

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



LÊ HẢI THẢO

**NGHIÊN CỨU TÍNH KÍCH ỨNG DA VÀ
KHÁNG KHUẨN, CHỐNG VIÊM, GIẢM NGỨA
CỦA CHẾ PHẨM TAD TRÊN THỰC NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SỸ Y HỌC

HÀ NỘI - 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



LÊ HẢI THẢO

**NGHIÊN CỨU TÍNH KÍCH ỨNG DA VÀ
KHÁNG KHUẨN, CHỐNG VIÊM, GIẢM NGỨA
CỦA CHẾ PHẨM TAD TRÊN THỰC NGHIỆM**

Chuyên ngành : Y học cổ truyền

Mã số: 8720115

LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Vũ Nam

HÀ NỘI - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Lê Hải Thảo, học viên cao học khóa 15 - Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam. Tôi xin cam đoan:

- Luận văn này do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS. TS Vũ Nam
- Nội dung của luận văn không trùng lặp với bất cứ một nghiên cứu nào khác được công bố tại Việt Nam.
- Các số liệu trong luận án hoàn toàn trung thực và khách quan, được xác nhận của cơ sở nghiên cứu.

Hà Nội, ngày tháng năm 2024

Tác giả luận văn

Lê Hải Thảo

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin được tỏ lòng biết ơn sâu sắc, lời cảm ơn trân trọng nhất đến: Đảng uỷ, Ban Giám đốc, Phòng Đào tạo Sau đại học cùng toàn thể các thầy cô giáo - Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam; Ban giám đốc, khoa Da liễu, Khoa Dược - Bệnh viện Y học cổ truyền Trung ương đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin được tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc thầy: PGS.TS Vũ Nam, người thầy đã trực tiếp hướng dẫn tận tình, cung cấp cho tôi kiến thức và phương pháp luận quý báu, giúp tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn cô PGS.TS. Phạm Thị Vân Anh, giảng viên Bộ môn Dược lý – Trường Đại học Y Hà Nội, cô TS. Nguyễn Thị Minh Thu, giảng viên Bộ môn Dược lý, cô ThS. Nguyễn Thị Thu Hằng, giảng viên Bộ môn Vi sinh ký sinh trùng – Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam và các giảng viên, kỹ thuật viên khác đã nhiệt tình giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy, các cô trong hội đồng chấm đề cương, hội đồng đạo đức, hội đồng chuyên đề, hội đồng chấm luận văn và các nhà khoa học, đồng nghiệp đã đóng góp những ý kiến, kinh nghiệm quý báu để luận văn hoàn thiện hơn.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn người thân trong gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã động viên khích lệ tôi, tạo điều kiện thuận lợi, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn !

Hà Nội, ngày tháng năm 2024

Học viên

Lê Hải Thảo

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
	Streptococcus	Liên cầu
DĐVN		Dược điển Việt Nam
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
OCDE	Organisation for Economic Co-operation and Development	Tổ chức hợp tác và phát triển kinh tế
S.aureus	Staphylococcus	Tụ cầu vàng
TAD	Treatment of Atopic Dermatitis	Điều trị viêm da cơ địa
UVA	Ultraviolet A	Tia tử ngoại bước sóng A
UVB	Ultraviolet B	Tia tử ngoại bước sóng B
VDCĐ		Viêm da cơ địa
YHCT		Y học cổ truyền

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Cấu trúc, sinh lý của da	3
1.1.1. Cấu trúc của da.....	3
1.1.2. Sinh lý da.....	6
1.2. Viêm da cơ địa theo y học hiện đại	7
1.2.1. Thuật ngữ	7
1.2.2. Dịch tễ	7
1.2.3. Cơ chế bệnh sinh.....	8
1.2.4. Đặc điểm lâm sàng của viêm da cơ địa.....	10
1.2.5. Cận lâm sàng	12
1.2.6. Chẩn đoán xác định.....	12
1.2.7. Biến chứng	13
1.2.8. Điều trị.....	14
1.3. Viêm da cơ địa theo y học cổ truyền	15
1.3.1. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh.....	15
1.3.2. Triệu chứng lâm sàng.....	15
1.3.3. Điều trị viêm da cơ địa theo y học cổ truyền	16
1.4. Tổng quan một số nghiên cứu về điều trị viêm da cơ địa theo y học cổ truyền	18
1.4.1. Trên thế giới.....	18
1.4.2. Việt Nam	19
1.5. Tổng quan về chế phẩm TAD	19
1.5.1. Hoàng bá	20
1.5.2. Đại hoàng	21
1.5.3. Hoàng đằng	22
1.5.4. Ké đầu ngựa	23

1.5.5. Khở sâm.....	24
1.5.6. Lá móng.....	25
1.6. Một số mô hình nghiên cứu về tính kích ứng da, kháng khuẩn, chống viêm, giảm ngứa.....	26
1.5.6. Tính kích ứng da	26
1.5.6. Tính kháng khuẩn.....	27
1.5.6. Tính chống viêm, giảm ngứa	28
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	32
2.1. Chất liệu nghiên cứu	32
2.1.1. Chế phẩm làm nghiên cứu.....	32
2.1.2. Thuốc, hóa chất, máy móc phục vụ nghiên cứu	32
2.2. Đối tượng nghiên cứu.....	34
2.2.1. Đối tượng nghiên cứu tính kích ứng da	34
2.2.2. Đối tượng nghiên cứu tính kháng khuẩn.....	34
2.2.3. Đối tượng nghiên cứu tính chống viêm, giảm ngứa	35
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	36
2.3.1. Nghiên cứu tính kích ứng da của chế phẩm TAD.....	36
2.3.2. Nghiên cứu tính kháng khuẩn của chế phẩm TAD.....	39
2.3.3. Nghiên cứu tính chống viêm, giảm ngứa của chế phẩm TAD.....	40
2.4. Địa điểm nghiên cứu	43
2.5. Thời gian nghiên cứu	44
2.6. Các biến số và chỉ số trong nghiên cứu	44
2.6.1. Các biến số và chỉ số trong nghiên cứu tính kích ứng da của chế phẩm TAD.....	44
2.6.2. Các biến số và chỉ số trong nghiên cứu tính kháng khuẩn của chế phẩm TAD.....	44
2.6.3. Các biến số và chỉ số trong nghiên cứu tính chống viêm, giảm ngứa của chế phẩm TAD	44
2.7. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu	44

2.8. Sai số và các không chế sai số	45
2.9. Đạo đức nghiên cứu	45
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ	47
3.1. Đánh giá tính kích ứng da của chế phẩm TAD	47
3.2. Đánh giá tính kháng khuẩn của chế phẩm TAD	48
3.2.1. Xác định hoạt tính kháng khuẩn in vitro của chế phẩm TAD trên 2 chủng vi khuẩn	48
3.2.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của chế phẩm TAD trên 2 chủng vi khuẩn	52
3.3. Đánh giá tính chống viêm, giảm ngứa của chế phẩm TAD	58
3.3.1. Tác dụng chống viêm tai cấp do dầu croton	58
3.3.2. Đánh giá tác dụng chống ngứa.....	60
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	65
4.1. Về tính kích ứng da của chế phẩm TAD	65
4.1.1. Lựa chọn động vật nghiên cứu.....	65
4.1.2. Chuẩn bị động vật nghiên cứu	66
4.1.3. Kết quả chỉ số kích ứng da.....	66
4.2. Về tính kháng khuẩn của chế phẩm TAD	67
4.3. Về tính chống viêm, giảm ngứa của chế phẩm TAD	70
4.3.1. Tính chống viêm	70
4.3.2. Tính giảm ngứa	72
KẾT LUẬN	74
KIẾN NGHỊ	75
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Tiêu chuẩn chẩn đoán của Hanifin và Raika	12
Bảng 2.1. Bảng thiết bị sử dụng trong nghiên cứu tính kháng khuẩn.....	33
Bảng 2.2. Bảng dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu tính kháng khuẩn	33
Bảng 2.3. Bảng hóa chất, dung môi	33
Bảng 2.4. Môi trường casein đậu tương lỏng	34
Bảng 2.5. Môi trường thạch dinh dưỡng.....	35
Bảng 2.6. Môi trường Nueller - Hinton	35
Bảng 2.7. Bảng đánh giá ban đỏ trên da thỏ	38
Bảng 2.8. Bảng đánh giá phù nề trên da thỏ	38
Bảng 2.9. Bảng xếp loại kích ứng da	39
Bảng 2.10. Bảng đánh giá số lần gãi của chuột	42
Bảng 3.1. Nồng độ kháng khuẩn của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn Staphylococcus aureus ATCC 6538	50
Bảng 3.2. Nồng độ kháng khuẩn của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn Streptococcus mantus ATCC 35668.....	51
Bảng 3.3. MIC của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn Staphylococcus aureus ATCC 6538	54
Bảng 3.4. MIC của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn Streptococcus mantus ATCC 35668	57
Bảng 3.5. Độ dày trung bình của tai chuột trước và sau khi bôi dầu croton ..	58
Bảng 3.6. Mức độ ức chế viêm của Chế phẩm TAD sau 6 giờ bôi dầu croton ..	59
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của chế phẩm TAD đến số lần gãi ngứa trung bình....	61
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của chế phẩm TAD đến tổng số lần gãi của chuột nhắt trong 30 phút.....	63

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Hoàng bá	20
Hình 1.2. Đại hoàng	21
Hình 1.3. Hoàng đằng	22
Hình 1.4. Ké đầu ngựa	23
Hình 1.5. Khô sâm	24
Hình 1.6. Lá móng	25
Hình 2.1. Cạo lông thỏ	36
Hình 2.2. Chọn thỏ có da lành lặn.....	36
Hình 2.3. Chuẩn bị mẫu thử đặt lên da thỏ	37
Hình 2.4. Đặt mẫu thử lên da thỏ	37
Hình 2.5. Đặt mẫu thử.....	37
Hình 2.6. Băng cô định miêng dán.....	37
Sơ đồ 2.1. Sơ đồ quy trình nghiên cứu.....	46
Hình 3.1. Da thỏ số 3 sau 1 giờ đặt mẫu thử.....	47
Hình 3.2. Da thỏ 2 sau 2 giờ đặt mẫu thử	47
Hình 3.3. Da thỏ 5 sau 4 giờ đặt mẫu thử	47
Hình 3.4. Da thỏ 1 sau 6 giờ đặt mẫu thử	48
Hình 3.5. Da thỏ 6 sau 24 giờ đặt mẫu thử	48
Hình 3.6. Nồng độ pha loãng 1x	49
Hình 3.7. Nồng độ pha loãng 10x	49
Hình 3.8. Nồng độ pha loãng 20x	49
Hình 3.9. Nồng độ pha loãng 50x	49
Hình 3.10. Nồng độ pha loãng 100x	49
Hình 3.11. Nồng độ pha loãng 1x	50
Hình 3.12. Nồng độ pha loãng 10x	50

Hình 3.13. Nồng độ pha loãng 20x	51
Hình 3.14. Nồng độ pha loãng 50x	51
Hình 3.15. Nồng độ pha loãng 100x	51
Hình 3.16. Nồng độ cao 1x ủ trong 15 phút và 30 phút.....	52
Hình 3.17. Nồng độ cao 10x ủ trong 15 phút và 30 phút.....	53
Hình 3.18. Nồng độ cao 20x ủ trong 15 phút và 30 phút.....	53
Hình 3.19. Nồng độ cao 50x ủ trong 15 phút và 30 phút.....	53
Hình 3.20. Nồng độ cao 100x ủ trong 15 phút và 30 phút.....	54
Hình 3.21. Nồng độ cao 1x ủ trong 15 phút và 30 phút.....	55
Hình 3.22. Nồng độ cao 10x ủ trong 15 phút và 30 phút.....	55
Hình 3.23. Nồng độ cao 20x ủ trong 15 phút và 30 phút.....	56
Hình 3.24. Nồng độ cao 50x ủ trong 15 phút và 30 phút.....	56
Hình 3.25. Nồng độ cao 100x ủ trong 15 phút và 30 phút.....	56
Biểu đồ 1. Sự thay đổi độ dày tai chuột theo thời gian trong 6 giờ	58
Biểu đồ 2. Thời điểm khởi phát cơn ngứa đầu tiên.....	60
Biểu đồ 3. Ảnh hưởng của Chế phẩm TAD đến số lần gãi ngứa của chuột nhắt tại từng thời điểm nghiên cứu	62
Biểu đồ 4. Ảnh hưởng của Chế phẩm TAD đến tổng số lần gãi của chuột nhắt trong 30 phút.....	62

ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm da cơ địa (VDCĐ) là một bệnh da mạn tính tái phát, có liên quan đến cơ địa dị ứng.

Bệnh sinh bệnh nguyên của VDCĐ là tổng hợp của nhiều yếu tố như di truyền, miễn dịch, nhiễm trùng, hàng rào bảo vệ da [1].

Bệnh gặp ở cả 2 giới, tuy nhiên nữ hay bị hơn (tỉ lệ nữ/nam là 1.3/1,0). Trong những năm gần đây, tỉ lệ viêm da cơ địa tăng, kể cả ở những nước phát triển và các nước đang phát triển [1]. Theo thống kê ở Mỹ và một số nước Tây Âu, có khoảng 10-20% trẻ em và 1-3% người lớn bị bệnh này [2]. Hiện nay, chưa có nghiên cứu về tỷ lệ hiện mắc viêm da cơ địa ở Việt Nam. Theo báo cáo của phòng khám Viện Da liễu quốc gia, có khi viêm da cơ địa chiếm khoảng 20% số bệnh nhân đến khám tại phòng khám [3].

