đặc tính dược lý và sinh học như chống oxy hóa, chống viêm và ung thư. Tuy nhiên khả năng ngăn ngừa và chống viêm của chiết xuất hành đen đối với bệnh viêm khớp vẫn chưa được báo cáo. Do đó, chúng tôi đã đánh giá chiết xuất nước hành đen (AeBA) với liều lượng (200, 300, 400 mg/kg thể trọng), thuốc tham chiếu Mobic (7,5 mg/50kg thể trọng) sử dụng mô hình chuột bị viêm khớp do FCA (0,1 ml/con chuột). Trọng lượng cơ thể, nhiệt độ bàn chân sau, chỉ số khớp, trọng lượng cơ quan, thông số huyết học, sinh hóa, mô bệnh khớp mắt cá chân được sử dụng làm tiêu chí để đánh giá tác động của AeBA đối với tình trạng viêm khớp. Kết quả, AeBA (400 mg/kg thể trọng) thể hiện hoạt tính ngăn ngừa và chống viêm thông qua việc cải thiện các chỉ tiêu khảo sát. Những kết quả này chứng minh rằng AeBA có tác dụng chống viêm. AeBA là ứng cử viên tiềm năng cho liệu pháp điều trị viêm khớp.

Từ khóa: Viêm khớp dạng thấp, chiết xuất hành đen, tá dược Freund's

PREVENTION AND ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF CRUDE AQUEOUS EXTRACTS OF BLACK ONION ON FCA-INDUCED RHEUMATOID ARTHRITIS IN MICE

Abstract. Rheumatoid arthritis is a chronic disease that mainly affects flexible (synovial) joints. Black shallot, a new processing product from fresh shallot (*Allium cepa* L.), possesses many pharmacological and biological properties, such as antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities. However, prevention and anti-inflammatory potential of black shallot extracts has not yet been reported on arthritis. Thus, we evaluated the effect of aqueous extract of black shallot (AeBA) on FCA (0.1ml/mouse) induced arthritis mice models with a range of doses (200, 300 and 400 mg/kg body weight) in comparison with Mobic (7.5 mg/50 kg body weight) as the reference. Body weight, temperature of the hind feet, arthritic index, relative organ weights, haematological and biochemical parameters, and histological features of ankle joints were used for assessing the effect of AeBA on joint inflammation. The dose of 400 mg AeBA /kg body weight resulted in an improvement of all the testing parameters, demonstrating the prevention and anti-inflammatory potential of the extract. These results indicate that AeBA might be a potential candidate for therapeutic rheumatoid arthritis treatment.

Key words: Rheumatoid arthritis, black shallot extract, Freund Complete's Adjuvant

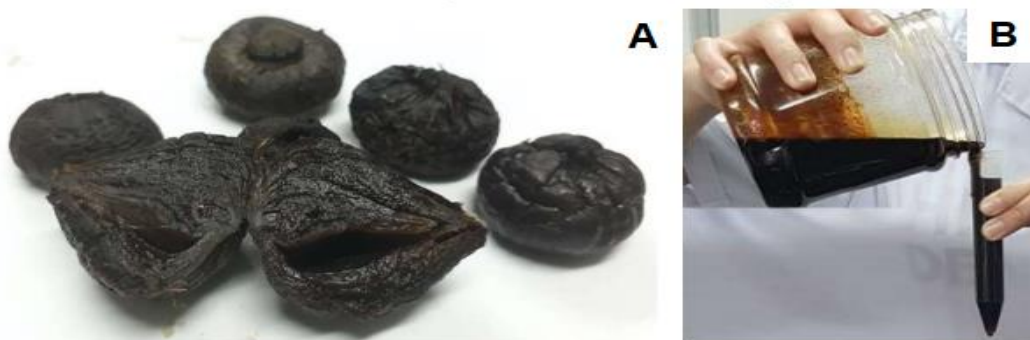
1. GIỚI THIỆU

Viêm khớp dạng thấp (RA) là một bệnh tự miễn dịch toàn thân. Viêm khớp thường bắt đầu ở khớp nhỏ lan rộng đến các khớp lớn hơn. Khi bao hoạt dịch bị viêm, chất hoạt dịch tăng sản, sụn khớp bị tổn thương sẽ làm cho khớp bị viêm và biến dạng [1]. Theo nghiên cứu dịch tễ học của Abdel-Nasser và cộng sự (1997) tỷ lệ người mắc RA trên toàn thế giới chiếm khoảng 1% dân số [2]. Nguyên nhân từ vong là do viêm khớp dẫn đến nhiễm trùng, suy thận và tim mạch [3]. Gần đây, việc áp dụng các biện pháp chữa bệnh dân gian trong y học phương Đông truyền thống, sử dụng các thảo dược tự nhiên cũng được công nhận là biện pháp hỗ trợ phòng ngừa và điều trị viêm khớp dạng thấp hữu hiệu. Chiết xuất etanol lá *Elaeocarpus sphaericus*

trong thành phần có chứa các hợp chất như saponin, terpenoit, steroid, flavonoit, tannin, ancaloit,... có khả năng ức chế phù chân, kháng viêm trên chuột bị RA [4]. Sự hiện diện của các hợp chất flavonoit, ancaloit, steroid, terpenoit, saponin, phenol, cacbonhydrat.... trong chiết xuất lá *Justicia gendarussa* giải thích đặc tính chống viêm khớp của cây này [5]. Lá trà xanh (*Camellia sinensis*) chứa steroid, terpenoit, carotenoit, flavonoit, ancaloit, tannin, glycosit,... có tác dụng trong kháng viêm hỗ trợ điều trị RA trong mô hình in vivo [6]. Hành (*Allium cepa* L.) là một loại rau gia vị, là nguồn cung cấp cacbonhydrat, vitamin A, B, C quan trọng, đồng thời có tác dụng kháng sinh, hạ đường huyết, chống ung thư, chống oxy hóa, bảo vệ thận và gan ... [7]. Sản phẩm hành đen có nguồn gốc từ hành tươi, được ủ lên men trong phòng ủ đã kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm. Thành phần hóa học của chiết xuất hành đen chứa các hợp chất flavonoit, organosulfur, axit amin [8], quercetin 3,4'-diglucoside, isorhamnetin 3,4'-diglucoside, quercetin 3-glucoside, quercetin 4'-glucoside, isorhamnetide, quercetin aglycone, isorhamnetin [9]. Chiết xuất etanol từ cây hành có khả năng chống lại vi khuẩn ở pH 4-8 [10]. Các hợp chất quercetin trong hành có hoạt tính chống dị ứng, kháng viêm, ... [11], chống ung thư cổ tử cung ở người (Hela) và dòng tế bào ung thư tế bào gan (HepG2) [9]. Gần đây, nhiều chiết xuất từ cây thuốc dân gian đã được nghiên cứu và chứng minh hiệu quả trong kháng viêm và điều trị bệnh viêm nhiễm. Tuy nhiên, tác dụng ngăn ngừa và chống viêm của chiết xuất hành đen chưa được đề cập đến. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết lập một mô hình viêm khớp dạng thấp trên chuột Swiss albino do FCA gây ra và nghiên cứu tác dụng của chiết xuất hành đen trong phòng và điều trị RA.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu thực vật



