

R

BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

Cấp quản lý : BỘ Y TẾ

**NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH SẢN XUẤT THUỐC
AMPELOP TỪ CHÈ DÂY (*Ampelopsis cantoniensis*
Planch. Vitaceae) ĐỂ ĐIỀU TRỊ LOÉT DẠ DÀY -
HÀNH TÁ TRÀNG VÀ TIẾP TỤC ĐÁNH GIÁ
TÁC DỤNG LÂM SÀNG CỦA THUỐC
(1998 - 2000)**

Chủ nhiệm đề tài : GS. TS. PHẠM THANH KỲ

Cơ quan chủ trì : TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

Năm 2001

2003 - 64 - 204/KQ

4649

319103

Chủ nhiệm đề tài : GS. TS. PHẠM THANH KỶ

Cán bộ thực hiện chính :

GS. TS. Phạm Thanh Kỳ

TS. Nguyễn Thị Lai

Ths. Nguyễn Huy Văn

DS. Đào Đình Khoa

DS. CKI. Nguyễn Thị Lâm

Ths. Nguyễn Ngọc Chiến

DS. Nguyễn Quốc Huy

Ths. Nguyễn Kim Trung

BS. Phan Quốc Hoàn

GS. TS. Nguyễn Khánh Trạch

BS. Mai Minh Huệ

BS. Nguyễn Trường Sơn

Tổng kinh phí được duyệt :

Tổng kinh phí được cấp : 134 tr

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Loét dạ dày hành tá tràng là một bệnh khá phổ biến trong cộng đồng, ở nhiều nước tỉ lệ mắc bệnh khoảng 10% dân số, ở Việt Nam khoảng 6 - 7% [2, 5, 8, 9]. Bên cạnh dùng thuốc có nguồn gốc hoá dược việc nghiên cứu những bài thuốc, cây thuốc sẵn có trong nước để điều trị bệnh loét dạ dày - hành tá tràng luôn được nhiều nhà khoa học và sản xuất dược phẩm quan tâm.

Chè dây là một cây thuốc chưa được ghi vào danh mục "Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam" của GS. TS. Đỗ Tất Lợi [4]. Nhân dân địa phương miền núi có cây chè dây mọc hoang như Cao Bằng, Lào Cai, Hà Giang ... thường nấu nước uống như nước chè. Bệnh viện Y học dân tộc tỉnh Cao Bằng và bệnh viện Y học dân tộc quân đội dùng chè dây để sắc hay hãm uống chữa đau dạ dày. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu cây chè dây về mặt thực vật, thành phần hoá học, độc tính, một số tác dụng sinh học và đưa ra chế phẩm AMPELOP điều trị loét dạ dày - hành tá tràng ở giai đoạn 1 (R) đã được nghiệm thu. Để có chế phẩm đưa ra phục vụ rộng rãi ở cộng đồng, chúng tôi tiến hành nghiên cứu giai đoạn 2 (RD) với tên đề tài : "Nghiên cứu quy trình sản xuất thuốc AMPELOP từ chè dây (*Ampelopsis cantoniensis* Planch. - Vitaceae) để điều trị loét dạ dày - hành tá tràng và tiếp tục đánh giá tác dụng lâm sàng của thuốc." có mã số KHYD - 02 - 17.

II- MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI

Theo đúng đề cương đã đăng ký chúng tôi thực hiện 3 mục tiêu :

- 1- Nghiên cứu sản xuất thuốc AMPELOP từ chè dây.
- 2- Tiếp tục đánh giá tác dụng lâm sàng của chế phẩm.
- 3- Hoàn thiện hồ sơ khoa học của chế phẩm AMPELOP để xin phép Bộ Y tế cấp số đăng ký lưu hành.

Ngoài ra chúng tôi thử thêm tác dụng diệt vi khuẩn *Helicobacter pylori* của thuốc AMPELOP trong môi trường nuôi cấy.

III- NGUYÊN LIỆU, THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1- Thử tác dụng diệt xoắn khuẩn *Helicobacter pylori* (HP)

3.1.1- Chế phẩm thử :

Bột AMPELOP chiết từ chè dây (ký hiệu KA) pha thành dung dịch 1% (10mg/1ml)

3.1.2- Môi trường và trang thiết bị nuôi cấy.