Hình ảnh lâm sàng của bệnh VDCĐ thay đổi theo giai đoạn bệnh, theo thời kỳ và theo lứa tuổi [4],[5],[6].

Điều trị VDCĐ chủ yếu là điều trị triệu chứng bằng corticoid bôi và các chế phẩm ức chế calcineurin tại chỗ, kết hợp giữ ẩm cho da, dùng kháng histamin H1 theo đường uống kết hợp các chất ức chế miễn dịch khác và chống phân bào [1].

Theo Y học cổ truyền (YHCT), bệnh thuộc phạm vi chứng thấp chân, thấp sang,... Về điều trị có nhiều vị thuốc dưới dạng uống, ngâm rửa, bôi ngoài với các tác dụng thanh nhiệt giải độc, nhuận dưỡng bì phu, bình ổn vệ khí, được sử dụng trong cộng đồng, hoặc các cơ sở y tế YHCT, từ đó nâng cao thể trạng, góp phần điều trị theo căn nguyên y học hiện đại của bệnh. Cùng với sự phát triển của YHCT, thuốc dùng ngoài trong da liễu cũng có những tiến bộ không ngừng, thể hiện bằng những nghiên cứu dược lý học và sự tích lũy không ngừng những bài thuốc mới với hiệu quả tốt, độc tính thấp, dễ kết hợp, phát triển nhanh [7].

Khoa Da liễu, bệnh viện YHCT Trung Ương với hơn 10 năm kinh nghiệm sử dụng bài thuốc gồm các vị Đại hoàng, Hoàng bá, Hoàng đằng, Ké đầu ngựa, Lá móng, Khổ sâm dùng làm thuốc ngâm để ngâm cho tổn thương của viêm da cơ địa, chúng tôi đã đạt được những kết quả khả quan nhất định. Tuy nhiên chưa có nghiên cứu đánh giá về độc tính, tác dụng dược lý cũng như tác dụng điều trị VDCĐ một cách khoa học. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu chế phẩm TAD với các mục tiêu sau:

- 1. Đánh giá tính kích ứng da của chế phẩm TAD trên thực nghiệm.***
- 2. Đánh giá tác dụng kháng khuẩn, chống viêm, giảm ngứa của chế phẩm TAD trên thực nghiệm.***

Chương 1

TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Cấu trúc, sinh lý da

1.1.1. Cấu trúc của da

1.1.1.1 Thượng bì

Là lớp ngoài cùng của da, bao gồm chủ yếu là tế bào biểu mô sừng (keratinocyte) sử dụng tới 95%, ngoài ra còn tế bào sắc tố, tế bào Merkel và tế bào Langerhans. Thượng bì tác dụng như hàng rào bảo vệ da, gồm 4 lớp chính: tính từ ngoài vào trong là lớp tế bào sừng, lớp hạt, lớp gai, lớp đáy (lớp tế bào mầm). Riêng lòng bàn tay, bàn chân có thêm 1 lớp sáng xen kẽ giữa lớp sừng với lớp hạt (5 lớp). Thượng bì dày khoảng 0,4-1,5mm tùy theo vị trí trên cơ thể (dày nhất ở lòng bàn tay, bàn chân, móng tay nhất ở mi mắt, vùng sinh dục). Thượng bì có các lớp sau:

Lớp đáy

Lớp tế bào đáy còn gọi là lớp tế bào cơ bản (tế bào đáy). Đây là lớp sâu nhất của thượng bì, gồm một hàng tế bào hình trụ, nhân có trục dài, thẳng đứng. Nguyên sinh chất ưa kiềm chứa các hạt sắc tố melanin. Đây là lớp tế bào cơ bản làm nhiệm vụ sinh sản, đổi mới thượng bì. Các tế bào đáy có khả năng sinh sản mạnh mẽ, mỗi tế bào đáy sẽ phân chia thành 2 tế bào, trong đó 1 tế bào đáy sẽ đi lên các lớp trên, từ đó tế bào bào mới sẽ thay thế các tế bào cũ đã biệt hóa.

Trong bào tương của lớp tế bào đáy bắt đầu sản xuất các sợi keratin rất mảnh giúp các tế bào liên kết với nhau một cách chắc chắn. Thời gian cần thiết cho một tế bào đáy phân chia, đặc biệt và di chuyển tới lớp sừng khoảng 14 ngày. Thời gian ở lớp sừng đến khi thành sừng da và bong ra khoảng 14 ngày nữa. Như vậy thời gian để tái tạo toàn bộ bì bì là khoảng 4 tuần.

Lớp tế bào gai

Còn gọi là lớp nhót Malpighi. Là lớp tế bào hình đa diện, nằm trên lớp tế bào đáy, xếp từ 6 đến 20 hàng, càng về phía trên tế bào càng dẹt dần. Đây là những tế bào trưởng thành của biểu bì. Lớp gai được coi là một lớp quá trình hóa học của tế bào biểu mô. Các tế bào gai cũng có khả năng sinh sản bằng gián phân. Hoạt động gián phân của lớp đáy và lớp gai đều mạnh mẽ và liên tục. Trong lớp tế bào gai còn có các tế bào tua di chuyển hay còn gọi là tế bào Langerhans

Lớp tế bào hạt

Là những tế bào bào nằm ở trên lớp gai bao gồm, 3-4 hàng tế bào, nhân sáng. Bề dày của lớp hạt dao phụ thuộc vào mức độ hóa hóa. Lớp hạt dày ở những nơi có lớp sừng dày. Ở những nơi có sừng thì thường không có lớp hạt. Trong tế bào bào sản xuất rất nhiều hạt keratohyaline nên còn được gọi là lớp tế bào hạt/hạt. Thành phần chủ yếu của các keratohyaline là tiền chất filaggrin và các lá keratin trung gian. Sự xuất hiện của các bằng chứng này trong quá trình xử lý hiện tại. Trong quá trình chuyển dần từ tế bào thành tế bào sừng, các tiền chất filaggrin sẽ chuyển thành filaggrin và là thành phần chủ yếu của yếu tố dinh dưỡng tự nhiên (yếu tố giữ ẩm tự nhiên) và vỏ tế bào lớp sừng

Lớp tế bào sáng

Lớp này chỉ có ở lòng bàn tay, bàn chân và nằm ở trên lớp hạt, dưới lớp sừng bao gồm những tế bào bào trong, tĩnh nhất, không có nhân, dẹt, sắp xếp thành 2 hoặc 3 hàng. Các tế bào này chứa chất eleidin, hình thành do hoá hoá các hạt sừng trong chứa nhiều nhóm disulfid.

Lớp tế bào sừng

Lớp tế bào sừng là lớp ngoài cùng của da, có bề dày khoảng 0,1mm; dày nhất là ở lòng bàn tay, lòng bàn chân từ 0,8-1,4mm, mỏng nhất là ở mi mắt, 50 μ m. Đây là những tế bào có kích thước lớn nhất ở lớp thượng bì.

Thành phần chủ yếu là chất sừng (keratin). Quá trình sừng hóa diễn ra liên tục trợ giúp da luôn đổi mới. Quá trình này chịu ảnh hưởng của cả yếu tố bên ngoài môi trường và bên trong (gen, các yếu tố toàn thân). Thượng bì không có mạch máu và được nuôi dưỡng bằng dịch khu trú ở liên gian bào.

Các tế bào thượng bì có tua

Thượng bì chứa hai loại tế bào có giả túc là tế bào hắc tố và tế bào Langerhans [1].

1.1.1.2. Trung bì

Trung bì gồm các lớp

Trung bì nông

Là lớp nuôi dưỡng, rất mỏng chỉ khoảng độ 0,1mm. Trên bề mặt có những gai nhô lên còn gọi là nhú bì hay gai bì (papille) ăn sâu vào thượng bì. Các tổ chức liên kết gai do không được tạo nên ở đó có nhiều mao mạch. Các nhú bì có chiều cao và độ lớn khác nhau tùy theo vùng da. Da ở da lòng bàn tay, bàn chân các nhú có khi cao tới 0,2 mm, ở da mặt thì lớp nhú rất mỏng.

Trung bì chính thức hay còn gọi là trung bì sâu

Đây là lớp chống đỡ, dày khoảng 0,4mm, gồm có:

- Những sợi chống đỡ: sợi keo hay còn gọi là sợi hồ, sợi chun, sợi lưới, sợi liên võng.
- Các chất cơ bản
- Tế bào
- Mạch máu

1.1.1.3. Hạ bì

Hạ bì (còn gọi là lớp mỡ dưới da) chứa mô liên kết, nhiều mạch máu, thần kinh đảm bảo cho da sống và thực hiện các chức năng của mình. Cấu hình gồm nhiều tầng nhiều ô, chứa nhiều chất mỡ. Ở hạ bì có nhiều mạch máu lớn. Độ dày của hạ bì tùy thuộc vào thể hiện của mỗi người. Đây là kho dự trữ

mỡ lớn nhất của cơ thể, cú đánh có vai trò bảo vệ cơ học chống lại những sức ép, chấn động tác; xem như cái gối che da và những cấu trúc bên dưới và có vai trò điều hòa nhiệt độ.

1.1.1.4. Các thành phần phụ của da

Tuyến mồ hôi, tuyến bã, nang lông, móng, niêm mạc [1].

1.1.2. Sinh lý da

Da, cơ quan lớn nhất trong cơ thể người, có diện tích bề mặt khoảng 1,5 đến 2 mét vuông, chiếm 16% trọng lượng cơ thể. Da được coi là một trong những cơ quan quan trọng nhất của cơ thể, không chỉ là một vỏ bọc đơn giản mà cũng là một cơ quan có nhiều chức năng quan trọng bảo vệ cơ thể khỏi các chất gây hại về sinh học, lý học, hoá học. Ngoài nhiệm vụ chở che, bảo vệ, da cũng mang chức năng hấp thu, dự trữ và chuyển hóa các chất, bài tiết các chất bảo vệ da (chất bã), đào thải các chất độc, thu nhận cảm giác, điều hoà nhiệt độ, cân bằng nội môi. Da cũng có chức năng miễn dịch [1].

Các chức năng của da:

- Chức năng bảo vệ: khỏi các chấn thương cơ học, các vi sinh vật, những tổn thương vật lý, tổn thương do chất hóa học và chống lại sự mất dịch của cơ thể.
- Chức năng điều hòa thân nhiệt
- Chức năng bài tiết: mồ hôi, chất bã.
- Chức năng chuyển hóa.
- Chức năng thu nhận cảm giác.
- Chức năng tạo sừng, tạo sắc tố.
- Chức năng miễn dịch.
- Chức năng hô hấp.
- Chức năng tạo ngoại hình và chủng tộc.
- Sự liên quan giữa da và nội tạng [1].

1.2. Tổng quan về bệnh viêm da cơ địa theo y học hiện đại

1.2.1. Thuật ngữ

Với tổn thương lâm sàng đa dạng và thay đổi theo lứa tuổi nên bệnh đã được mô tả với nhiều tên khác nhau. Một số như “Chàm thể tạng”, “Chàm trẻ em”, “Sẩn ngứa Besnier” được dùng để chẩn đoán cho trẻ nhỏ, “Chàm nếp gấp”, “Lichen đơn giản mạn tính”, “Viêm da thần kinh” cho trẻ lớn và người lớn [8], [9]. Hay Coca và cộng sự dùng thuật ngữ atopy với nghĩa là “Lạc chỗ”, “tạng dị ứng”, “cơ địa dị ứng” để mô tả một số biểu hiện lâm sàng quá mẫn ở người, đặc trưng bởi hen, sốt cỏ khô và ban dạng chàm [8], [10]. Đến 1930, Sulzberger và cộng sự đã đề nghị dùng thuật ngữ Viêm da cơ địa (Atopic dermatitis) [8], [9].

Thuật ngữ VDCĐ hay còn gọi là chàm thể tạng được sử dụng phổ biến trên thế giới vì nó phù hợp với các biểu hiện lâm sàng, sinh bệnh học và tổ chức học [9].

1.2.2. Dịch tễ

1.2.2.1. Trên thế giới

Trên thế giới, VDCĐ là một bệnh phổ biến ở các nước. VDCĐ còn được gọi là bệnh chàm thể tạng, là một tình trạng viêm da tái phát mãn tính [11]. Tỷ lệ mắc AD đã tăng gấp 2 đến 3 lần ở các quốc gia công nghiệp hóa, ảnh hưởng đến khoảng 15% đến 20% trẻ em và 1% đến 3% người lớn trên toàn thế giới [12]. Theo Schultz Hanifin, trong ba thập kỷ vừa qua tỷ lệ bệnh tăng lên gấp 3 lần [13].

Theo nghiên cứu gần đây, tại Trong một cuộc khảo sát cắt ngang trên toàn thế giới được thực hiện vào năm 1999, Nghiên cứu Quốc tế về Hen suyễn và Dị ứng ở Trẻ em đã báo cáo rằng, nhìn chung, tỷ lệ mắc bệnh VDCĐ ở trẻ em ở Châu Á cao hơn ở trẻ em ở Bắc Âu [6], với tỷ lệ AD ở Trung Quốc, Hàn Quốc và Nhật Bản lần lượt là 1,2, 3,4 và 10,5%. Giai đoạn

III của ISAAC xuất bản năm 2009 cho thấy sự gia tăng tỷ lệ mắc bệnh AD ở trẻ em trong thập kỷ qua, đạt 10–20% ở nhiều nước công nghiệp đang phát triển ở Châu Á [14].