Hình 1. Hành đen và AeBA

A. Hành đen là sản phẩm lên men của hành tươi. B. Chiết xuất nước hành đen (AeBA)

Theo phân loại của Salunkhe (1986) và Pureglove (1972), hành thuộc giống *Allium*, họ Alliaceae [12, 13]. Hành tím (*Allium cepa* L.) được thu nhận từ thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Hành tím Vĩnh châu gồm 2 loại là "tùa coóng" và "sài coóng". Giống "tùa coóng" có 2 - 3 củ trong một gốc, củ hành có màu tím đậm, chắc, to và bóng mượt. Giống "sài coóng" có từ 4 củ trở lên trong một gốc [14]. Chuẩn bị chiết xuất hành đen (AeBA): Hành được rửa sạch bằng nước và bóc vỏ trấu bên ngoài để loại bỏ bụi và các bộ phận bị hư hỏng. Hành tươi được lên men trong buồng kín (Shellab, Hoa Kỳ) theo Tran và cộng sự [15]. Hành đen được thái lát và ngâm với 5 thể tích dung dịch nước 98% trong 1 tuần và lặp lại 2 lần để đạt năng suất tối đa. Dịch chiết thu được lọc qua giấy lọc Whatman. Dịch lọc cuối cùng được ngưng tụ ở áp suất giảm (130 mmBar) ở 60°C để thu được chiết xuất AeBA. Sau đó chiết xuất hành đen (AeBA) được bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng tiếp [9] (Hình 1).

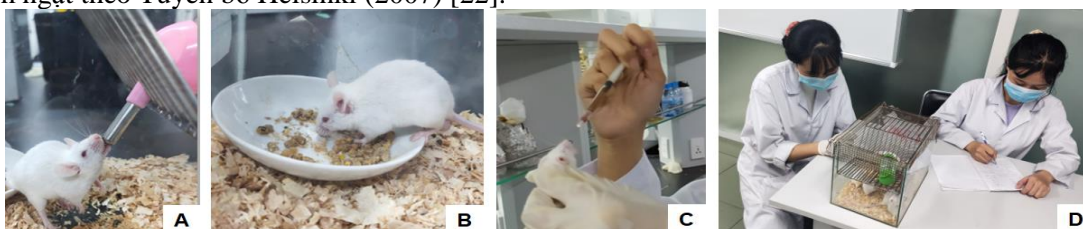
2.2. Sàng lọc hóa thực vật AeBA

Xét nghiệm ancaloit: chuẩn bị 2-3 ml AeBA, hai giọt thuốc thử Mayer (dung dịch kali thủy ngân iotua) được thêm dọc theo thành ống nghiệm. Xuất hiện kết tủa trắng kem chứng tỏ sự có mặt của ancaloit (thử nghiệm Mayer). Xét nghiệm terpenoit: AeBA xử lý bằng clorofom, lọc và thêm vào một vài giọt H₂SO₄. Lắc và để yên, xuất hiện màu vàng vàng hoặc màu nâu đỏ cho thấy sự hiện diện của tritecpen (thử nghiệm Salkowski). Xét nghiệm saponin: 50 mg AeBA pha loãng với nước cất và tạo thành 20 mL. Lắc trong ống đong chia độ trong 15 phút. Saponin được phát hiện bằng cách hình thành lớp bọt dài 2 cm (thử nghiệm Foam) [16]. Xét nghiệm tannin: 50 mg AeBA hòa tan trong 5 ml nước cất. Thêm vài giọt dung dịch clorua

sắt trung tính 5%. Màu xanh đậm cho thấy sự phát hiện của hợp chất phenolic (thử nghiệm Ferric clorua) [18]. Xét nghiệm phenol: 50 mg AeBA S được hòa tan trong nước cất. Sau đó, 3 mL dung dịch chì axetat 10% được thêm vào. Kết tủa trắng xuất hiện chứng tỏ có hợp chất phenol (thử nghiệm Lead axetat) [19]. Xét nghiệm phytosteron: AeBA được bổ sung thêm cloroform. Sau khi lọc, xử lý với một vài giọt anhydrit axetic, đun sôi và để nguội. Sau đó, vài giọt H₂SO₄ được thêm vào. Hình thành vòng màu nâu có hiện diện phytosteron (thử nghiệm Libermann-Burchard) [17]. Xét nghiệm flavonoid: 1 ml AeBA hòa tan trong 5 ml etanol (95% w/v), thêm vài giọt HCl đậm đặc và 0,5 g kim loại magie. Xuất hiện màu hồng, đỏ thẫm hoặc tươi trong 1-2 phút, cho thấy sự hiện diện flavonoid (thử nghiệm Shinoda). Xét nghiệm cacbonhydrat: Thêm 2 giọt dung dịch cồn *α*naphthol vào 2 ml AeBA. Lắc đều hỗn hợp và thêm từ từ vài giọt H₂SO₄ đặc dọc thành ống nghiệm. Sự xuất hiện vòng màu tím ở đường giao nhau đã phát hiện ra cacbonhydrat (thử nghiệm Molish). Xét nghiệm protein: Thêm vào 3 ml AeBA vài giọt dung dịch 4% NaOH và CuSO₄ 1%. Xuất hiện màu tím hoặc hồng cho thấy hiện diện protein (thử nghiệm Biuret) [20]. Phân tích hàm lượng tổng phenol (TPC): Xác định theo phương pháp Folin Ciocalteu (FC). Cho 0.1 ml AeBA phản ứng với 1.8 ml FC 10%, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, thêm 1.200 ml Natri cacbonat (15%, w/v). Hỗn hợp để yên trong bóng tối 90 phút, đo độ hấp thụ ở bước sóng 765 nm. Xây dựng đường chuẩn bằng acid galic và TPC được tính theo mg GAE/g CK (GAE: galic acid equivalent, CK: chất khô) [21]. Phân tích hàm lượng tổng flavonoid (TFC): 100 g AeBA hòa tan với 0.4 ml nước cất ở 25°C, thêm NaNO₂ (0.03 ml, 5%), sau 5 phút thêm AlCl₃.6H₂O (0.03 ml, 10%). Sau khi ủ trong 6 phút, dung dịch NaOH (0.2 ml, 1 M) được thêm vào hỗn hợp. Tiếp tục pha loãng thành 1 ml bằng nước. TFC được ước tính từ độ hấp thụ của hỗn hợp ở bước sóng 510 nm, sử dụng epicatechin làm tiêu chuẩn. Giá trị TFC được biểu thị bằng mg epicatechin tương đương (ECE)/g AeBA [21].

2.3. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng Swiss albino (22 - 25 g) được thu nhận từ Viện Pasteur Tp. HCM. Chuột được nuôi trong lồng kính (30 x 60 cm), lót bằng vỏ dăm bào. Nhà nuôi chuột được duy trì điều kiện chiếu sáng với chu kỳ sáng/tối 12h/12h, ở nhiệt độ khoảng 29 ± 2°C, độ ẩm tương đối 50 ± 5%. Chuột được cung cấp chế độ ăn uống trong phòng thí nghiệm tiêu chuẩn. Chuột thí nghiệm được phân chia ngẫu nhiên cho các nhóm khác nhau và được nuôi trong 1 tuần để thích ứng với điều kiện sống (Hình 2). Quy trình thử nghiệm tuân thủ nghiêm ngặt theo Tuyên bố Helsinki (2007) [22].



Hình 2. Một số hình ảnh trong tiến trình thí nghiệm.