- Môi trường canh thang Tryptone Soya broth dùng để bảo quản và vận chuyển các mảnh sinh thiết.

Công thức :

Pancreatic Digest of Casein	17,0g
Papaic Digest	3,0g
Sodium chloride	5,0g
Dibasic Potassium phosphate	2,5g
Dextrose	2,5g
Nước cất vừa đủ	1000ml

Cân 30g môi trường bột Tryptone Soya broth hoà tan trong nước cất cho đủ 1000ml, điều chỉnh pH = $7,3 \pm 0,2$, chia thành các ống nhỏ hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15ph.

- Môi trường thạch máu (*Helicobacter* Agar Stacker plates) do hãng BBL^R Becton Dickenson (Germany) sản xuất.

- Trang thiết bị, dụng cụ :

Tủ ấm CO₂, 37°C

Túi tạo khí Campy-Pak của hãng BBL^R.

Máy li tâm 3000 vòng/phút

Micropipet loại 20µl

Kính hiển vi CD 50 OLYMPUS (Nhật)

Đĩa petri đường kính 9cm

Bình Jaz cấy kỵ khí

Các khoan giấy đã tẩm sẵn kháng sinh chuẩn Amoxicilline (30 μ g) của hãng BBL^R còn hạn sử dụng.

Các khoan giấy đường kính 7mm đã tiệt trùng để tẩm chế phẩm thử.

Kit Pyloritek Test SERIM (USA) để chẩn đoán men urease hoạt động của *Helicobacter pylori* trong mảnh sinh thiết của người mắc bệnh viêm loét dạ dày - tá tràng (DDTT).

3.1.3- Vi khuẩn thử :

- Vi khuẩn *Helicobacter pylori* (HP) được phân lập từ mẫu bệnh phẩm sinh thiết bằng nội soi của bệnh nhân mắc bệnh viêm loét DDTT đang hoạt động tại phòng nội soi và nuôi cấy tại khoa Vi sinh vật, bệnh viện Trung ương quân đội 108.

- Tiêu chuẩn mẫu sinh thiết : Mẫu phải lấy từ hang vị dạ dày của bệnh nhân không phân liệt giới, lứa tuổi, có viêm loét DDTT đang hoạt động, không dùng kháng sinh trong vòng 6 tháng, viêm loét không phải do dùng các chất none - steroid, thử clortest cho dương tính, đồng thời ghi rõ họ tên, tuổi của bệnh nhân lấy mẫu. Bảo quản trong ống nghiệm có môi trường canh thang Trytone Soya broth và phải nuôi cấy trong vòng 120 phút sau khi lấy.

3.1.4- Phương pháp nghiên cứu :

a- Thử sơ bộ khả năng ức chế HP của chế phẩm bằng phương pháp ức chế trực tiếp :

Mẫu sinh thiết được nghiền nát trong môi trường canh thang Trytone Soya broth, lấy môi trường có vi khuẩn HP này cấy ria lên môi trường *Helicobacter Agar*. Lấy 0,5ml dung dịch chế phẩm thử láng đều lên mặt đĩa môi trường đã cấy HP, nuôi cấy ở 37°C trong tủ ấm có 10% khí CO₂ hoặc trong túi Campy - Pak.

Song song làm đĩa mẫu đối chứng không có chất thử.

Đánh giá kết quả sau 5 ngày nuôi cấy, so sánh với mẫu đối chứng (thí nghiệm được làm lặp lại 3 lần).

b- Xác định nồng độ có khả năng ức chế vi khuẩn HP của chế phẩm thử.

Làm kháng sinh đồ theo phương pháp khuếch tán trên môi trường (phương pháp Kirby - Bauer) : dùng micropipet hút lượng dung dịch chứa các chất định thử có nồng độ định trước nhỏ lên các khoanh giấy có đường kính 7mm đã được tiệt trùng.

Dung dịch Ampelop có các hàm lượng : 200, 150, 100, 75, 50 μ g.