1.2.2.2. Trong nước

Ở Việt Nam, tỷ lệ bệnh “Chàm” nói chung chiếm 25% tổng số các bệnh ngoài da [15]. Tại Bệnh viện Da liễu Trung ương từ năm 1995 – 2000 VDCĐ chiếm khoảng 4,2 % trong các bệnh da. Theo báo cáo của phòng khám Viện Da liễu quốc gia, có khi viêm da cơ địa chiếm khoảng 20% số bệnh nhân đến khám tại phòng khám [3].

Tỷ lệ mắc ngày càng tăng, từ những năm 1960, tỷ lệ mắc VDCĐ tăng 3 lần. Bệnh chiếm khoảng 10% dân số, trong đó VDCĐ trẻ em chiếm từ 10 – 20% , VDCĐ người lớn chiếm từ 1 – 3% dân số.

Tuổi phát bệnh: 60% xuất hiện trong năm đầu tiên, 30% ở trẻ < 5 tuổi, 10% ở lứa tuổi 6-20, bệnh hiếm khi bắt đầu ở tuổi trưởng thành.

Nam hay gặp hơn nữ [16].

1.2.3. Cơ chế bệnh sinh

Viêm da cơ địa là bệnh viêm da mãn tính phổ biến nhất. Những yếu tố như khuynh hướng di truyền, sự phá vỡ hàng rào biểu bì và rối loạn điều hòa hệ thống miễn dịch là một số căn nguyên quan trọng của VDCĐ. Hàng rào bảo vệ da bị suy yếu có thể là bước đầu tiên trong quá trình phát triển bệnh dị ứng cũng như bệnh VDCĐ, dẫn đến tình trạng viêm da và mẫn cảm dị ứng nặng hơn. Các cytokine loại 2 cũng như interleukin 17 và interleukin 22 góp phần gây rối loạn chức năng hàng rào bảo vệ da và phát triển bệnh VDCĐ. Những hiểu biết mới về sinh lý bệnh của VDCĐ đã tập trung vào cấu trúc lipid biểu bì, miễn dịch và rối loạn sinh lý vi khuẩn. Các chiến lược điều trị mới hơn tập trung vào việc cải thiện chức năng hàng rào bảo vệ da và nhắm vào các con đường miễn dịch [17].

1.2.3.1. Hàng rào bảo vệ da bị tổn thương

Trong bệnh VDCĐ có sự giảm sản xuất filaggrin, loricrin, giảm các chất gắn kết tế bào da nên làm tăng sự mất nước, làm cho da khô. Ngoài ra hàng rào da cũng có thể bị tổn thương do các men protease của các con mạt nhà và tụ cầu vàng tiết ra [1]. Sự mất đột biến chức năng của filaggrin có liên quan đến VDCĐ nghiêm trọng do có khả năng tăng mất nước qua biểu bì, thay đổi độ pH và mất nước [18].

1.2.3.2. Yếu tố di truyền

Qua nghiên cứu người ta thấy rằng có nhiều gen liên quan đến VDCĐ, tổn thương chức năng hàng rào da, đáp ứng miễn dịch với các dị nguyên, biệt hóa tế bào biểu mô da. Một số nghiên cứu cho rằng nếu cả bố và mẹ bị VDCĐ thì có tới 80% con bị bệnh này, khoảng 50% nếu chỉ có bố hoặc mẹ bị bệnh [1].

1.2.3.3. Rối loạn miễn dịch

Mặc dù cơ chế bệnh sinh của viêm da cơ địa còn nhiều điều chưa rõ ràng, song nhiều tác giả cho rằng rối loạn điều hòa miễn dịch đóng một vai trò quan trọng trong tiến triển bệnh [1].

Sự mất cân bằng giữa các cytokine Th2 và Th1 được quan sát thấy trong viêm da dị ứng có thể tạo ra sự thay đổi trong phản ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và có thể thúc đẩy quá mẫn qua trung gian IgE [18]. Th1 và Th2 kích thích lympho B sản xuất IgE. IgE gắn trên bề mặt các tế bào mast. Các chất hóa học trung gian từ các tế bào mast (histamin là chủ yếu) sẽ được giải phóng khi có phản ứng viêm và gây ngứa [1].

1.2.3.4. Các tế bào đóng vai trò quan trọng

Tế bào trình diện kháng nguyên, Lympho T và các tế bào sừng cũng có vai trò cơ bản trong sinh bệnh học của VDCĐ [1].

1.2.3.5. Vai trò của IgE

Có tới 80% bệnh nhân VDCĐ có nồng độ IgE trong máu cao [1].

1.2.3.6. Các yếu tố khác

Một số yếu tố có liên quan tới sự xuất hiện bệnh hoặc làm bệnh nặng lên đã được các nhà nghiên cứu đã đề cập từ lâu: yếu tố thần kinh, đặc biệt là stress, thay đổi thời tiết, khí hậu, dị ứng thức ăn, dị nguyên từ không khí, chất tẩy rửa, chất bảo quản...[18].

1.2.4. Đặc điểm lâm sàng của viêm da cơ địa

Bệnh tiến triển dai dẳng, thành từng đợt cấp tính, mạn tính và có liên quan tới nhiều yếu tố như thức ăn, nhiễm trùng đường hô hấp, nhiễm trùng tại chỗ, khí hậu, rối loạn tiêu hóa.

Thường tiến triển qua các giai đoạn:

- Giai đoạn cấp tính: hay gặp ở VDCĐ ở trẻ < 2 tuổi. Tổn thương chảy nhiều nước, phù nề, da đỏ, ngứa nhiều
- Giai đoạn bán cấp: thương tổn giảm phù nề, giảm xuất tiết, khô hơn
- Giai đoạn mạn tính: hay gặp ở trẻ > 10 tuổi, khoảng 50% số trẻ không khỏi bệnh và chuyển sang giai đoạn khu trú, dai dẳng, khó điều trị và có thể tồn tại đến tuổi người lớn

Người ta chia làm 3 giai đoạn với các triệu chứng lâm sàng như sau

* Giai đoạn ấu thơ: dưới 2 tuổi.

- Thường gặp ở trẻ em 2-3 tháng tuổi.
- Vị trí: Hay gặp ở má, trán, cằm. Tuy nhiên, có thể lan ra tay, chân, lưng, bụng, ... có tính chất đối xứng.
- Triệu chứng cơ năng: ngứa nhiều.
- Thương tổn cơ bản là các mụn nước tập trung thành từng đám. Các mụn nước tiến triển qua các giai đoạn:

- + Giai đoạn tấy đỏ: da đỏ, ngứa và có các mụn nhỏ li ti như hạt kê.
- + Giai đoạn mụn nước: trên nền da đỏ xuất hiện nhiều mụn nước bằng đầu đinh ghim, tập trung thành từng đám dày đặc.
- + Giai đoạn chảy nước/xuất tiết: các mụn nước vỡ ra, chảy nước (còn gọi là “giếng chàm”). Thương tổn tấy đỏ, phù nề rất dễ bội nhiễm.
- + Giai đoạn đóng vảy: các dịch khô dần, đóng vảy tiết màu vàng nhạt. Nếu có bội nhiễm vảy dày màu nâu.
- + Giai đoạn bong vảy da: vảy tiết bong để lại lớp da mỏng, dần dần bị nứt ra bong thành các vảy da mỏng trắng. Da trở lại bình thường.

* Giai đoạn trẻ em: Từ 2-12 tuổi.

- Hay gặp nhất là từ 2-5 tuổi.
- Vị trí thương tổn: mặt duỗi hay nếp gấp như khuỷu tay, khoeo chân, cổ tay, mi mắt, thương tổn ở hai bên hoặc đối xứng.
- Triệu chứng cơ năng: rất ngứa.
- Thương tổn cơ bản là các sẩn nổi cao hơn mặt da, tập trung thành mảng hoặc rải rác. Da dày, lichen hóa. Có thể gặp các mụn nước tập trung thành đám.

* Giai đoạn thanh thiếu niên và người lớn: Trên 12 tuổi.

- Bệnh tiến triển từ giai đoạn trẻ em chuyển sang, một số khởi phát ở tuổi dậy thì, một số phát ở tuổi lớn hơn.
- Vị trí khu trú của thương tổn hay gặp ở các nếp gấp như khoeo chân, khuỷu tay, cổ tay, vùng hậu môn sinh dục, núm vú,...
- Triệu chứng cơ năng: rất ngứa.
- Thương tổn cơ bản: sẩn nổi cao hơn mặt da, rải rác hoặc tập trung thành đám. Có thể có một số mụn nước kèm theo nhiều vết xước do gãi.
- Các dạng tổn thương da hay gặp trong VDCĐ ở thời kì vị thành niên:

viêm da vùng nếp gấp, viêm da bàn tay, viêm da vùng mi mắt, lichen hóa, chàm núm vú,...[1].

1.2.5. Cận lâm sàng

- Tăng nồng độ IgE trong huyết thanh.

- Mô bệnh học: thượng bì có xốp bào xen kẽ với hiện tượng á sừng; trung bì có sự xâm nhập của bạch cầu lympho, mono, dưỡng bào, có hoặc không có các tế bào ái kiềm. Trường hợp lichen hoá có hiện tượng tăng sản thượng bì.

- Test lấy và test áp: để xác định dị nguyên [19].

1.2.6. Chẩn đoán

1.2.6.1. Chẩn đoán xác định

Theo tiêu chuẩn chẩn đoán của Hanifin và Rajka đề nghị năm 1980. Theo Hanifin và Rajka gồm 4 tiêu chuẩn chính và 23 tiêu chuẩn phụ, chẩn đoán bệnh VDCĐ phải có ít nhất 3 tiêu chuẩn chính + ít nhất 3 tiêu chuẩn phụ [1].

Bảng 1.1: Tiêu chuẩn chẩn đoán của Hanifin và Rajkia

Tiêu chuẩn chính	Tiêu chuẩn phụ
+ Ngứa + Hình thái và vị trí thương tổn điển hình: trẻ em mụn nước tập trung	1. Khô da
	2. Vảy cá thông thường
	3. Phản ứng da tức thì
	4. Tuổi phát bệnh sớm
	5. Tăng IgE huyết thanh
	6. Dễ nhiễm trùng da
	7. Viêm da bàn tay bàn chân không đặc hiệu

thành đám ở mặt, trẻ lớn và người lớn các mảng lichen hóa thường ở nếp gấp + Viêm da mạn tính + Tiền sử cá nhân hoặc gia đình bị bệnh cơ địa như: hen phế quản, viêm da mũi dị ứng, viêm da cơ địa	8. Chàm núm vú
	9. Viêm môi
	10. Viêm kết mạc tái phát
	11. Nếp dưới mi mắt của Dennie Morgan
	12. Giác mạc hình chóp
	13. Đục thủy tinh thể dưới màng bọc trước
	14. Thâm quanh mắt
	15. Ban đỏ , ban xanh ở mặt
	16. Vẩy phấn alba
	17. Nếp lằn cổ trước
	18. Ngứa khi ra mồ hôi
	19. Không chịu được len và chất hòa tan mỡ
	20. Dày sừng quanh nang lông
	21. Dị ứng thức ăn
	22. Tiến triển bệnh có ảnh hưởng bởi yếu tố môi trường và tinh thần
	23. Da vẽ nổi

1.2.6.2. Chẩn đoán phân biệt

Chàm vi trùng, viêm da dầu, viêm da tiếp xúc, ghẻ,...

1.2.7. Biến chứng

- Khoảng 70% trẻ bị viêm da cơ địa sẽ khỏi khi lớn lên. Còn lại 30% kéo dài dai dẳng.
- Khoảng 30-50% người bệnh viêm da cơ địa sẽ xuất hiện thêm các bệnh

dị ứng khác như viêm mũi dị ứng, hen phế quản [19].

- Một số biến chứng thường thấy như bội nhiễm, chàm, chốc hóa, đỏ da toàn thân, viêm da bàn tay,... 1 số trường hợp có thể gây viêm cầu thận cấp do không điều trị kịp thời [1].

1.2.8. Điều trị

Điều trị dứt điểm VDCĐ là việc làm khó hiện nay vì căn nguyên bệnh sinh rất phức tạp. Kế hoạch điều trị phải phù hợp với từng tình trạng cụ thể của từng bệnh nhân.

- Phục hồi chức năng hàng rào bảo vệ da: Làm ẩm da bằng cách dùng các sữa tắm, kem, lotion giữ ẩm da nhằm mục đích tái tạo lại lớp lipid ở thượng bì, chống mất nước qua da và làm giảm sự suy yếu chức năng hàng rào của da.

- Điều trị tại chỗ:

- + Giai đoạn cấp tính: Dung dịch Jarish đắp liên tục vào thương tổn. Nếu không có Jarish có thể dùng nước muối đẳng trương NaCl 9%.

- + Giai đoạn bán cấp: dùng các loại hồ nước, hồ Brocq, hồ/kem có corticoid

- + Giai đoạn mạn tính: dùng các loại mỡ như mỡ ichtyol, goudron, salicylat, kem có corticoid như clobetason hydrocortison, betamethason, mỡ tacrolimus 0,03 % hay 0,1 % và pimecrolimus.

- + Các thuốc làm mềm da, ẩm da: bôi thường xuyên để tránh tái phát dùng các chế phẩm steroid tại chỗ, các chế phẩm ức chế calcineurin tại chỗ. Trường hợp nặng, trợ với điều trị thông thường thì dùng thêm các trị liệu ức chế miễn dịch (cyclosporin, azathioprin,..).