A, B. Theo dõi lượng thức ăn và nước uống hàng ngày của chuột;

C. Cho chuột uống AeBA; D. Quan sát và theo dõi các hành vi của động vật thí nghiệm

2.4. Thuốc và hóa chất

Tá dược của Freund's (FCA) chứa *Mycobacterium tuberculosis* chết nhiệt trong parafin lỏng ở nồng độ 10 mg/ml, được nhũ hóa trong dầu khoáng. FCA được cung cấp bởi Sigma Santa Clara, CA (D2354, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ). Mobic hay còn gọi là Meloxicam [4-hydroxy-2-metyl-N-(5-metyl-2-tiazolyl)-2H-1, 2-benzothiazin-3-cacboxamit-1,1-dioxit], là loại thuốc chống viêm không steroid, có tác dụng giảm đau và chống viêm xương khớp. Mobic được sử dụng trong kiểm soát dương tính (thuốc đối chứng) trong nghiên cứu này. Mobic được cung cấp bởi Boehringer Ingelheim Espana S.A. Thuốc thử Folin-Ciocalteu được mua từ Merck (Đức). Một thuốc thử trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic, độ tinh khiết 97%) đã được mua từ Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ).

2.5. Thử độc cấp tính và độc bán mãn tính AeBA

24 chuột Swiss albino được sử dụng để thử nghiệm độc tính cấp tính. Trước khi nghiên cứu độc tính cấp, những con chuột được cân trọng lượng và nhịn ăn qua đêm. Chuột được phân chia vào 2 nhóm thử nghiệm: Nhóm A (nhóm chứng) chuột uống nước bình thường; Nhóm B chuột uống AeBA (một liều duy nhất) nồng độ 1000, 3000 và 5000 mg/kg thể trọng. Động vật thử nghiệm được quan sát trong 24 giờ [23]. Độc tính

bán mãn tính của AeBA được thực hiện với 24 con chuột phân chia vào 2 nhóm thử nghiệm: nhóm C (nhóm chứng) chuột được uống nước bình thường, nhóm D chuột được uống AeBA mỗi ngày một lần với liều lượng 100, 300, 500 mg/kg thể trọng. Động vật thử nghiệm được uống AeBA và quan sát trong 28 ngày [23].

2.6. Thiết kế thí nghiệm cảm ứng thực nghiệm viêm khớp

Sử dụng AeBA (100 mg/kg thể trọng) cho chuột uống trong 4 tuần nhằm tăng sức đề kháng, tăng sức chịu đựng và khả năng phòng ngừa bệnh. Tiếp theo, chuột sau thời gian uống AeBA phòng ngừa bệnh được chia vào các nhóm (thuộc các giai đoạn khác nhau). Giai đoạn gây bệnh: Nhóm uống nước (nhóm chứng): chuột ăn, uống bình thường. Nhóm RA: được tiêm 0.1 ml FCA/con chuột [24] gây bệnh RA, khảo sát trong 2 tuần. Giai đoạn chữa bệnh: chuột nhóm RA chia 5 nhóm, khảo sát trong 12 tuần. Nhóm RA (chứng âm): chuột RA được uống nước bình thường. Nhóm RA+Mobic (chứng dương): chuột RA được uống 0.15 mg/kg thể trọng thuốc Mobic. Nhóm RA+BSL: chuột RA được uống 200 mg/kg thể trọng AeBA. Nhóm RA+BSM: chuột RA được uống 300 mg/kg thể trọng AeBA. Nhóm RA+BSH: chuột RA được uống 400 mg/kg thể trọng AeBA.

2.7. Đánh giá các thông số thực nghiệm viêm khớp

Khối lượng cơ thể: Khối lượng cơ thể của mỗi con chuột được theo dõi cẩn thận trước khi bắt đầu nghiên cứu, mỗi tuần một lần trong suốt quá trình nghiên cứu cho đến ngày phẫu thuật [24]. Khối lượng cơ thể [M(g)] của chuột được đo bằng cân điện tử (Marte – AD 2000, tải trọng tối đa 210 g; độ nhạy 0,01 g) [25]. Phần trăm thay đổi khối lượng cơ thể được tính theo công thức: $[W(\%) = \text{Khối lượng cơ thể vào cuối mỗi tuần} - \text{khối lượng cơ thể ban đầu} / \text{Khối lượng cơ thể ban đầu}] \times 100$ [26].

Chỉ số viêm khớp: Chỉ số viêm khớp được đánh giá theo phương pháp tiêu chuẩn, điểm viêm khớp được thực hiện theo mô tả của Endale và cộng sự [27]. Chỉ số viêm khớp được ghi từ 0 đến 4 điểm: đánh giá lâm sàng như sau: 0 = không triệu chứng, 2 = ban đỏ, 4 = sưng nhẹ và ban đỏ, 6 = sưng nhẹ, ban đỏ từ mắt đến mắt cá chân, 8 = sưng vừa, ban đỏ từ khớp đến mắt cá chân, 10 = sưng nặng và ban đỏ từ bàn chân đến mắt cá chân [28].

Nhiệt độ bàn chân sau: Phương pháp đo nhiệt độ bằng nhiệt kế hồng ngoại đã được thực hiện để theo dõi mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý về mặt lâm sàng, vì nhiệt độ bàn chân có thể tương quan với mức độ sưng tấy. Nhiệt độ da bàn chân sau được đo bằng nhiệt kế hồng ngoại đa chức năng Infrared Thermometer it-903. Chuột được giữ thoải mái trên tay, đưa nhiệt kế về chỉ số 0.00, đặt mắt đo hồng ngoại của nhiệt kế ở phía trước bàn chân sau cách da bàn chân 1 mm, nhấn nút đo nhiệt độ, sau 3 giây nhiệt độ bàn chân sẽ hiển thị. Thông số này được đo hằng ngày từ ngay trước khi tiêm thuốc gây viêm khớp và trong suốt quá trình điều trị [29].

Phân tích huyết học và sinh hóa máu: Vào thời điểm cuối của quá trình thí nghiệm, chuột được gây mê và được thu nhận máu từ tĩnh mạch đuôi. Máu được đựng trong ống tráng K₂EDTA, được bảo quản lạnh ở 4°C. Mẫu được gửi đến khoa huyết học và sinh hóa, bệnh viện Quân y 175 Tp. HCM để phân tích và đọc kết quả [30].

Khối lượng cơ quan tương đối: Vào thời điểm cuối của quá trình thí nghiệm, chuột được phẫu thuật. Lá lách và tuyến ức được lấy ra và cân để tính khối lượng nội tạng tương đối [31]. Khối lượng tương đối của cơ quan nội tạng được tính theo công thức: $\text{Khối lượng cơ quan nội tạng tương đối (\%)} = [\text{khối lượng nội tạng tuyệt đối (g)} / \text{khối lượng cơ thể vào ngày phẫu thuật (g)}] \times 100$ [32].

Đánh giá mô học: Thu nhận mô khớp chuột vào thời điểm cuối của quá trình thí nghiệm. Mô khớp của chuột được cố định trong formalin 10%. Mẫu được gửi đến khoa giải phẫu bệnh, bệnh viện Quân y 175 Tp. HCM để nhuộm mẫu mô và đọc kết quả [33].

2.8. Phân tích thống kê

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

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. Sàng lọc hóa thực vật

Quá trình sàng lọc hóa thực vật sơ bộ của chiết xuất cho thấy sự hiện diện của các ancaloit, flavonoid, saponin, terpenoid, phenol, tannin, glycosit, protein và cacbonhydrat; phytosteron không hiện diện trong AeBA (Bảng 1). Hơn nữa, sự hiện diện của một số hợp chất hoạt tính sinh học như quecertin 3-glycosit,

isorhamnetin,... đã được báo cáo trong nghiên cứu trước của Tran và cộng sự, 2020 [9]. Hàm lượng TPC và TFC được xác nhận bởi phân tích HPLC (bảng 1).