Các đĩa môi trường được láng đều vi khuẩn HP đã phân lập với nồng độ xấp xỉ 10^8 vi khuẩn / 1ml. Sau khi đặt các khoanh giấy tẩm các chất thử trên được nuôi cấy ở 37°C trong tủ ấm có 10% khí CO₂ hoặc trong túi Campy - Pak. Đọc kết quả sau 5 ngày kể từ khi nuôi cấy.

Dùng các khoanh giấy tẩm kháng sinh chuẩn Amoxicillin 30 μ g làm đối chứng. Tất cả các thí nghiệm đều được làm lại 3 lần.

Quy định đường kính vòng ức chế của hãng BBL^R với mẫu chuẩn đối chứng Amoxicillin (Amo C-30) 30 μ g như sau :

- Đường kính $\phi > 18$ mm : nhạy cảm (S)
- Đường kính $\phi \approx 14 - 17$ mm : trung gian (I)
- Đường kính $\phi < 13$ mm : đề kháng (R)

3.2- Nghiên cứu sản xuất thuốc AMPELOP từ chè dây.

3.2.1- Nguyên liệu :

Chè dây mua tại Cao bằng đạt tiêu chuẩn cơ sở (TCCS)

3.2.2- Máy móc, thiết bị :

- Bình ngâm kiệt
- Nồi cất thu hồi dung môi
- Máy hút chân không
- Phễu lọc
- Rây các cỡ
- Máy trộn
- Máy nghiền ERWEKA
- Máy sát hạt
- Máy đóng nang thủ công và máy đóng nang tự động

- Tủ sấy gió nóng
- Thùng pha chế Inox

3.2.3- Phương pháp nghiên cứu :

- Chiết xuất hoạt chất trong chè dây bằng phương pháp ngâm kiệt với cồn 70%.

- Định tính bằng phản ứng hoá học và sắc ký lớp mỏng dùng bản mỏng Silicagel GF₂₅₄ tráng sẵn của hãng MERCK, hệ dung môi khai triển : Toluen - Ethylacetat - acid formic [5 : 6 : 1]

- Định lượng flavonoid toàn phần bằng phương pháp cân.

- Xác định độ ẩm theo phương pháp của DDVN II

- Thử độ đồng đều khối lượng theo DDVNII

- Thử độ tan rã theo DDVNII (Thuốc nang)

- Thử độ nhiễm khuẩn theo DDVNII.

- Kiểm nghiệm nguyên liệu đóng nang : Bột AMPELOP và viên nang AMPELOP theo tiêu chuẩn cơ sở.

3.3- Thử tác dụng của thuốc AMPELOP trên lâm sàng

3.3.1- Mục đích nghiên cứu :

- Đánh giá tác dụng của thuốc AMPELOP làm giảm các triệu chứng lâm sàng của loét dạ dày tá tràng.

- Đánh giá tác dụng của AMPELOP làm lành vết loét dạ dày hành tá tràng.

- Nghiên cứu tác dụng phụ của thuốc AMPELOP trong điều trị loét dạ dày tá tràng.

3.3.2- Đối tượng nghiên cứu :

- ≥ 60 bệnh nhân tuổi từ 19 đến 70 tuổi.

- Nội soi có loét dạ dày hoặc loét hành tá tràng, hoặc loét cả hai.

- Xét nghiệm tìm H. pylori dương tính trên cả test urease và mô bệnh học.

Loại bỏ nghiên cứu : những bệnh nhân bỏ dở thuốc hoặc uống thuốc không đầy đủ theo quy định.

3.3.3- Phương pháp nghiên cứu :

- Bệnh nhân chọn vào nghiên cứu được làm bệnh án theo mẫu nghiên cứu, theo dõi diễn biến các triệu chứng trước và sau điều trị theo các mức độ.

- Loét dạ dày tá tràng được chẩn đoán và đánh giá qua nội soi trước và sau điều trị theo : vị trí, số lượng ổ loét, kích thước và tính chất ổ loét.

- Xác định nhiễm H. Pylori bằng các mẫu sinh thiết lấy từ vùng hang vị và được xác định bằng 2 phương pháp.

+ Test urease (sử dụng dung dịch ure - indol do Viện vệ sinh dịch tễ pha chế).

- Dương tính (+) : ít H.P, chuyển màu sau 2h.