- Điều trị kết hợp:

- + Kháng histamine: giảm ngứa, phototherapy: UVA, UVB dải hẹp,

các chất ức chế miễn dịch khác và chống phân bào: Cyclosporine, Azathioprin, Methotrexate hay Dupixent (dupilumab) trong điều trị VDCĐ người lớn thể vừa - nặng.

Tìm và loại trừ các yếu tố bệnh tiến triển: tư vấn người bệnh tránh các tác nhân kích thích như xà phòng, chất tẩy rửa, các thức ăn dễ dị ứng, dị nguyên đường hô hấp, kiểm chế các stress,...[1].

1.3. Viêm da cơ địa theo y học cổ truyền

Viêm da cơ địa thuộc chứng thấp chân, thấp sang, chàm,... Ngoài ra, tùy thuộc vào vị trí bị bệnh còn có tên gọi khác nhau như ở tai gọi là hoàn nhĩ sang, ở vú gọi là nhũ đầu phong, ở rốn gọi là tê phong sang, ở âm nang gọi là thận nang phong, ở vùng khoeo gọi là tứ loan phong [20].

1.3.1. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh

- Bất nội ngoại nhân:

Do bẩm thụ doanh huyết bất túc, biểu vệ không bền, phongnhiệt kiêm thấp uất nhân chỗ hư xâm phạm vào cơ phu gây vít lập doanh vệ, chèn ép tấu lý ở trong mà thành chân. Thấp uất làm khốn tỳ, lại do ăn đồ béo, ngọt, nướng, rán làm hại tỳ, làm tỳ không đảm nhận tốt chức năng vận hóa đồ ăn uống sinh thấp.

- Nội nhân:

Một số trạng thái tình chí như lo lắng, căng thẳng kéo dài... có liên quan tới khởi phát viêm da cơ địa hoặc làm bệnh nặng lên.

- Ngoại nhân:

Phong, nhiệt, thấp tà kết hợp với nhau gây bệnh [20].

1.3.2. Triệu chứng lâm sàng

Theo YHCT VDCĐ được phân làm 2 thể lâm sàng [20].

* Phong thấp nhiệt

-Triệu chứng:

Giai đoạn cấp: Thương tổn cơ bản là mụn nước nhỏ li ti tập trung thành đám trên nền dát đỏ. Mụn nước dập vỡ, xuất tiết, chảy dịch, phù nề nhiều còn gọi là “giếng chàm”.

Triệu chứng cơ năng là ngứa nhiều. Giai đoạn này điển hình ở thời kỳ trẻ em < 2 tuổi.

Giai đoạn bán cấp: Giảm phù nề, giảm xuất tiết, bắt đầu đóng vảy tiết. Vị trí đối xứng hai bên: Má, cằm, nặng lan ra tay chân, thân mình. Toàn thân tâm phiền, miệng khát, đại tiện táo, tiểu tiện ít và đỏ, rêu lưỡi vàng nhầy, mạch hoạt sác. Trường hợp thấp nặng thì chán ăn, người mệt mỏi, mạch huyền hoạt.

- Pháp điều trị: Thanh nhiệt lợi thấp, lương huyết giải độc.

* Huyết hư phong táo

-Triệu chứng:

Thể này hay gặp ở giai đoạn viêm da cơ địa mạn tính: Thương tổn cơ bản là các sản phẩm bố tập trung thành mảng hay rải rác kèm theo dày da, lichen hoá, các vết xước, nứt đau sác da thâm, đây là hậu quả của việc bệnh nhân ngứa gãi nhiều. Thương tổn hay gặp ở các nếp gấp lớn, lòng bàn tay, bàn chân, các ngón, cổ, gáy, cổ tay, cẳng chân.

Toàn thân chất lưỡi nhợt, rêu lưỡi trắng, mạch trầm tế hoặc trầm hoãn. Tình trạng này do bệnh lâu ngày làm hao tổn âm huyết, huyết hư phong táo gây nên bệnh.

- Pháp điều trị: Khu phong, dưỡng huyết, nhuận táo [20].

1.3.2. Điều trị viêm da cơ địa theo y học cổ truyền

*Phong thấp nhiệt

Thuốc uống trong:

Bài 1: Thổ phục linh 16g, Nhân trần 20g, Khổ sâm 12g, Kim ngân 16g, Hoàng bá nam 12g, Hạ khô thảo 12g, Ké đầu ngựa 12g, Hoạt thạch 8g.

Bài 2: Thanh nhiệt hóa thấp thang gia giảm:

Hoàng cầm 12g, Hoàng bá 12g, Bạch tiền bì 12g, Phục linh bì 12g, Hoạt thạch 20g, Khổ sâm 12g, Sinh địa 20g, Ngân hoa 20g, Đạm trúc điệp 20g.

Thuốc dùng ngoài:

Giai đoạn cấp, khi bệnh mới phát chỉ đỏ tại chỗ, sẩn và mụn nước chưa vỡ, chưa xuất tiết: Lô cam thạch, dung dịch 2% băng phiến.

Khi các mụn nước đã vỡ và xuất tiết nhiều thì nên dùng các thuốc thu liễm, tiêu viêm. Sắc lấy nước đặc, đắp ướt các thuốc sau: Rau sam 60g, Hoàng bá, Sinh địa mỗi vị 30g, Bồ công anh, Long đởm thảo, Cúc hoa mỗi vị 30g [20].

Khi có bội nhiễm có thể thêm vào nước đắp các vị Xuyên tâm liên, Sài đất. Khi xuất tiết nhiều dùng Tam diệp tán (Hoàng bá, Ngưu tất, Thương truyệt) hoặc Trừ thấp tán (Đại hoàng 30g, Hoàng cầm 30g, Hàn thạch thủy 30g, Thanh đại 3g) trộn với Glycerin thành cao lỏng rồi bôi lên tổn thương [7].

Giai đoạn bong vảy: Cao thanh lương (Đương quy 30g, Tử thảo 6g, Đại hoàng 5g, Dầu thực vật 480g, Sáp ong 120g). Hoặc cao Hoàng liên: Hoàng liên 20g, Vaseline 80g [20].

Giai đoạn bán cấp: với nguyên tắc tiêu viêm, trừ ngứa, thu liễm có thể dùng mỡ oxyd kẽm. Trừ thấp tán hay Tân diệp tán luyện với dầu thực vật thành cao, dầu tử thảo 5%, dầu địa du-oxyd kẽm 10% [7].

* Huyết hư phong táo

Thuốc uống trong

Bài 1: Tứ vật tiêu phong ẩm gia giảm

Thực địa, Sinh địa, Kinh giới đều 16g, Đương quy, Bạch thược, Thương truật, Phòng phong, Địa phu tử đều 12g, Khô sâm, Thuyền thoại, Bạch tiên bì, Bạch tật lê đều 8g. Sắc uống.

Bài 2: Tứ vật thang hợp Tỳ giải thẩm thấp thang gia giảm

Đương quy, Sinh địa, Bạch thược, Xuyên khung, Kinh giới, Phòng phong, Thuyền thoại, Tỳ giải, Ý dĩ, Trạch tả, Hoạt thạch, Thông thảo. Gia giảm: bệnh phát ở đầu mặt gia Bạch chỉ, Cảo bản. Bệnh ở thân mình gia Ngưu tất, Đỗ trọng. Bệnh phát ở tứ chi gia Quế chi, Độc hoạt. Ngứa nhiều gia Khô sâm, Bạch tiền bì [20].

Thuốc dùng ngoài

Với nguyên tắc là điều trị ngứa, ức chế tăng sinh của biểu bì, tiêu trừ tình trạng viêm nhiễm trong lớp chân bì. Dùng Cao hoàng liên gồm Hoàng liên 20g, vaselin 80g hoặc Cao dầu đậu đen 10%-20% [7].

1.4. Tổng quan một số nghiên cứu về điều trị viêm da cơ địa bằng thuốc Y học cổ truyền

1.4.1. Trên thế giới

Trên thế giới có nhiều nghiên cứu về hiệu quả của các vị thuốc YHCT với bệnh VDCĐ cả về đường uống và đường bôi.

Theo Sheehan và cộng sự (1992) đánh giá hiệu quả của thảo dược truyền thống với VDC [21].

Theo Fenggen Yan và cộng sự (2020) công thức và hoạt chất sinh học của thuốc YHCT điều trị VDCĐ [22].

Theo Yuan-Cui Meng và cộng sự (2022) đánh giá hiệu quả của kem dưỡng da từ Lô cam thạch như một liệu pháp bổ trợ cho thuốc mỡ mometasone furoate trong điều trị VDCĐ ở trẻ sơ sinh [23].

Theo Beom-Chan Park và cộng sự (2021) đánh giá tác dụng của Cao Hoàng liên, Cam thảo và chiết xuất Glycine max với bệnh VDCĐ [24].

Theo Yunlong Chen và cộng sự (2016) đánh giá tác dụng chống viêm, chống dị ứng và cơ chế cơ bản của chiết xuất Hoàng liên giải độc thang trong viêm da cơ địa, gồm các thành phần: Hoàng liên, Hoàng cầm, Hoàng bá, Chi tử [25].

Theo Seon Gyeong Bak và cộng sự (2023) đánh giá tác dụng của chiết xuất Đậu đen và hợp chất của nó hemiphloin chống VDCĐ như viêm da dị ứng [26].

1.4.2. Việt Nam

Tại Việt Nam, tuy chưa có có nhiều nghiên cứu về thuốc YHCT trong viêm da cơ địa nhưng các thầy thuốc luôn kết hợp nhuần nhuyễn, kế thừa giữa bài thuốc cổ phương và những nghiên cứu ở nước ngoài trong điều trị viêm da cơ địa để đạt kết quả cao.

Bài thuốc Tứ vật tiêu phong ẩm gồm các vị có tác dụng thanh nhiệt, dưỡng huyết, khu phong, trừ thấp cho kết quả khỏi 5%, đỡ 82,5% và không kết quả 12,5% với bệnh nhân VDCĐ theo tác giả Nguyễn Thị Phương 2015 [27].

Vị thuốc Long đờm thảo có vai trò chống viêm cấp và mạn theo đường toàn thân và tại chỗ với bệnh VDCĐ theo Đỗ Thị Kim Chung 2012 [28].

1.5. Tổng quan về bài thuốc chế phẩm TAD

Những vị thuốc có trong chế phẩm TAD là bài thuốc theo kinh nghiệm của khoa Da liễu - bệnh viện Y học cổ truyền Trung Ương rút ra từ quá trình điều trị lâm sàng trong khoảng 10 năm cho kết quả giảm ngứa các bệnh như viêm da cơ địa hiệu quả. Với tác dụng thanh nhiệt, trừ thấp, giải độc theo y học cổ truyền và tác dụng kháng khuẩn, chống viêm hiệu quả từ nghiên cứu

của từng vị thuốc như sau.

1.5.1. Hoàng bá

Tên vị thuốc: *Cortex Phellodendri* (vỏ thân và vỏ cành đã cạo bỏ lớp bần, phơi hay sấy khô)



Hình 1.1. Hoàng bá

Hoàng bá có tính khổ hàn vào kinh thận, bàng quang. Có công năng là thanh nhiệt táo thấp, tư âm giáng hỏa, giải độc nên chủ trị các chứng mụn nhọt lở ngứa [29].

Hoàng bá có thể đắp chữa các bệnh ngoài da, mụn nhọt [30]

Trên thế giới, tại Trung Quốc, 1 số loại kem bôi ngoài da được sử dụng trong viêm da cơ địa như PHF với các vị thuốc: Hoàng bá, Kim ngân hoa, Đan bì, Bồ hoàng, Bạch truật với tác dụng làm giảm tình trạng viêm da dị ứng [31], [32]. Một thành phần hoạt chất khác của Hoàng bá, berberine, gần đây đã được chứng minh là làm giảm chứng viêm dị ứng trên mô hình chuột bị viêm mũi dị ứng do bụi nhà gây ra [33].

Bài thuốc Tiểu hoàng cao theo Thảm Thị Tôn Sinh Thư gồm các vị: Đại hoàng, Hoàng bá, Hoàng cầm lượng bằng nhau dùng điều trị các bệnh tổn thương viêm da, đỏ da [34]. Bài thuốc Tam diệp tán cũng có Hoàng bá có tác dụng trong bệnh viêm da cơ địa, chàm [15].

Hoàng bá còn là một trong các vị thuốc ngăn chặn sự giải phóng các chất trung gian gây viêm từ tế bào mast, một trong những tác nhân gây viêm và ngứa ở VDCĐ [21]. Nhiều thí nghiệm chứng minh tác dụng khác sinh của hoàng bá, dịch chiết bằng cồn ức chế các vi trùng *Staphylococcus*, *ly*, *salmonella* [29],[30].

1.5.2. Đại hoàng

Tên vị thuốc: *Rhizoma Rhei* (thân rễ đã cạo bỏ vỏ phơi hoặc sấy khô).

Họ rau răm



Hình 1.2. Đại hoàng

Đại hoàng tính khô, hàn vào các kinh tỳ, vị, đại tràng, can, tâm bào [29].

Cây đại hoàng thuộc loại cây thuốc của y học dân gian Việt Nam kết hợp với một số cây thuốc khác làm thang thuốc chữa được nhiều loại bệnh. Ở Việt Nam đã chiết xuất được axit chrysophanic từ cây Đại hoàng để điều chế ra cream chrysophanic có khả năng chống nấm [35]. Đại hoàng còn có tác dụng diệt khuẩn *staphylococcus* và chữa hắc lào với công thức Đại hoàng 10, dấm 5ml, rượu 50ml ngâm trong 10 ngày bôi lên các vết hắc lào đã rửa sạch [29]. Bài thuốc Đại hoàng thang gồm Đại hoàng, Quế chi, Đào nhân nghiền nhỏ sấp nước đắp tổn thương vẩy nến [36].