Bảng 1 . Sàng lược hóa thực vật và hàm lượng TPC, TFC trong AeBA

Các hợp chất	AeBA	Các hợp chất	AeBA	Hàm lượng (TPC, TFC)
Phenol	+	Tannin	+	TPC = 42,23 ± 5,11 mg GAE/g
Flavonoit	+	Glycosit	+	
Saponin	+	Cacbonhydrat	+	TFC = 37,55 ± 3,77 mg ECE/g
Ancaloit	+	Protein	+	
Terpenoit	+	Phytosteron	-	

(+) Hiện diện trong AeBA, (-) Không hiện diện trong AeBA

3.2. Thử độc cấp tính và bán mãn tính AeBA

AeBA đã được thử nghiệm độc tính cấp tính ở chuột Swiss albino và được theo dõi trong 24 giờ. AeBA không gây tác dụng phụ và tử vong ở mức liều 1000, 3000 và 5000 mg/kg thể trọng. Thử nghiệm độc tính bán mãn tính ở chuột Swiss albino với liều 100, 300 và 500 mg/kg thể trọng trong 28 ngày. Kết quả, AeBA không gây ra tử vong hoặc tác dụng phụ, không làm thay đổi trọng lượng cơ thể, hành vi chung (Hình 3), trọng lượng cơ quan, các thông số huyết học và sinh hóa. Kiểm tra hình thái các cơ quan (gan, thận, tim, tuyến ức, lá lách) cho thấy cấu trúc bình thường, không có biến đổi.



Hình 3. Phản ứng và hành vi của chuột trong thử nghiệm độc tính AeBA

A. Đối chứng; B. Thử nghiệm độc tính cấp tính AeBA; C. Thử nghiệm độc tính bán mãn tính AeBA

3.3. Khối lượng cơ thể, khối lượng cơ quan, nhiệt độ bàn chân sau và chỉ số viêm khớp

FCA là một dung dịch kháng nguyên có chứa *M. tuberculosis* đã giảm độc lực. Nó huy động hệ thống miễn dịch bằng cách kích thích các chất trung gian tế bào và tăng cường sản xuất các globulin miễn dịch [34] dẫn đến tình trạng viêm cục bộ của khớp và phá hủy sụn. Bảng 2, chuột được điều trị bằng FCA có trọng lượng giảm dần trong thời gian điều trị ($30,24 \pm 0,47g$) so với nhóm chứng ($35,84 \pm 0,54g$) ($P < 0,05$). Kết quả này phù hợp với báo cáo trước đây của Roubenoff và cộng sự (1997) [35]. Các tài liệu đã ghi nhận rõ ràng rằng sự sụt cân và suy mòn là những đặc điểm thường gặp ở bệnh RA và những nguyên nhân này được cho là do giảm hấp thu glucose và leucine trong ruột và tăng sản xuất cytokine làm tăng tỷ lệ trao đổi chất khi nghỉ ngơi và phân hủy protein [36]. Do không đáp ứng được đầy đủ nhu cầu dinh dưỡng, đặc biệt là nhu cầu về calo và protein tăng lên trong giai đoạn phát triển RA, vì vậy xảy ra hiện tượng sụt cân [37]. Chiết xuất từ hành đen được phát hiện có hiệu quả trong việc ức chế viêm nhiễm. Trong số tất cả các liều AeBA được sử dụng, ở liều uống 400 mg/kg thể trọng cho khả năng kiểm soát tích cực nhất (khối lượng chuột tăng lên $35,39 \pm 0,42g$) gần tương đương sử dụng thuốc Mobic ($35,58 \pm 0,37g$) (thuốc tham chiếu) ($p < 0,05$). Kết quả này gợi ý mạnh mẽ về tác dụng chống viêm của AeBA. Nó đã chỉ ra rằng hợp chất phenol, terpenoit, tannin... có trong thành phần của chiết xuất tạo ra tác dụng chống viêm rõ rệt.

Sự phát triển của viêm khớp do FCA gây ra ở chuột có thể được đặc trưng bởi sự sưng tấy rõ rệt ở bàn chân sau khi viêm khớp mãn tính khởi phát [38]. Trong phản ứng viêm, các prostaglandin sinh ra gây sưng tấy ở bàn chân sau do các tự kháng thể được tạo ra [39, 40]. Nhiệt độ trung bình của bàn chân sau tăng lên khi mức độ viêm ngày càng tăng. Có mối tương quan thuận giữa nhiệt độ bàn chân và điểm số khớp [41]. Nhiệt độ trung bình của bàn chân sau ở nhóm chứng là $27,6 \pm 0,21^\circ C$ và không thay đổi. Sau khi khởi phát viêm (do FCA) nhiệt độ của bàn chân sau tăng lên $29,5 \pm 0,16^\circ C$ [29]. Xử lý bằng AeBA nhiệt độ bàn chân đã giảm 1-2 $^\circ C$ (Bảng 2). Sự giảm nhiệt độ ở nhóm (RA+BSh) ($27,9 \pm 0,19^\circ C$) gần tương đương nhóm (RA+Mobic) ($27,8 \pm 0,17^\circ C$) (thuốc tham chiếu) ($p < 0,001$),

Bảng 2. Ảnh hưởng của AeBA đến khối lượng cơ thể, chỉ số viêm khớp, nhiệt độ bàn chân sau.

Nhóm thí nghiệm	Khối lượng cơ thể		Nhiệt độ bàn chân sau (°C)	Chỉ số viêm khớp (điểm)
	M (g)	W (%)		
Nhóm đối chứng	35,84 ^a ± 0,54	54,95 ± 0,15 ^f	27,6 ^a ± 0,21	0,00 ^a ± 0,00
Nhóm RA	30,24 ^b ± 0,47	30,74 ± 0,19 ^a	29,5 ^b ± 0,16	5,51 ^b ± 0,05
Nhóm RA + BSL	33,52 ^c ± 0,61	44,92 ± 0,27 ^b	28,2 ^c ± 0,21	3,68 ^c ± 0,07
Nhóm RA + BSM	34,33 ^{cd} ± 0,37	48,42 ± 0,22 ^c	28,1 ^c ± 0,18	3,32 ^{cd} ± 0,06
Nhóm RA + BSH	35,39 ^a ± 0,42	53,01 ± 0,13 ^d	27,9 ^a ± 0,19	3,01 ^e ± 0,03
Nhóm RA + Mobic	35,58 ^a ± 0,37	53,83 ± 0,24 ^e	27,8 ^a ± 0,17	2,98 ^e ± 0,04

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái trên (a, b, c, d, e, f) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$)

Mức độ nghiêm trọng của viêm khớp được biểu thị bằng điểm số khớp, là chỉ số biểu hiện tình trạng viêm của khớp [42]. Bảng 2, điểm số khớp ở chuột RA đã tăng lên đáng kể ($5,51 \pm 0,05$) so với nhóm đối chứng ($0,00 \pm 0,00$). Có sự giảm đáng kể các điểm số khớp ($p < 0,01$) ở chuột đã được điều trị bởi AeBA với các nồng độ (200, 300 và 400 mg/kg) ($3,68 \pm 0,07$, $3,32 \pm 0,06$ và $3,01 \pm 0,03$), cũng như thuốc tham chiếu Mobic ($2,98 \pm 0,04$) so với các động vật khớp FCA ($5,51 \pm 0,05$). Điều trị bằng đường uống với AeBA ngăn chặn đáng kể sự gia tăng điểm số viêm khớp ở bàn chân sau cho thấy hiệu quả nhất định của AeBA để chống lại những thay đổi hình thái của RA. Những dữ liệu này chỉ ra rằng AeBA có tác dụng chống viêm khớp, ngăn chặn sự gia tăng điểm số viêm của khớp cổ chân, điều này cho thấy một hoạt động bảo vệ màng và sụn khớp của AeBA.