- Dương tính (++) : Mức độ vừa, chuyển màu trong vòng 15ph - 2h.

- Dương tính (+++) : Mức độ nặng, chuyển màu trong vòng 15ph.

+ Mô bệnh học : Mức độ nhiễm H. Pylori trên các tiêu bản nhuộm Giemsa được đánh giá theo số lượng vi khuẩn trên một vi trường.

IV- KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

4.1- THỬ TÁC DỤNG DIỆT KHUẨN HELICOBACTER PYLORI (HP)

Từ năm 1983 đến nay các nhà khoa học đã xác định sự có mặt của xoắn khuẩn *Helicobacter pylori* trong bệnh viêm loét dạ dày tá tràng (DDTT), đã có nhiều nghiên cứu chứng minh HP có vai trò chủ yếu trong cơ chế gây bệnh loét DDTT. Vì vậy cần chứng minh xem chế phẩm AMPELOP sản xuất từ chè dây có tác dụng diệt khuẩn HP hay không. Trong giai đoạn nghiên cứu trước chúng tôi chưa có điều kiện thử tác dụng này. Gần đây khoa Vi sinh vật - Bệnh viện TW Quân đội 108 đã triển khai được kỹ thuật nuôi cấy HP do đó chúng tôi đã làm bổ xung thêm phần thử tác dụng diệt HP của chế phẩm AMPELOP (Ký hiệu KA).

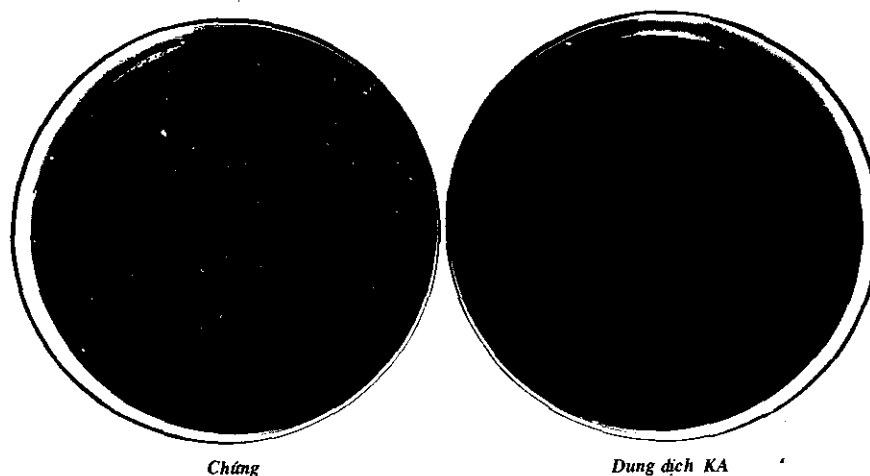
4.1.1- Thử sơ bộ khả năng ức chế HP của chế phẩm.

Tiến hành theo mục 3.1.4.a- Đánh giá kết quả sau 5 ngày nuôi cấy so sánh với mẫu đối chứng không có chế phẩm AMPELOP, kết quả được trình bày ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1 : Kết quả thử sơ bộ khả năng ức chế HP của chế phẩm AMPELOP (KA)

Mẫu thử	Lượng chất thử	Ức chế sự phát triển HP
Ampelop (KA)	5mg	+++
Đối chứng	0mg	-

Ghi chú : (+ + +) : ức chế hoàn toàn
(-) : không ức chế



Thử nghiệm tác dụng ức chế trên vi khuẩn *Helicobacter pylori*

Hình 1 : Tác dụng ức chế vi khuẩn HP của AMPELOP

4.1.2- *Kết quả thử xác định hàm lượng chế phẩm KA có khả năng ức chế vi khuẩn HP theo phương pháp khuếch tán trên môi trường (Phương pháp Kirby - Bauer).*

Tiến hành theo mục 3.1.4-b. Kết quả được ghi ở bảng 2 và hình 2.

Bảng 2 : Kết quả đo đường kính vòng vô khuẩn các chế phẩm thử (mm).

Hàm lượng (μg)	200	150	100	75	50	30
KA	25,5	23,0	17,4	12,0	9,4	
Amoxicillin						27,7