Trên thế giới, đặc biệt là Trung Quốc từ rễ cây đại hoàng, các nhà khoa

học đã phân lập được 5 hợp chất hydroxyanthraquinon có khả năng chống vi khuẩn [35]. Đại hoàng, Chi tử, Thăng ma, Nhân sâm được áp dụng vào việc điều trị vẩy nến, hỗ trợ giảm các triệu chứng nóng, khô da. Hơn nữa, các hợp chất chính từ các loại dược liệu này được biết là có hoạt tính chống viêm, chống viêm da dị ứng [12],[32],[37],[38],[39].

Đại hoàng có tác dụng kháng khuẩn với tụ cầu, liên cầu, song cầu khuẩn lậu và ức chế nấm gây bệnh. Thành phần ức chế vi khuẩn chủ yếu là dẫn chất của anthraquinone. Emodin là một anthraquinon tự do có trong Đại hoàng, Emodin có tác dụng lên màng sinh học, có ái lực cao với các màng phospholipid vì thế có khả năng kháng virus, vi khuẩn [40],[41],[42].

1.5.3. Hoàng đằng

Tên vị thuốc: *Caulis et Radix Fibraureae* (thân và rễ đã phơi hay sấy khô). Họ Tiết dê.



Hình 1.3 : Hoàng đằng

Hoàng đằng tính khổ hàn vào kinh tâm, can, đờm, vị. Có công năng thanh nhiệt tiêu viêm, lợi thấp, giải độc nên chủ trị chứng mụn nhọt mẩn ngứa [16].

Trong Hoàng đằng có hoạt chất là alkaloid trong đó thành phần chính là palmatin hàm lượng từ 1-3%. Palmatin ở dạng clorid có tác dụng ức chế với tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus*) và liên cầu khuẩn (*Streptococcus*) [43].

1.5.4. Ké đầu ngựa

Tên vị thuốc: *Fructus Xanthii strumarii* (quả và toàn bộ phần trên mặt đất cây).



Hình 1.4. Ké đầu ngựa

Ké đầu ngựa có tính tân, khô, ôn, vào kinh phế. Có công năng tiêu độc nên chủ trị: mụn nhọt, mẩn ngứa [29].

Sesquiterpenoid là thành phần có trong Ké đầu ngựa có nhiều chức năng sinh học và tác dụng dược lý quan trọng như chống vi khuẩn, chống vi rút, chống khối u và chống viêm [44],[45].

Một nghiên cứu của Sato và cộng sự năm 1997 đã chỉ ra rằng hợp chất xanthatin được phân lập từ lá của Ké đầu ngựa cho thấy tiềm năng chống lại mạnh mẽ các loài *Staphylococcus aureus*, bao gồm cả *S. aureus* kháng methicillin và một số vi khuẩn khác như *Staphylococcus cholerae*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Salmonella typhi* [46]. Sau đó, A Devkota và RK Das nghiên cứu chỉ ra chiết xuất methanol của lá cây Ké đầu ngựa có khả năng kháng sáu loại vi khuẩn gây bệnh, ba gram âm: *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* và ba gram dương: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ở các nồng độ khác nhau (50 mg/ml, 100 mg/ml, 150

mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml). Những phát hiện này cho thấy Ké đầu ngựa có tiềm năng phát triển thành thuốc kháng khuẩn [47].

Tác dụng chống nấm của Ké đầu ngựa cũng đã được các nhà khoa học tiến hành nghiên cứu chuyên sâu. Năm 2002, Kim và cộng sự đã tìm thấy một thành phần chống nấm từ Ké đầu ngựa, được đặt tên là deacetyl-xanthumin [48]. Năm 2016, Parveen và các cộng sự đã thực hiện phân tách các thành phần từ lá Ké đầu ngựa bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ và thu được các hợp chất có khả năng chống nấm như: β -caryophyllen (17.53%), α -cadinol (6.66%), spathulenol (6.09%), limonen (5.66%) và 1,3,5-trimethyl-2[2-nitroallyl] benzen (3.29%). Các chất này cho thấy tác dụng ức chế tăng trưởng đáng chú ý với một số chủng nấm như: *A. Niger*, *Aspergillus flavus*, *F. oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* và *Penicillium digitatum* với giá trị nồng độ kiểm khuẩn tối thiểu MIC và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu MBC là 8 μ g/mL [49].

1.5.5. Khổ sâm

Tên vị thuốc: *Folium et Ramulus Crotonis tonkinensis* (lá và cành đã được phơi hoặc sấy khô). Họ Thầu dầu.



Hình 1.5. Khổ sâm

Khô sâm vị đắng hơi ngọt, chát và tính mát, quy vào kinh can, đại trường. Có công năng thanh nhiệt, tiêu độc, sát trùng. Chủ trị các chứng ung nhọt, lở loét ngoài da [29].

Trong bài thuốc cổ phương Tiêu phong tán hay Long đờm tả can thang điều trị Viêm da cơ địa thể thấp nhiệt, trong đó Khô sâm là vị thuốc góp phần vào tác dụng của bài thuốc [34].

Theo TS. Trương Như Vân và các cộng sự [50], hoạt chất lá khô sâm chủ yếu thuộc các lớp flavonoit và ancaloit, trong đó nhóm flavonoit có tác dụng kháng khuẩn. Tại phòng thử nghiệm hoạt tính sinh học Viện khoa học và công nghệ Việt Nam, người ta tìm thấy trong khô sâm có chất kháng nấm *Candida albicans* [51].

1.5.6. Lá móng

Tên khoa học: *Folium Lawsoniae* (lá tươi hoặc đã phơi hay sấy khô).
Họ Tử vi



Hình 1.6. Lá móng

Lá móng hơi chát, tính ấm vào kinh can, thận. Chủ trị các chứng sang lở, mụn nhọt, hắc bào, nấm móng tay, nấm móng chân, ngứa [29].

Chiết xuất ethanol của lá móng có tác dụng kháng khuẩn, chống lại *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Sal.paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa*,

và *Staphylococcus aureus*, với giá trị MIC lần lượt là 800, 1200, 1600, 4000 và 1200 mg/ml [52].

Cao côn và lawson chiết từ lá móng có tác dụng kháng sinh, chống viêm. Ở trạng thái tươi, lá móng chứa các Heterosid khi thủy phân cho chất Lawson với hàm lượng khoảng 1%, có tác dụng kháng sinh rất mạnh [53].

1.6. Một số mô hình nghiên cứu về tính kích ứng da, kháng khuẩn, chống viêm, giảm ngứa

1.6.1. Tính kích ứng da

Để bảo vệ người tiêu dùng khỏi các tác dụng phụ không mong muốn hoặc thậm chí là tổn hại nghiêm trọng đến sức khỏe, tất cả các thành phần hóa học của cái gọi là sản phẩm tiêu dùng phải trải qua quá trình đánh giá độc tính mở rộng. Da người là nơi tiếp xúc đầu tiên với nhiều loại hóa chất. Do đó, các phương pháp thử nghiệm trong ống nghiệm, nhằm mục đích xác định đáng tin cậy các phản ứng của hóa chất gây kích ứng với mô da, đã được phát triển. Kể từ năm 2009, chỉ các thử nghiệm trong ống nghiệm mới được phép thực hiện ở Liên minh Châu Âu để chứng minh tính an toàn của các thành phần mỹ phẩm mới cho da (EU, 2009). Trong thập kỷ qua, các mô hình da ba chiều mô phỏng chặt chẽ lớp biểu bì bản địa của con người về mặt kiến trúc và sinh lý mô đã được công nhận là công cụ phù hợp để thử nghiệm nhiều loại hóa chất khác nhau. Tuy nhiên, việc xác nhận và chấp thuận của các tổ chức như EURL-ECVAM và OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) là bắt buộc đối với bất kỳ phương pháp thử nghiệm trong ống nghiệm nào trước khi được sử dụng trong khuôn khổ Quy định mỹ phẩm EU (EC) số 1223/2009 (EU, 2009).

Phiên bản mới nhất của OECD TG 439 liệt kê 4 phương pháp thử nghiệm in vitro có sẵn trên thị trường để thử nghiệm kích ứng da, dựa trên các chất tương đương biểu bì khác nhau, đã trải qua quá trình xác nhận chính

thức: các mô hình EpiSkin và EpiDerm, Skin Ethic RHE và LabCyte EPI-MODEL24SIT.

Một số mô hình biểu bì tinh khiết khác – Sterlab Epidermis, StratiCELL RHE, epiCS (trước đây là EST-1000) và KeraSkin -VM cũng đã có mặt trên thị trường, mặc dù vẫn chưa có sự chấp thuận chính thức về mặt quy định dựa trên nghiên cứu xác nhận về thử nghiệm kích ứng da [54].

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng OECD 2015 để đánh giá tính kích ứng da của Chế phẩm TAD.

1.6.2. Tính kháng khuẩn

Có rất nhiều phương pháp để thử hoạt tính kháng khuẩn đã được áp dụng trên thế giới, tuy nhiên không phải phương pháp nào cũng phù hợp để thử hoạt tính của dịch chiết dược liệu. Một số phương pháp phù hợp để thử hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết thực vật được đề cập sau đây:

Phương pháp khuếch tán đĩa thạch (Agar disk- diffusion method): Phương pháp khuếch tán đĩa thạch được phát triển vào năm 1940, là phương pháp quan trọng được sử dụng thường quy trong nhiều phòng thí nghiệm vi sinh để kiểm tra tính nhạy cảm kháng sinh. Các chất thử có hoạt tính từ khoanh giấy sẽ khuếch tán vào thạch và ức chế sự phát triển của vi sinh vật thử nghiệm. Đọc kết quả bằng cách đo đường kính vòng ức chế vi khuẩn.

Phương pháp khuếch tán giếng thạch (Agar well diffusion method): Đây là phương pháp được sử dụng rộng rãi để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của thực vật hoặc chiết xuất từ vi sinh vật. Nguyên tắc: Đầu tiên, các đĩa thạch petri được cấy chủng vi sinh vật trên bề mặt, sau đó đục lỗ, nhỏ dịch thử vào giếng và ủ ở điều kiện thích hợp.

Phương pháp pha loãng: Phương pháp pha loãng là phương pháp thích hợp nhất để xác định giá trị MIC (nồng độ ức chế tối thiểu). Có thể sử dụng

phương pháp pha loãng thạch hoặc môi trường để định lượng hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm in vitro.

Pha loãng thạch (Agar dilution method): Kỹ thuật này thích hợp cho cả thử nghiệm tính kháng khuẩn và kháng nấm. Nguyên tắc: Trộn chất kháng khuẩn với các nồng độ khác nhau vào môi trường thạch đang chảy lỏng (thường sử dụng các mẫu thử pha loãng hai lần liên tiếp). Sau khi thạch đông lại, cấy vi sinh vật lên bề mặt đĩa thạch và ủ ở điều kiện thích hợp. Điểm cuối MIC được ghi nhận là nồng độ chất kháng khuẩn thấp nhất ức chế hoàn toàn sự phát triển vi sinh vật trong điều kiện ủ thích hợp.

Pha loãng môi trường (Broth dilution method): Nếu phương pháp pha loãng được thực hiện trên các đĩa thạch thì phương pháp pha loãng môi trường thường sử dụng đĩa 96 giếng hoặc ống nuôi cấy tế bào. Các mẫu thử được pha loãng dần (thường là 2 lần) trên đĩa 96 giếng hoặc ống nuôi cấy tế bào, sau đó mỗi giếng hoặc ống được thêm cùng một lượng vi sinh vật đã hoạt hóa và có độ đục tương 0.5 McFarland [55].

1.6.3. Tính chống viêm, giảm ngứa

Một số mô hình động vật gây viêm cấp tính

Phù chân do Carrageenan gây ra: Mô hình phù nề bàn chân do carrageenan gây ra được sử dụng rộng rãi để đánh giá hoạt động chống viêm của một số hợp chất tự nhiên và tổng hợp. Đây là mô hình đặc biệt của tình trạng viêm cấp tính có khả năng tái tạo cao hơn. Carrageenan là tác nhân gây viêm không kháng nguyên và không có bất kỳ tác dụng toàn thân nào có thể nhìn thấy.

Phù chân do Histamine/5-HT gây ra: Các mô hình viêm bàn chân do histamine và 5-HT gây ra được sử dụng để sàng lọc nhiều hợp chất chống viêm khác nhau. Histamine là chất trung gian quan trọng của tình trạng viêm

cấp tính. Histamine và 5-HT thúc đẩy tính thấm của mạch máu và hoạt động với prostaglandin để gây viêm.

Phù chân do Bradykinin gây ra: Phù chân do bradykinin gây ra một phần được trung gian bởi prostaglandin.

Phù chân do Dextran: Mô hình phù nề bàn chân do dextran gây ra liên quan đến tính thấm mạch máu tăng lên, hoạt hóa kinin, giải phóng các chất trung gian như histamine và serotonin, phát triển phù nề thâm thấu có lượng bạch cầu trung tính và protein tối thiểu.

Phù chân do Lipopolysaccharide (LPS) gây ra: LPS được biết là gây ra sự gia tăng theo thời gian trong biểu hiện TNF- α , IL-1 β và hoạt động của myeloperoxidase ở bàn chân chuột.