Bảng 3. Ảnh hưởng của AeBA đến khối lượng tuyến ức, lá lách

Nhóm thí nghiệm	Khối lượng cơ quan tuyệt đối (g)		Khối lượng cơ quan tương đối (%)	
	Tuyến ức	Lá lách	Tuyến ức	Lá lách
Nhóm đối chứng	4,31 ^a ± 0,11	10,39 ^a ± 0,41	0,12 ^a ± 0,02	0,29 ^a ± 0,04
Nhóm RA	3,02 ^b ± 0,05	19,35 ^b ± 0,27	0,09 ^b ± 0,01	0,64 ^b ± 0,07
Nhóm RA + BSL	3,68 ^c ± 0,07	11,06 ^c ± 0,26	0,11 ^c ± 0,03	0,33 ^c ± 0,06
Nhóm RA + BSM	3,82 ^{cd} ± 0,06	11,33 ^c ± 0,34	0,11 ^c ± 0,02	0,33 ^c ± 0,04
Nhóm RA + BSH	4,25 ^e ± 0,12	10,66 ^d ± 0,26	0,12 ^d ± 0,01	0,31 ^d ± 0,06
Nhóm RA + Mobic	4,27 ^e ± 0,14	10,32 ^a ± 0,31	0,12 ^d ± 0,02	0,29 ^a ± 0,03

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái trên (a, b, c, d, e) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$)

Tuyến ức và lá lách là những cơ quan quan trọng đóng vai trò là nguồn tế bào và hình thành kháng thể sẵn có, có liên quan đến đáp ứng miễn dịch trong viêm khớp hỗ trợ [43]. Khối lượng tuyệt đối và tương đối của lá lách của chuột bị viêm khớp ($19,35 \pm 0,27$ g và $0,64 \pm 0,07$ %) tăng lên so với nhóm đối chứng ($10,39 \pm 0,41$ g và $0,29 \pm 0,04$ %) ($p < 0,05$) đã được quan sát thấy [44, 45]. Trong khi đó khối lượng tuyệt đối và tương đối của tuyến ức của chuột được điều trị bằng FCA ($3,02 \pm 0,15$ g và $0,1 \pm 0,01$ %) giảm so với nhóm đối chứng ($4,31 \pm 0,11$ g và $0,12 \pm 0,02$ %) ($p < 0,05$) [46]. Sự gia tăng khối lượng tuyệt đối và tương đối lá lách bị ức chế đáng kể ($p < 0,01$) ở chuột được điều trị bằng AeBA với nồng độ 400 mg/kg ($10,66 \pm 0,26$ g và $0,31 \pm 0,06$ %) so với chuột được điều trị bằng FCA ($19,35 \pm 0,27$ g và $0,64 \pm 0,07$ %). Tuy nhiên, điều trị bằng AeBA nồng độ 400 mg/kg ($4,25 \pm 0,12$ g và $0,12 \pm 0,01$ %) và Mobic ($4,27 \pm 0,14$ g và $0,12 \pm 0,02$ %) đã làm tăng khối lượng tuyệt đối và tương đối tuyến ức so với chuột RA ($3,02 \pm 0,15$ g và $0,09 \pm 0,01$ %) ($p < 0,01$ và $p < 0,05$). AeBA đã làm giảm khối lượng của lá lách và tăng khối lượng của tuyến ức do tác dụng kích thích miễn dịch.

3.4. Huyết học và sinh hóa máu

Tác dụng của FCA đối với động vật nghiên cứu thường cho thấy sự suy giảm rõ rệt trạng thái RBC ($7,24 \pm 0,12 \times 10^6$ tb/mm³) và HGB ($9,76 \pm 0,08$ g/dL) (Bảng 3), biểu thị tình trạng thiếu máu, khởi phát do giảm erythropoietin, phá hủy hồng cầu, suy giảm chức năng tủy xương và giảm hàm lượng sắt trong huyết tương. Nguyên nhân là do các cytokine gây viêm. Bên cạnh đó, sự gia tăng số lượng WBC ($9,52 \pm 0,013 \times 10^3$ tb/mm³) ở động vật viêm khớp do FCA biểu thị sự kích hoạt của hệ thống miễn dịch chống lại các mầm bệnh xâm nhập [47]. Giá trị bạch cầu lympho, mono và bạch cầu hạt ở nhóm bệnh viêm khớp cũng

tăng mạnh. Sử dụng chiết xuất AeBA đã giúp ổn định các thông số huyết học về mức bình thường. Mức RBC ($8,02 \pm 0,09$ và $8,05 \pm 0,11 \times 10^6/\text{mm}^3$) và hemoglobin ($11,23 \pm 0,13$ và $11,39 \pm 0,12$ g/dl) cao hơn đáng kể ($p < 0,01$) ở động vật được điều trị bằng AeBA và Mobic. WBC, bạch cầu lympho, mono và bạch cầu hạt của chuột thí nghiệm đã giảm đáng kể. Tác dụng bảo vệ này là do ức chế bạch cầu đối với vùng bị viêm, ổn định hệ thống nội mô lưới và ức chế giải phóng các cytokine gây viêm và TNF [48].

Bảng 4. Các thông số huyết học của chuột thí nghiệm

Nhóm thí nghiệm	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dL)	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Lymphocyt es (%)	Monocytes (%)	Granulocytes (%)
Nhóm đối chứng	$8,12^a \pm 0,11$	$11,29^a \pm 0,14$	$2,99^a \pm 0,012$	$4,01^a \pm 0,03$	$0,054^b \pm 0,003$	$0,113^a \pm 0,002$
Nhóm RA	$7,24^b \pm 0,12$	$9,76^b \pm 0,018$	$9,52^b \pm 0,013$	$5,58^b \pm 0,02$	$0,088^c \pm 0,005$	$0,141^b \pm 0,001$
Nhóm RA+BSL	$8,08^a \pm 0,13$	$12,47^c \pm 0,16$	$4,21^c \pm 0,014$	$4,45^c \pm 0,04$	$0,065^c \pm 0,004$	$0,126^c \pm 0,002$
Nhóm RA+BSM	$7,89^c \pm 0,07$	$12,22^c \pm 0,11$	$4,15^c \pm 0,013$	$4,41^c \pm 0,05$	$0,061^c \pm 0,003$	$0,123^c \pm 0,004$
Nhóm RA+BSh	$8,02^a \pm 0,09$	$11,23^a \pm 0,13$	$3,06^a \pm 0,015$	$4,11^c \pm 0,06$	$0,051^a \pm 0,001$	$0,115^a \pm 0,001$
Nhóm RA+Mobic	$8,05^a \pm 0,11$	$11,39^a \pm 0,12$	$3,04^a \pm 0,014$	$4,08^c \pm 0,05$	$0,052^a \pm 0,003$	$0,114^a \pm 0,003$