Phù tai do axit Arachidonic: Mô hình viêm tai có giá trị trong việc đánh giá tiềm năng chống viêm của các hợp chất tổng hợp và chiết xuất thảo dược. Phù tai chuột do axit arachidonic gây ra được tạo điều kiện thuận lợi bởi các chất chuyển hóa axit arachidonic như prostaglandin E₂ (PGE₂) và leukotriene C₄ (LTC₄).

Dầu Croton/TPA gây phù tai: Phù tai do dầu cây khô sâm hoặc chất gây kích ứng chính của nó là 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) đã được sử dụng rộng rãi để đánh giá hoạt động chống viêm của thuốc chống viêm steroid và không steroid. Viêm tai do TPA gây ra là mô hình viêm da hữu ích cho việc đánh giá các hợp chất chống viêm toàn thân và tại chỗ. Hơn nữa, tác dụng gây viêm của TPA được thúc đẩy bởi sự kích thích của protein kinase C, sau đó kích hoạt các enzyme khác như protein kinase hoạt hóa mitogen (MAPK) và phospholipase A₂. Các chất ức chế COX, LOX và PLA₂ cùng với corticoid có khả năng ngăn chặn tình trạng viêm xảy ra sau khi bôi TPA tại chỗ. Trong nghiên cứu này chúng tôi cũng lựa chọn mô hình này để đánh giá tính chống viêm của chế phẩm TAD.

Phù tai do Oxazolone gây ra: Oxazolone là chất gây dị ứng được sử dụng thường xuyên nhất để khởi phát quá mẫn cảm loại chậm (DTH). Oxazolone làm tăng tế bào lympho T CD8⁺ và gây nhạy cảm da. Việc sử dụng oxazolone tại chỗ dẫn đến tăng các chất chuyển hóa arachidonate như prostaglandin và leukotriene trong mô.

Axit axetic/Compound 48/80-Tính thấm mạch máu được tạo ra: Xét nghiệm này được sử dụng để nghiên cứu hoạt động ức chế của thuốc chống lại tính thấm mạch máu tăng lên do các tác nhân gây viêm như axit axetic và hợp chất 48/80. Hợp chất 48/80 là chất giải phóng hạt của tế bào mast và là chất hoạt hóa mạnh giải phóng histamine [56].

Một số mô hình giảm ngứa

Ngứa là một đặc điểm chung của nhiều rối loạn về da, trong đó có VDCĐ. Vì cơ chế sinh bệnh của nó phần lớn chưa được biết đến nên chưa có phương pháp điều trị thích hợp. Việc phát triển các phương pháp điều trị mới bị cản trở do thiếu mô hình động vật để nghiên cứu ngứa (Woodward và cộng sự, 1985). Ku- raishi và cộng sự, (1995) đã đề xuất rằng các tác nhân gây ngứa nhưng không gây đau kích thích hoạt động gãi ở chuột. Việc gãi thường được ghi lại bằng cách đếm số lần gãi từ quan sát trực tiếp bằng mắt hoặc từ bản ghi video (Gmerek và Cowan, 1983; Larsen và cộng sự, 1994; Thomas và cộng sự, 1994). Elliott và cộng sự, (2000) đã phát triển một phương pháp cho phép tự động ghi lại hoạt động gãi ở chân sau của chuột trong thời gian dài hơn 24 giờ.

Sau nhiều năm thì phương pháp đánh giá đã có nhiều thay đổi.

Inagaki và cộng sự (2002, 2003) đã sử dụng thiết bị mới, MicroAct, để nghiên cứu các cơ chế trong việc gây ra hành vi cào xước ở chuột BALB/c bằng hợp chất 48/80. Một số tác giả đã sử dụng mô hình hành vi gãi do hợp chất 48/80 gây ra ở chuột. Sugimoto và cộng sự (1998) đã nghiên cứu tác

động của chất đối kháng thụ thể histamine H1 đến hành vi gãi do hợp chất 48/80 gây ra ở chuột. Rojavin và cộng sự (1998) đã nghiên cứu tác dụng chống ngứa của sóng milimet ở chuột được điều trị bằng hợp chất 48/80. Inagaki và cộng sự (2002) đã nghiên cứu cơ chế gây ra hành vi gãi ở chuột BALB/c bằng hợp chất 48/80. Shinmei và cộng sự (2004) đã nghiên cứu tác dụng của keo ong Brazil đối với hành vi gãi do hợp chất 48/80 và histamine gây ra ở chuột. Trong nghiên cứu này chúng tôi cũng sử dụng compound 48/80 để đánh giá tính giảm ngứa của chế phẩm TAD.

Ngoài ra, Umeuchi và cộng sự (2005) đã thử nghiệm hành vi gãi tự phát ở chuột MRL/lpr, một mô hình có thể gây ngứa trong các bệnh tự miễn. Hansson và cộng sự (2002) đã mô tả một mô hình viêm da ngứa mãn tính ở chuột chuyển gen có biểu hiện quá mức enzym chymotryptic ở lớp sừng [57].

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chất liệu nghiên cứu

2.1.1. Chế phẩm làm nghiên cứu

Chế phẩm TAD

Thành phần 250ml chứa: Đại hoàng, Hoàng bá, Hoàng đằng, Ké đầu ngựa, Lá móng, Khô sâm.

Cao toàn phần chiết xuất tại Khoa Dược – Bệnh viện Y học cổ truyền Trung Ương đạt tiêu chuẩn cơ sở và Dược điển Việt Nam V [29]. Dược bào chế dưới dạng cao lỏng, có màu nâu đen, mùi thơm dược liệu. Gồm các loại dược liệu sau với tỉ lệ 1:1:1:1:1:1:

Hoàng bá	<i>Cortex Phellodendri</i>	DĐVN V
Đại hoàng	<i>Rhizoma Rhei</i>	DĐVN V
Hoàng đằng	<i>Caulis et Radix Fibraureae</i>	DĐVN V
Ké đầu ngựa	<i>Fructus Xanthii strumarii</i>	DĐVN V
Khô sâm	<i>Folium et Ramulus Crotonis tonkinensis</i>	DĐVN V
Lá móng	<i>Folium Lawsoniae</i>	DĐVN V

2.1.2. Thuốc, hoá chất, máy móc phục vụ nghiên cứu

2.1.2.1. Nghiên cứu tính kích ứng da

- Tông đơ điện.
- Kéo, pank.
- Cốc thủy tinh, ống đong thủy tinh chia vạch.
- Băng, gạc vô trùng.
- Kính lúp.

2.1.2.2. Nghiên cứu tính kháng khuẩn

- Nước cất công thức H₂O theo tiêu chuẩn ĐĐVN V

Bảng 2.1. Bảng thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

STT	Thiết bị	Model/ xuất xứ
1	Cân phân tích	Sartorius – BP121S – Đức
2	Nồi hấp tiệt trùng	HIRAYAMA HV -110
3	Tủ ấm	FROILABO BC 120
4	Tủ cấy vi sinh	CLEAN BENCH
5	Tủ lạnh	Panasonic
6	Tủ sấy	Memmert ULE 600
7	Ống MacFaland	bioMerieux – Mỹ

Bảng 2.2. Bảng dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu

STT	Dụng cụ	STT	Dụng cụ
1	Bình định mức 100ml	8	Nhiệt kế
2	Bình tam giác	9	Ống nghiệm
3	Bông không thấm nước	10	Phễu thủy tinh
4	Cốc thủy tinh 100ml, 250ml	11	Pipet vạch, pipet bầu, micro pipet
5	Đèn cồn	12	Que cấy vi khuẩn
6	Đĩa Petri	13	Que trang thủy tinh
7	Đũa thủy tinh	14	Thước đo

Bảng 2.3. Hóa chất, dung môi

STT	Hóa chất/dung môi	Công thức	Tiêu chuẩn
1	Nước cất	H ₂ O	ĐĐVN V

2.1.2.3. Nghiên cứu tính chống viêm, giảm ngứa

- Clobetason propionat 0,05%, biệt dược Eumovate (Glaxo Operations UK., LTD, Anh)
- Compound 48/80 lọ 250 mg (Sigma-Aldrich, Đức)
- Croton oil (Sigma-Aldrich, Đức)
- Dung dịch acetone (Xilong, Trung Quốc)
- Dung dịch NaCl 0,9%
- Đồng hồ bấm giờ

2.2. Đối tượng nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu tính kích ứng da

Thỏ trưởng thành (*Oryctolagus cuniculus* L.), tổng số 06 con, cân nặng trung bình $2,1 \pm 0,2$ kg, 2 tháng tuổi, khỏe mạnh, không phân biệt đực - cái, do Trung tâm nghiên cứu dê và thỏ Sơn Tây cung cấp. Động vật cái không mang thai, không nuôi con bú và chưa sinh sản lần nào. Động vật được nuôi ổn định 5 ngày trong điều kiện thí nghiệm trước khi tiến hành nghiên cứu.

2.2.2. Đối tượng nghiên cứu tính kháng khuẩn

2.2.2.1. Chủng vi khuẩn

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Streptococcus mutans ATCC 35668

Nguồn gốc: Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

2.2.2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường Casein đậu tương lỏng

Bảng 2.4. Môi trường casein đậu tương lỏng

Thành phần	Khối lượng
Pancreatic digest of casein	17,0 g/l
Enzymatic digest of soya bean	3,0 g/l

NaCl	5,0 g/l
Dipotassium hydrogen phosphate	2,5 g/l
Glucose	2,5g/l
pH 7,3	

Môi trường Thạch dinh dưỡng

Bảng 2.5. Môi trường Thạch dinh dưỡng

Thành phần	Khối lượng
Peptone	6,0 g/l
Beef Extract	1,0 g/l
Yeast Extract	2,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Agar	14,0 g/l
pH 7,3	

Môi trường Mueller – Hinton

Bảng 2.6. Môi trường Mueller - Hinton

Thành phần	Khối lượng
Acid Digest of Casein	17,5 g/l
Beef Extract	2 g/l
Starch	1,5 g/l
NaCl	5,0 g/l
Agar	17 g/l
pH 7,3	

2.2.3. Đối tượng nghiên cứu tính chống viêm, giảm ngứa

- Chuột nhất trắng, chủng Swiss, cả hai giống, khỏe mạnh, trọng lượng $20 \pm 2g$, do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

- Động vật được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm với đầy đủ thức ăn và nước uống tại Bộ môn Dược lý - Trường Đại học Y Hà Nội.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nghiên cứu tính kích ứng da của chế phẩm TAD

Mô hình nghiên cứu được thiết kế và tiến hành dựa trên hướng dẫn của OECD 401 - Organisation for Economic Co-operation and Development: Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế về việc đánh giá kích ứng da dành cho các sản phẩm dược phẩm và mỹ phẩm dùng ngoài da [58] và Liên minh Châu Âu [59].

Quy trình nghiên cứu:

- Thỏ được nuôi trong lồng riêng, cho ăn bằng chế độ ăn riêng, giữ ở nhiệt độ phòng trong vòng 5 ngày trước khi tiến hành nghiên cứu.

- Trước thí nghiệm, làm sạch lông thỏ ở vùng bên sườn một khoảng đủ rộng để đặt các mẫu thử và đối chứng (khoảng 10 x 15 cm). Chỉ những thỏ có da khỏe mạnh, đồng đều và lạnh lặn mới được dùng vào thí nghiệm (hình 2.1 và 2.2).

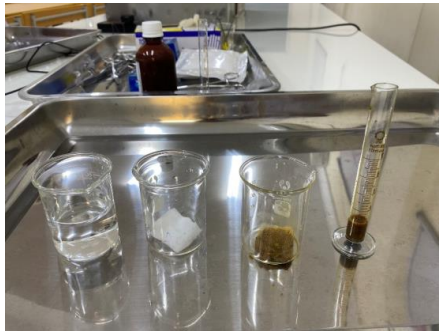


Hình 2.1: Cạo lông thỏ



Hình 2.2: Chọn thỏ có da lạnh lặn

- Cắt các miếng gạc vô trùng với kích thước 2,5 x 2,5 cm từ miếng gạc lớn ban đầu có độ dày 2 mm. Tẩm mỗi miếng gạc với 2,0 ml Chế phẩm TAD. Mỗi miếng gạc chứa 2,0 g dược liệu. Mỗi thỏ đều có vùng da bên sườn đặt 1 miếng gạc Chế phẩm TAD và bên cạnh đó đặt 1 miếng gạc tẩm nước cất, cách nhau 2 cm.



Hình 2.3: Chuẩn bị mẫu thử đặt lên da thỏ **Hình 2.4: Đặt mẫu thử lên da thỏ**
da thỏ

- Đắp những miếng gạc có kích thước 2,5 x 2,5cm (diện tích 6 cm²) lên cả hai phần bôi thuốc và phần dùng làm chứng [59].

- Đặt trên da thỏ ở một bên sườn 1 miếng gạc tẩm mẫu thử và bên cạnh là 1 miếng gạc tẩm nước cất (hình 2.4). Cố định miếng gạc bằng băng dính không gây kích ứng da và gạc trong 24 giờ (hình 2.5, 2.6). Tại mỗi thời điểm quan sát, bỏ gạc và băng dính, dùng nước cất lau nhẹ để làm sạch mẫu thử còn lại trên da.



Hình 2.5: Đặt mẫu thử lên da thỏ **Hình 2.6: Băng cố định miếng dán**

- Quan sát và ghi điểm phản ứng trên chỗ da đặt chất thử so với da không đặt chất thử ở các thời điểm 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ và 24 giờ sau khi làm sạch mẫu thử. Đánh giá phản ứng trên da ở các mức độ gây ban đỏ, phù nề theo qui định.