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean \pm SD. Các chữ cái trên (a, b, c) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$)

Bảng 5. Các thông số sinh hóa của chuột thí nghiệm

Nhóm	CRP (mg/l^{-1})	RF (mg/l^{-1})	ESR (mm/hr)	ALT (U/l)	AST (U/l)
Nhóm đối chứng	$0,12^a \pm 0,02$	$0,19^a \pm 0,03$	$0,09^a \pm 0,02$	$51,31^a \pm 5,2$	$148,4^a \pm 17,4$
Nhóm RA	$8,17^b \pm 0,03$	$9,27^b \pm 0,02$	$7,32^b \pm 0,01$	$69,54^b \pm 4,6$	$205,6^b \pm 16,3$
Nhóm RA + BSL	$3,08^c \pm 0,01$	$3,09^c \pm 0,03$	$3,01^c \pm 0,03$	$56,09^c \pm 6,2$	$161,2^c \pm 21,3$
Nhóm RA + BSM	$3,07^c \pm 0,03$	$2,99^c \pm 0,04$	$2,88^c \pm 0,04$	$54,37^d \pm 5,4$	$159,8^{\text{cd}} \pm 17,2$
Nhóm RA + BSh	$1,93^d \pm 0,02$	$2,31^d \pm 0,01$	$2,26^d \pm 0,02$	$53,46^{\text{de}} \pm 4,7$	$148,2^d \pm 24,1$
Nhóm RA + Mobic	$1,88^d \pm 0,02$	$2,24^d \pm 0,02$	$2,19^d \pm 0,01$	$53,38^e \pm 5,1$	$147,8^d \pm 18,9$

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean \pm SD. Các chữ cái trên (a, b, c, d, e) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$)

Việc sử dụng FCA đã gây ra sự gia tăng đáng kể các thông số sinh hóa trong huyết thanh (Bảng 4), CRP ($8,17 \pm 0,03 \text{ mg/l}^{-1}$), RF ($9,27 \pm 0,02 \text{ mg/l}^{-1}$), ESR ($7,32 \pm 0,01 \text{ mm/hr}$), AST ($69,54 \pm 4,6 \text{ U/l}$) và ALT ($205,6 \pm 6,3 \text{ U/l}$). Sự tăng mạnh của các thông số sinh hóa huyết thanh ở chuột bị viêm khớp chỉ ra rõ ràng việc hình thành tổn thương sụn khớp và xương ở chuột viêm khớp do được điều trị bằng FCA, hoàn toàn phù hợp với kết quả các nghiên cứu khác [49-52]. Sự ổn định dần nồng độ các thông số sinh hóa huyết thanh, hàm lượng CRP ($1,93 \pm 0,02 \text{ mg/l}^{-1}$), RF ($2,31 \pm 0,01 \text{ mg/l}^{-1}$), ESR ($2,26 \pm 0,02 \text{ mm/hr}$), AST ($53,46 \pm 4,7 \text{ U/l}$) và ALT ($148,2 \pm 24,1 \text{ U/l}$) giảm dần do điều trị bằng đường uống với AeBA (400 mg/kg) tương đương với hiệu quả của Mobic ($p < 0,05$) đã chứng minh được tác dụng chống phù nề của AeBA ở chuột bị viêm khớp do FCA gây ra. Mức độ enzyme trong huyết thanh giảm ở các nhóm điều trị bằng AeBA nhấn mạnh đến việc giảm ăn mòn xương và vai trò bảo vệ cơ quan của AeBA. Tác dụng bảo vệ tăng cường của AeBA là do tác dụng kết hợp của hợp chất phenol và terpenoit cùng với tannin. Những nghiên cứu trước đây ghi nhận rằng các hợp chất phenol, terpenoit, tannin trong chiết xuất thảo dược có khả năng chống oxy hóa [53], làm giảm các cytokine gây viêm [54] và ngăn chặn quá trình viêm [55].

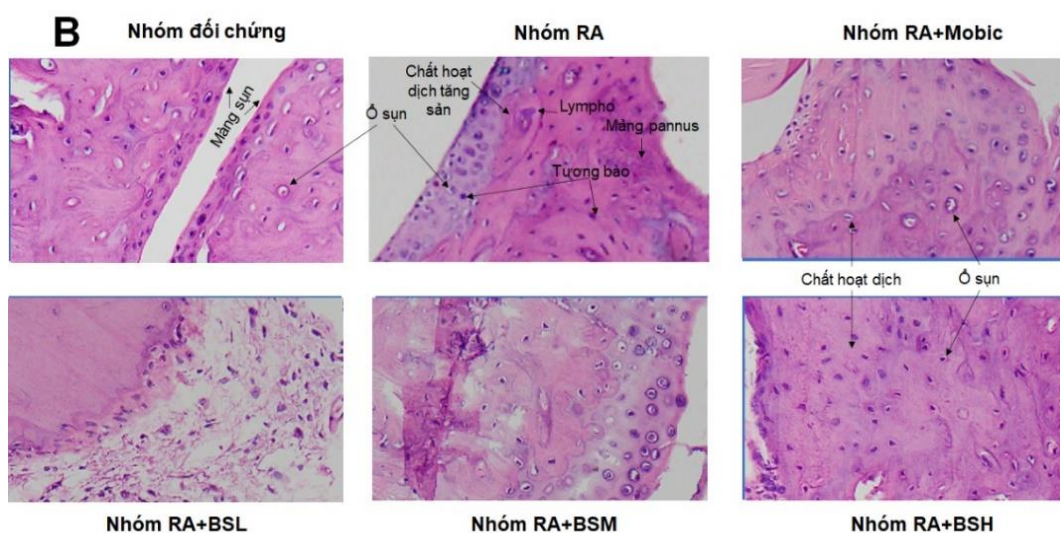
3.5. Hình thái ngoài và mô khớp

Viêm khớp dạng thấp (RA) là một bệnh đa hệ thống mãn tính đặc trưng bởi tình trạng viêm màng hoạt dịch dai dẳng liên quan đến các khớp ngoại vi dẫn đến sự phá hủy dần dần các sụn và xương làm suy giảm chức năng khớp. Phân tích hình thái ngoài của chân sau chuột thí nghiệm cho thấy đã xuất hiện các triệu chứng viêm như sưng nóng, đỏ chân và tổn thương mô ở chuột bị viêm khớp do FCA (hình 4A). RA có đặc điểm nổi bật là tăng sản hoạt dịch, hình thành pannus, phá hủy sụn và xương trong khớp. Vào ngày 7 sau lần điều trị bởi FCA, các khớp bàn chân sau của chuột đã được kiểm tra. Như trong hình 4B ở chuột RA, các khớp có biểu hiện của sự xâm nhập tế bào viêm, tăng sản hoạt dịch, xói mòn và méo mó sụn, thu hẹp không gian khớp. So với chuột đối chứng (sụn khớp còn nguyên vẹn, không bị viêm và không gian khớp bình thường),

điểm thay đổi hình thái của chuột mô hình RA tăng lên đáng kể ($p < 0.001$). Các nhóm được điều trị bằng AeBA (200, 300 và 400 mg/kg) cho thấy giảm rõ rệt tình trạng tăng sản hoạt dịch, phá hủy sụn khớp và thay đổi khoang khớp, sự hiện diện của phù nề ít hơn và không hoại tử. AeBA ức chế sự xâm nhập tế bào viêm. Những con chuột được điều trị bằng AeBA đã được bảo vệ khớp mắt cá chân tốt.