- Ban đỏ trên da:

Bảng 2.7. Bảng đánh giá ban đỏ trên da thử

Không có ban đỏ	0 điểm
Có ban đỏ rất nhẹ (vừa đủ nhận thấy)	1 điểm
Ban đỏ nhận thấy rõ	2 điểm
Ban đỏ vừa phải đến nặng	3 điểm
Ban đỏ nghiêm trọng (đỏ tấy) đến tạo thành vảy	4 điểm

- Sự phù nề của da:

Bảng 2.8. Bảng đánh giá phù nề trên da thử

Không phù nề	0 điểm
Phù nề rất nhẹ (vừa đủ nhận thấy)	1 điểm
Phù nề nhận thấy rõ (viền phù nề phồng lên rõ)	2 điểm
Phù nề vừa phải <1mm so với mặt da	3 điểm
Phù nề nặng nhô cao >1mm lan ra ngoài vùng bôi	4 điểm

- Những thay đổi khác trên da sẽ được theo dõi và ghi chép đầy đủ

- Trên mỗi thử, điểm phản ứng được tính bằng tổng số điểm ở hai mức độ ban đầu và phù nề chia cho số lần quan sát. Điểm kích ứng của mẫu thử được lấy trung bình điểm phản ứng của các thử đã thử. Trong trường hợp có dùng mẫu đối chứng, điểm phản ứng của mẫu thử được trừ đi số điểm của mẫu đối chứng.

- Chỉ sử dụng các điểm tại thời gian quan sát ở 6 giờ để tính kết quả. Đối chiếu điểm kích ứng với các mức độ quy định trên bảng 2 để xác định khả năng gây kích ứng trên da thử của mẫu thử.

Bảng 2.9: Bảng xếp loại kích ứng da

Xếp loại	Điểm
Kích ứng không đáng kể	0 – 0,5
Kích ứng nhẹ	>0,5 – 2,0
Kích ứng vừa phải	>2,0 – 5,0
Kích ứng nghiêm trọng	>5,0 – 8,0

2.3.2. Nghiên cứu tính kháng khuẩn của chế phẩm TAD

Phương pháp khuếch tán giếng thạch, Phương pháp đếm khuẩn lạc [55],[60].

Hoạt hóa chủng vi khuẩn: Cây vi khuẩn trên môi trường dinh dưỡng Casein đậu tương. Khi vi khuẩn phát triển làm đục môi trường thì cấy chuyển sang môi trường thạch dinh dưỡng, bảo quản trong tủ lạnh ở 2 - 8 °C.

Thăm dò nồng độ kháng khuẩn của chế phẩm TAD

- Chuẩn bị dung dịch pha loãng chế phẩm TAD và huyền dịch 02 loại vi khuẩn:

Từ ống nghiệm gốc chứa chế phẩm TAD (1 g/ml), pha loãng với nước cất để được các dung dịch có nồng độ 0,1, 0,05, 0,02 và 0,01 g/ml.

Pha huyền dịch chứa vi khuẩn chủng chuẩn từ khuẩn lạc thuần nuôi trong môi trường thạch dinh dưỡng đến khi đạt độ đục tương đương 0.5 độ McFarland (10^8 vi khuẩn/ml). Cây chuyển vi khuẩn sang môi trường Mueller Hinton.

- Đánh giá tác dụng kháng khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch: Từ khuẩn lạc thuần, pha huyền dịch vi khuẩn nồng độ 10^8 vi khuẩn/ml (cây chuyển vào 2ml nước cất vô trùng), điều chỉnh độ đục của huyền dịch vi khuẩn tương đương độ đục chuẩn 0,5 McFarland. Hút 100 μ l huyền dịch vi khuẩn, đổ lên bề mặt thạch Mueller- Hinton, dàn đều vi khuẩn trên đĩa môi trường, lần lượt đục các lỗ nhỏ cao trên môi trường, để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, rồi để tủ ấm 37°C . Sau 24 giờ, đo vòng ức chế vi khuẩn bằng thước kẹp Panme có độ chính xác 0,1 mm. Đường kính vòng ức chế vi khuẩn được tính bằng giá trị trung bình giữa 3 lần thử nghiệm.

Xác định MIC của chế phẩm TAD

- Chuẩn bị dung dịch pha loãng chế phẩm TAD và huyền dịch 02 loại vi khuẩn: tiến hành tương tự như phần Thăm dò ở trên.

- Ủ vi khuẩn trong dung dịch chế phẩm TAD ở các nồng độ khác nhau trong 15 phút và 30 phút.

- Cây 100 μ l dung dịch ủ ở trên lên đĩa thạch Muller – Hinton và xác định nồng độ chế phẩm TAD thấp nhất và thời gian ủ mà vi khuẩn không mọc được (diệt 99% số lượng vi khuẩn).

2.3.3. Nghiên cứu tính chống viêm, giảm ngứa của chế phẩm TAD

2.3.3.1. Phương pháp gây mô hình nghiên cứu tính chống viêm

*Mô hình gây viêm tai cấp bằng dầu croton

Mô hình viêm cấp bằng dầu croton trên tai chuột nhắt trắng được sử dụng trong nghiên cứu này. Hoạt chất chính của dầu croton là chất hữu cơ được gọi là phorbol [61]. Cơ chế gây kích ứng da của dầu croton được giải

thích thông qua Phospholipase A2 (PLA2). Dầu croton làm tăng hoạt tính của PLA2 dẫn tới tăng tạo acid arachidonic và sau đó là các yếu tố liên quan tới quá trình viêm như leucotrien và prostaglandin. Cơ chế gây kích ứng da của dầu croton có sự tham gia hoạt hóa của hai hệ enzym là Cyclooxygenase (COX) và Lipooxygenase (LOX) [62],[63]. Mô hình này đã được nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới sử dụng để đánh giá tác dụng chống viêm của các thuốc hoặc dược chất [64],[65],[66].

Mô hình gây viêm ở tai chuột nhắt trắng bởi dầu croton được tiến hành dựa theo mô hình do Tubaro và cộng sự đã đưa ra (1985) [67].

Chuẩn bị dầu croton: Pha 40 mg dầu croton vào 2 mL aceton (như vậy trong mỗi 20 μ L hỗn hợp sẽ chứa 0,4 mg dầu croton).

Mặt ngoài và mặt trong của tai chuột được bôi 20 μ L dung dịch dầu croton (trong aceton) để gây mô hình viêm tai (mỗi mặt 10 μ L), tiến hành việc bôi dung dịch dầu croton bằng pipet.

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con, được gây mô hình ở tai phải và dùng thuốc như sau:

- Lô 1 (Mô hình): Bôi croton + Không bôi thuốc gì vào tai PHẢI
- Lô 2 (Clobetason): Bôi croton + Bôi clobetason liều 0,02 g/lần, bôi 2 lần ở tai PHẢI sau khi gây mô hình 1 giờ và 3 giờ.
- Lô 3 (TAD2): Bôi croton + Bôi TAD liều 0,2 mL/lần, bôi 2 lần ở tai PHẢI sau khi gây mô hình 1 giờ và 3 giờ.
- Lô 4 (TAD3): Bôi croton + Bôi TAD liều 0,2 mL/lần, bôi 3 lần ở tai PHẢI sau khi gây mô hình 1 giờ, 3 giờ, và 5 giờ.

Ở tất cả các chuột, tai phải được bôi thuốc thử tại thời điểm sau khi bôi croton 1 giờ và 3 giờ, tai trái không gây mô hình và không bôi thuốc gì. Trước khi gây mô hình bằng dung dịch dầu croton (trong aceton), chuột được đo chiều dày tai ở tất cả các lô. Đo chiều dày tai tại vị trí sát đỉnh của tai cách xa

chóp sụn vành tai. Chỉ một nghiên cứu viên tiến hành đo chiều dày tai để hạn chế sai số.

Độ dày tai chuột được đo lại tại các thời điểm sau khi bôi croton 1, 3, 5 (đo ngay trước khi bôi thuốc) và 6 giờ.

6 giờ sau khi gây mô hình, giết chuột bằng cách làm chệch đốt sống cổ, dùng dụng cụ sinh thiết có đường kính 7 mm để cắt phần trung tâm tai chuột để xác định cân nặng. Sự chênh lệch trọng lượng giữa tai trái và phải của cùng một chuột được đánh giá là mức độ phù nề (E). Mức độ ức chế viêm (I%) ở mỗi lô được tính theo công thức sau:

$$I\% = (E_{\text{control}} - E_{\text{treated}}) \div E_{\text{control}} \times 100$$

Trong đó: E_{control} : mức độ phù nề của nhóm mô hình

E_{treated} : mức độ phù nề của nhóm được bôi thuốc

So sánh mức độ phù nề và ức chế viêm giữa các lô để đánh giá kết quả.

2.3.3.2. Phương pháp nghiên cứu tính giảm ngứa

*Mô hình gây ngứa bằng compound 48/80

Pha compound 48/80: 10 mg compound + NaCl 0,9% = vừa đủ 10 mL dung dịch compound 48/80 nồng độ 0,1%.

Phương pháp gây mô hình: tiêm dưới da gáy chuột dung dịch compound 48/80 nồng độ 0,1% với thể tích 0,1 mL/chuột (100 µg compound/chuột) [68],[69].

Chuột nhất trắng, được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con.

Bảng 2.10. Bảng đánh giá số lần gãi của chuột

STT	Bôi thuốc	Bôi thuốc	Tiêm dưới da gáy
1	Chứng sinh học	Nước	NaCl 0,9%
2	Mô hình	Nước	Compound 48/80
3	Chứng dương	Clobetason 0,02g/ lần, bôi 2 lần, khoảng cách giữa	Compound 48/80

STT	Bôi thuốc	Bôi thuốc	Tiêm dưới da gáy
		các lần bôi là 3 giờ	
4	Chế phẩm TAD 2	Chế phẩm TAD 0,2mL/ lần, bôi 2 lần, khoảng cách giữa các lần bôi là 3 giờ	Compound 48/80
5	Chế phẩm TAD 3	Chế phẩm TAD 0,2mL/ lần, bôi 3 lần, khoảng cách giữa các lần bôi là 3 giờ	Compound 48/80

Chuột được dùng mẫu thử liên tục trong thời gian 5 ngày.

- Dạng thuốc bôi: Chuột được cạo lông vùng da gáy để bôi mẫu thử với diện tích 1,5 cm² trước khi tiến hành nghiên cứu 24 giờ.

Ngày thứ 5, sau khi dùng mẫu thử lần cuối 30 phút, chuột ở các lô 2-5 được tiêm dưới da gáy dung dịch Compound 48/80 nồng độ 0,1% với thể tích 0,1 mL/chuột, chuột lô chứng sinh học được tiêm dưới da gáy dung dịch NaCl 0,9% với thể tích tương tự. Ngay sau khi tiêm, chuột được đưa vào các lồng quan sát để đếm số lần gãi của chuột trong thời gian 30 phút (0-5 phút, 5-10 phút, 10-15 phút, 15-20 phút, 20-25 phút, 25-30 phút) [70],[71],[72].

Chỉ số đánh giá: *thời điểm gãi đầu tiên, số lần gãi trung bình tại từng thời điểm, số lần gãi trung bình trong 30 phút* được so sánh giữa các lô để đánh giá tác dụng giảm ngứa của thuốc thử.

2.4. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu tính kích ứng da được thực hiện tại phòng thí nghiệm Bộ môn Dược lý và Viện Nghiên cứu Y Dược cổ truyền Tuệ Tĩnh, Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam.

Nghiên cứu tính chống viêm giảm ngứa tại phòng thí nghiệm Bộ môn Dược lý, Đại học Y Hà Nội

Nghiên cứu tính kháng khuẩn phòng thí nghiệm Bộ môn Vi sinh – ký sinh trùng, Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam.

2.5. Thời gian nghiên cứu

Dự kiến từ năm 5/2024 đến 9/2024

2.6. Các biến số và chỉ số trong nghiên cứu

2.6.1. Các biến số và chỉ số trong nghiên cứu tính kích ứng da của chế phẩm TAD

- Ban đỏ trên da
- Phù nề trên da
- Hình ảnh giải phẫu bệnh kháng định tổn thương

2.6.2. Các biến số và chỉ số trong nghiên cứu tính kháng khuẩn của chế phẩm TAD

- Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
- Số lượng khuẩn lạc (CFU/ml)

2.6.3. Các biến số và chỉ số trong nghiên cứu tính chống viêm, giảm ngứa của chế phẩm TAD

- Độ dày tai chuột.
- Khối lượng tai chuột.
- Mức độ ức chế viêm.
- Thời điểm gãi đầu tiên.
- Số lần gãi trung bình tại từng thời điểm.
- Số lần gãi trung bình trong 30 phút.

2.7. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được nhập bằng phần mềm Excel 2007– Microsoft, xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0. Số liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Kiểm định các giá trị bằng test t – Student, test t ghép cặp, test ANOVA 2 chiều.