Hình 4A. Hình thái ngoài bàn chân sau của chuột được điều trị bằng FCA và AeBA trong 12 tuần



Hình 4B. Mô học khớp mắt cá chân chuột được điều trị bằng FCA và AeBA trong 12 tuần (HE, $\times 200$).

4. KẾT LUẬN

Sử dụng chiết xuất nước hành đen (trong thành phần chứa các hợp chất như flavonoid, ancaloit, terpenoit, phenol, saponin, tannin ...) với liều uống 200, 300, 400 mg/kg thể trọng đã chứng minh được khả năng ngăn ngừa và chống viêm hiệu quả đối với chuột viêm khớp dạng thấp do FCA gây ra. Sau 12 tuần điều trị với AeBA, điểm số viêm khớp, nhiệt độ bàn chân, lượng WBC, RF, CRP, ESR, khối lượng tương đối lá lách đã giảm xuống, khối lượng cơ thể, lượng RBC, khối lượng tương đối tuyến ức tăng lên. Phân tích mô học cũng cho thấy AeBA có thể ức chế sự xâm nhập của các tế bào viêm, phục hồi màng sụn khớp. AeBA (liều uống 400 mg/kg thể trọng) đạt hiệu quả cao nhất và gần tương đương với hiệu quả của Mobic (thuốc tham chiếu) trong điều trị RA. Chiết xuất nước hành đen là thảo dược mới tiềm năng trong điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin cảm ơn các đồng nghiệp và cộng sự từ Khoa Huyết học và Sinh hóa, Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Quân y 175 Tp. HCM, Viện Pasteur Tp. HCM, Phòng Thí nghiệm Công nghệ Động vật Viện

Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp. HCM đã hỗ trợ chúng tôi trong dự án này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. S. Safiri, et al., "Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990–2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017", *Annals of the rheumatic diseases*, 78(11), 1463 - 1471, 2019. DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-215920.
2. A. M. Abdel-Nasser, J. J. Rasker, H. A. Vaikenburg, "Epidemiological and clinical aspects relating to the variability of rheumatoid arthritis in Seminars in arthritis and rheumatism", *Semin Arthritis Rheum*, 27(2), 123 - 140, 1997. DOI: 10.1016/s0049-0172(97)80012-1.
3. E. Sebbag, et al., "The world-wide burden of musculoskeletal diseases: a systematic analysis of the World Health Organization Burden of Diseases Database", *Annals of the rheumatic diseases*, 78(6), 844 - 848, 2019. DOI:10.1136/annrheumdis-2019-215142.
4. S.Ramasamy, et al., "Effect of *Elaeocarpus sphaericus* in Freund's complete adjuvant induced rheumatoid arthritis in albino rats", *Indo Glob Res J Pharm Sci*, 2, 378 - 382. 2012. ISSN: 2249-4189.
5. J. Paval, et al., "Anti-arthritis potential of the plant *Justicia gendarussa* Burm F", *Clinics*, 64(4), 357 - 362, 2009. DOI: 10.1590/s1807-59322009000400015.
6. S. Riegsecker, et al., "Potential benefits of green tea polyphenol EGCG in the prevention and treatment of vascular inflammation in rheumatoid arthritis", *Life sciences*, 93(8), 307 - 312, 2013. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.07.006.
7. W. Sun, M. H. Shahrajabian, Q. Cheng, "The insight and survey on medicinal properties and nutritive components of shallot", *Journal of Medicinal Plants Research*, 13(18), 452 - 457, 2019. DOI:10.5897/JMPR2019.6836.
8. J. M. Moreno-Rojas, et al., "Development and validation of UHPLC-HRMS methodology for the determination of flavonoids, amino acids and organosulfur compounds in black onion, a novel derived product from fresh shallot onions (*Allium cepa* var. *aggregatum*)", *LWT*, 97, 376 - 383, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.032>.
9. G. B. Tran, et al., "Chemical composition and antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer effects of ethanol extract of black shallot (*Allium ascalonicum*)", *Pharmacophore*, 11(3), 30 - 37, 2020. ISSN-2229-5402.
10. M. Amin, et al., "Characterization of shallot, an antimicrobial extract of *Allium ascalonicum*", *Pak J Med Sci*, 25(6), 948 - 952, 2009. ISSN 1681-715X
11. W. Arpornchayanon, et al., "Antiallergic activities of shallot (*Allium ascalonicum* L.) and its therapeutic effects in allergic rhinitis", *Asian Pac J Allergy Immunol*, 18, 1 - 9, 2019. DOI: 10.12932/AP-300319-0529
12. Salunkhe, D.K. and B.B. Desai, "Postharvest biotechnology of oilseeds", CRC press, 1986.
13. J. Purseglove, "Monocotyledons (tropical crops S). Monocotyledons", *Tropical Crops S*, 1972.
14. N. T. Lộc, et al., "Nghiên cứu xây dựng quy trình phòng trừ tổng hợp sâu bệnh hại trên cây hành tím từ sản xuất tới bảo quản sau thu hoạch tại Vĩnh Châu, Sóc Trăng", Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Viện lúa đồng bằng sông Cửu Long, 2012.
15. G. B. Tran, S. M. Dam, N. T. T. Le, "Amelioration of single clove black garlic aqueous extract on dyslipidemia and hepatitis in chronic carbon tetrachloride intoxicated Swiss Albino mice", *International journal of hepatology*, 2018, 1 - 10, 2018. DOI: 10.1155/2018/9383950

- 16.E. Sukasih, "Total Phenol and Antioxidant from Seed and Peel of Ripe and Unripe of Indonesian Sugar Apple (*Annona squamosa* L.) Extracted with Various Solvents", *Journal Of Pharmacy*, 5(10), 20 - 25, 2015. -ISSN: 2319-4219.
- 17.T. M. B.Bandiola, "Extraction and qualitative phytochemical screening of medicinal plants: A brief summary", *International Journal of Pharmacy*, 8(1), 137 - 143, 2018. ISSN 2249-1848.
- 18.D. Lorke, "A new approach to practical acute toxicity testing", *Archives of toxicology*, 54(4), 275 - 287, 1983. DOI: 10.1007/BF01234480.
- 19.K. Sandeep, B. Singh, K. Narinder, "Physico-chemical and phytochemical investigation of plant *Sesbania sesban*", *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(1), 110 - 117, 2014. ISSN: 0975-8585.
- 20.A. Sharma, et al., "Preliminary phytochemical screening of fruit peel extracts of *Annona squamosa* Linn", *Journal of current pharma research*, 4(1), 1038 - 1049, 2013. ISSN: 0011-3131.
- 21.B. Adhikary, et al., "Black tea and theaflavins assist healing of indomethacin-induced gastric ulceration in mice by antioxidative action", *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2011, 1 - 10, 2010. <https://doi.org/10.1155/2011/546560>
- 22.M. D. Goodyear, K. Krleza-Jeric, T. Lemmens, "The declaration of Helsinki", *British Medical Journal Publishing Group*, 335(7621): 624–625, 2007. DOI: 10.1136/bmj.39339.610000.BE.
- 23.I. Fajriaty, I. K. Adnyana, I. Fidrianny, "Acute and sub-chronic (28 days) repeated oral toxicity test of ethanol extract of lerak (*Sapindus rarak*. DC) fruits in Wistar rats", *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(11), 487 - 492, 2014.
- 24.G. Suyog, B. Deepti, P. Ankita, "Tannin rich fraction of *Punica granatum* Linn. Leaves ameliorates Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis in experimental animals", *Pharmacologia*, 5(1), 19 - 31, 2014. DOI: 10.5567/pharmacologia.2014.19.31.
- 25.M. A. Griffioen, et al., "Evaluation of dynamic weight bearing for measuring nonevoked inflammatory hyperalgesia in mice", *Nursing research*, 64(2), 81 - 92, 2015. DOI: 10.1097/NNR.0000000000000082.
- 26.N. A. Al-Afifi, et al., "Acute and sub-acute oral toxicity of *Dracaena cinnabari* resin methanol extract in rats", *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 1 - 14, 2018. DOI: 10.1186/s12906-018-2110-3.
- 27.S. M. Mirhashemi, et al., "The effects of coenzyme Q10 supplementation on cardiometabolic markers in overweight type 2 diabetic patients with stable myocardial infarction: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial", *RYA atherosclerosis*, 12(4), 158 - 169, 2016.
- 28.J.H. Nho, et al., "Effect of *Saururus chinensis* leaves extract on type II collagen-induced arthritis mouse model", *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 1 - 10, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2418-z>.
- 29.A. L. Mausset-Bonnefont, et al., "Arthritis sensory and motor scale: predicting functional deficits from the clinical score in collagen-induced arthritis", *Arthritis research & therapy*, 21(1), 1 - 12, 2019. DOI: 10.1186/s13075-019-2047-z.
- 30.L.Akramas, et al., "Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of herbal preparation EM 1201 in adjuvant arthritic rats", *Medicina*, 51(6), 368 - 377, 2015. DOI: 10.1016/j.medic.2015.11.002.
- 31.N. Das, et al., "Evaluation of acute and subacute toxicity induced by methanol extract of *Terminalia citrina* leaves in Sprague Dawley rats", *Journal of Acute Disease*, 4(4), 316 - 321, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.joad.2015.05.001>.
- 32.S. O. Aniagu, et al., "Toxicity studies in rats fed nature cure bitters", *African Journal of Biotechnology*, 4(1), 72 - 78, 2005. ISSN 1684–5315.

- 33.P. Z. Trio, et al., "Chemopreventive functions and molecular mechanisms of garlic organosulfur compounds", *Food & function*, 5(5), 833 - 844, 2014. DOI: 10.1039/c3fo60479a.
- 34.R. Mythilypriya, P. Shanthi, P. Sachdanandam, "Salubrious effect of Kalpaamruthaa, a modified indigenous preparation in adjuvant-induced arthritis in rats—a biochemical approach", *Chemico-biological interactions*, 173(2), 148 - 158, 2008. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.02.007
- 35.R. Roubenoff, et al., "Adjuvant arthritis as a model of inflammatory cachexia", *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 40(3), 534 - 539, 1997. DOI: 10.1002/art.1780400320.
- 36.L. Rall, R. Roubenoff, "Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions", *Rheumatology*, 43(10), 1219 - 1223, 2004. DOI: 10.1093/rheumatology/keh321.
- 37.G. Gartlehner, et al., "The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis", *The Journal of Rheumatology*, 33(12), 2398 - 2408, 2006.
- 38.B. Newbould, "Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant", *British journal of pharmacology and chemotherapy*, 21(1), 127 - 136, 1963. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1963.tb01508.x
- 39.G. Vogel, "*Antiarthritic and immunomodulatory activity in Drug and discovery and evaluation, pharmacological assays*", Berlin: Springer-Verlag, 2002.
- 40.M. V. K. Patil, A. D. Kandhare, S. D. Bhise, "Anti-arthritic and anti-inflammatory activity of Xanthium srtumarium L. ethanolic extract in Freund's complete adjuvant induced arthritis", *Biomedicine & Aging Pathology*, 2(1), 6 - 15, 2012. DOI:10.1016/j.biomag.2012.01.002.
- 41.Y. Jasemian, et al., "Refinement of the collagen induced arthritis model in rats by infrared thermography", *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 1(4), 469 - 477, 2011. DOI: 10.9734/BJMMR/2011/624.
- 42.M. M. Wintrobe, "*Wintrobe's clinical hematology*", Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- 43.N. Jeme, A. Nordin, C. Henry, "*The agar plaque technique for recognizing antibody producing cells. In, Cell-bound Antibodies*", Wistar Institute Press, Philadelphia, Pennsylvania, 1963.
- 44.M. F. Ismail, S. A. El-Maraghy, N. A. "Sadik, Study of the immunomodulatory and anti-inflammatory effects of evening primrose oil in adjuvant arthritis", *Afr J Biochem Res*, 2, 74 - 80, 2008.
- 45.A. M. Pedernera, et al., "Anti-ulcerogenic and anti-inflammatory activity of the methanolic extract of *Larrea divaricata* Cav. in rat", *Journal of ethnopharmacology*, 105(3), 415 - 420, 2006. DOI: 10.1016/j.jep.2005.11.016.
- 46.M. Choudhary, et al., "Anti-arthritic activity of *Barleria prionitis* Linn. leaves in acute and chronic models in Sprague Dawley rats", *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 52(2), 199 - 209, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2014.07.002>.
- 47.X. Cai, et al., "The comparative study of Sprague–Dawley and Lewis rats in adjuvant-induced arthritis", *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 373(2), 140 - 153, 2006. doi: 10.1007/s00210-006-0062-5. Epub 2006 Apr 26.
- 48.H. S. Rani, et al., "Serum ADA and C-reactive protein in rheumatoid arthritis", *International Journal of Human Genetics*, 6(3), 195 - 198, 2006. <https://doi.org/10.1080/09723757.2006.11885963>.
- 49.C. Price, H. Sammons, "The nature of the serum alkaline phosphatases in liver diseases", *Journal of clinical pathology*, 27(5), 392 - 398, 1974. DOI: 10.1136/jcp.27.5.392.
- 50.R. Spooner, et al., "Serum gamma-glutamyltransferase and alkaline phosphatase in rheumatoid arthritis", *Journal of clinical pathology*, 35(6), 638 - 641, 1982. DOI: 10.1136/jcp.35.6.638.

- 51.M. Cimmino, S. Accardo, "Changes in the isoenzyme pattern of alkaline phosphatase in patients with rheumatoid arthritis", *Clinical chemistry*, 36(7),1376 - 1377, 1996. <https://doi.org/10.1093/clinchem/36.7.1376>.
- 52.M. Cimmino, et al., "Alkaline phosphatase activity in the serum of patients with rheumatoid arthritis", *Zeitschrift fur Rheumatologie*, 49(3), 143 - 146, 1990. DOI: 10.1007/s10067-002-8285-4.
- 53.J. Yokota, et al., "Scavenging of reactive oxygen species by Eriobotrya japonica seed extract", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(3), 467 - 471, 2006. DOI: 10.1248/bpb.29.467
- 54.M. Gupta, et al., "Anti-inflammatory and antipyretic activities of β -sitosterol", *Planta medica*, 39(6), 157 - 163, 1980. DOI: 10.1055/s-2008-1074919.
- 55.T. Bahorun, et al., "Antioxidant activities of Crataegus monogyna extracts", *Planta medica*, 60(4), 323 - 328, 1994. DOI: 10.1055/s-2006-959493.

Ngày nhận bài: 20/01/2021

Ngày chấp nhận đăng: 30/06/2021