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

2.8. Sai số và cách khống chế sai số

Để hạn chế các sai số trong quá trình nghiên cứu, nghiên cứu này thực hiện một số quy định về động vật dùng cho thử nghiệm như sau:

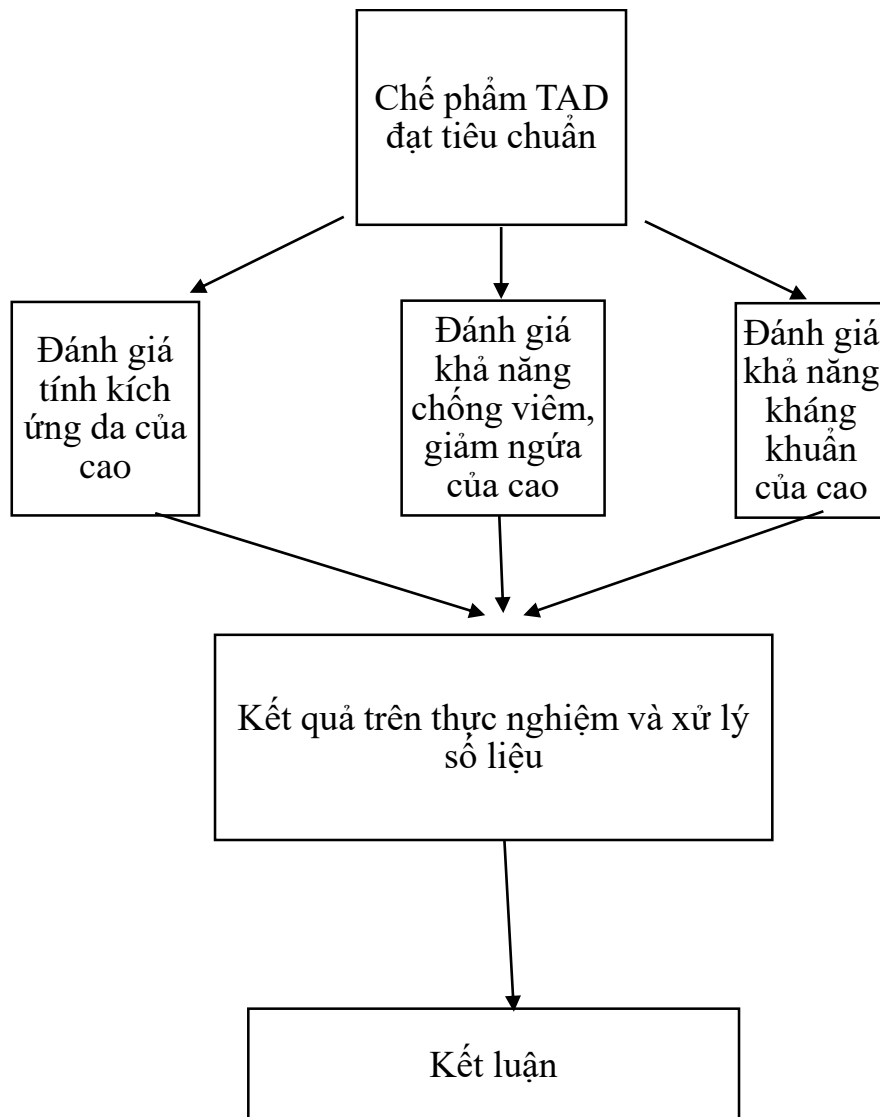
Thỏ cả hai giống, khoẻ mạnh, trọng lượng 1,8-2,5 kg, được nuôi trong điều kiện đầy đủ thức ăn và nước uống tại phòng thí nghiệm từ 5 -10 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu.

2.9. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện với mục đích xác định tính kích ứng, kháng khuẩn và chống viêm, giảm ngứa của Chế phẩm TAD trên thực nghiệm nhằm mục đích đánh giá tác dụng dược lý của Chế phẩm TAD. Ngoài ra không có mục đích nào khác.

Các số liệu thu nhập trong nghiên cứu là hoàn toàn trung thực, có độ tin cậy và chính xác.

Nghiên cứu đã được thông qua bởi Hội đồng khoa học của Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam.



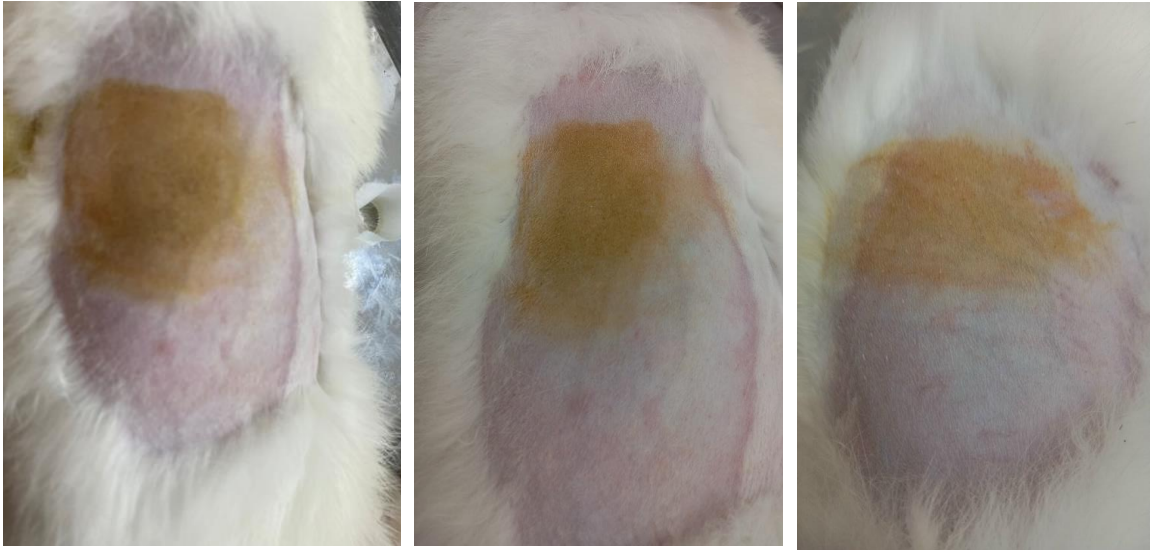
Sơ đồ 2.1. Sơ đồ quy trình nghiên cứu

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đánh giá tính kích ứng da của chế phẩm TAD

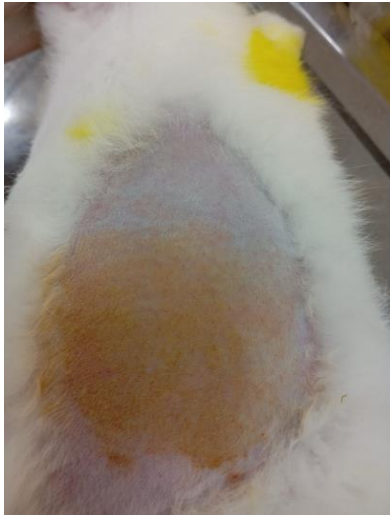
Trong suốt thời gian theo dõi, tại các thời điểm sau khi đặt thuốc 1, 2, 4, 6 và 24 giờ, vùng da đặt mẫu thử vẫn bình thường, không có dấu hiệu ban đỏ, không bị kích ứng, không phù nề hay viêm. Sau khi bóc mẫu thử, vùng da đặt chất thử có màu nâu vàng, nhưng da nguyên vẹn, lành lặn, không có biểu hiện sưng tấy, đỏ hay viêm nhiễm. Da hoàn toàn khỏe mạnh. Vùng da đặt chất thử và vùng da chứng tương tự nhau (hình 3.1-3.5).



**Hình 3.1: Da thỏ số 3
sau 1 giờ đặt mẫu thử**

**Hình 3.2: Da thỏ 2
sau 2 giờ đặt mẫu thử**

**Hình 3.3: Da thỏ 5
sau 4 giờ đặt mẫu thử**



Hình 3.4: Da thỏ 1 sau 6 giờ đặt mẫu thử



Hình 3.5: Da thỏ 6 sau 24 giờ đặt mẫu thử

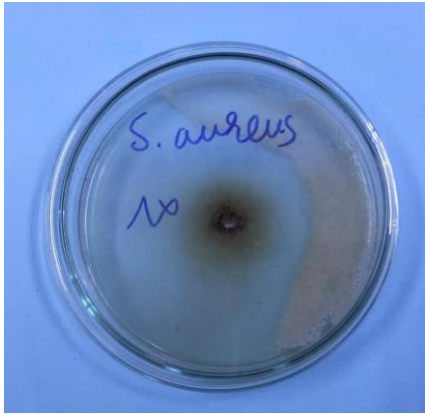
Nhận xét: Cả 6 thỏ đều có vùng da đặt mẫu thử lành lặn, không viêm, không sưng tấy, không kích ứng hay ban đỏ. Vùng da đặt mẫu thử và vùng da đặt nước cất tương tự nhau.

Vậy sau khi thử nghiệm tác dụng kích ứng da thỏ của Chế phẩm TAD với liều 2,0 g dược liệu, đặt trên diện tích da 2,5 x 2,5 cm nhận thấy, da thỏ hoàn toàn bình thường, khỏe mạnh, không bất cứ biểu hiện dị ứng hay viêm nào trong suốt thời gian đặt mẫu 24 giờ. Chế phẩm TAD an toàn với da thỏ ở mức liều đã thử nghiệm.

3.2. Đánh giá tính kháng khuẩn của chế phẩm TAD

3.2.1. Xác định hoạt tính kháng khuẩn in vitro của chế phẩm TAD trên 2 chủng vi khuẩn

**Staphylococcus aureus* ATCC 6538



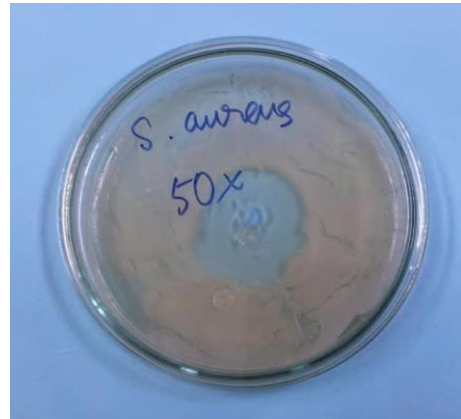
Hình 3.6: Nồng độ pha loãng 1x



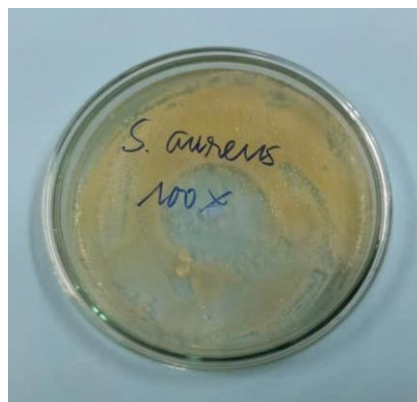
Hình 3.7: Nồng độ pha loãng 10x



Hình 3.8: Nồng độ pha loãng 20x



Hình 3.9: Nồng độ pha loãng 50x



Hình 3.10: Nồng độ pha loãng 100x

Bảng 3.1. Nồng độ kháng khuẩn của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

STT	Nồng độ chế phẩm TAD (g/ml)	Đường kính khuếch tán vòng kháng khuẩn (mm)
1	Chế phẩm gốc 1g/ml	27,10 ± 0,707
2	0,1	25,05 ± 0,289
3	0,05	15,95 ± 0,2889
4	0,02	12,67 ± 0,381
5	0,01	8,20 ± 0,5

Chế phẩm TAD có khả năng kháng *Staphylococcus aureus* ở tất cả các nồng độ. Đường kính vòng vô khuẩn giảm dần khi nồng độ TAD giảm xuống. Đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất là 27,10 ± 0,707 mm (nồng độ 1 g/ml), lớn hơn, có ý nghĩa thống kê so với các nồng độ còn lại ($P < 0,05$) và nhỏ nhất là 8,2 ± 0,500 mm (nồng độ 0,01 g/ml).

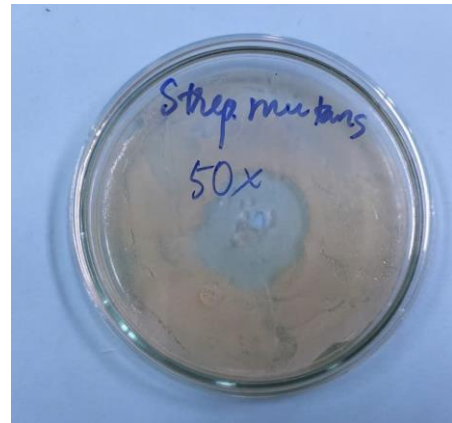
* *Streptococcus mutans* ATCC 35668



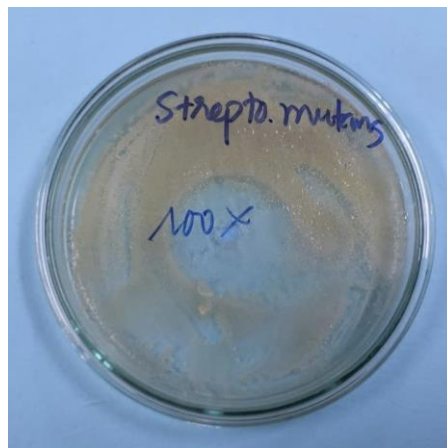
Hình 3.11: Nồng độ pha loãng 1x



Hình 3.12: Nồng độ pha loãng 10x



Hình 3.13: Nồng độ pha loãng 20x Hình 3.14: Nồng độ pha loãng 50x



Hình 3.15: Nồng độ pha loãng 100x

Bảng 3.2. Nồng độ kháng khuẩn của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* ATCC 35668

STT	Nồng độ chế phẩm TAD (g/ml)	Đường kính khuếch tán vòng kháng khuẩn (mm)
1	Chế phẩm gốc 1g/ml	$28,67 \pm 0,661$
2	0,1	$26,50 \pm 0,541$
3	0,05	$16,33 \pm 0,567$
4	0,02	$13,10 \pm 0,567$
5	0,01	$8,8 \pm 0,333$

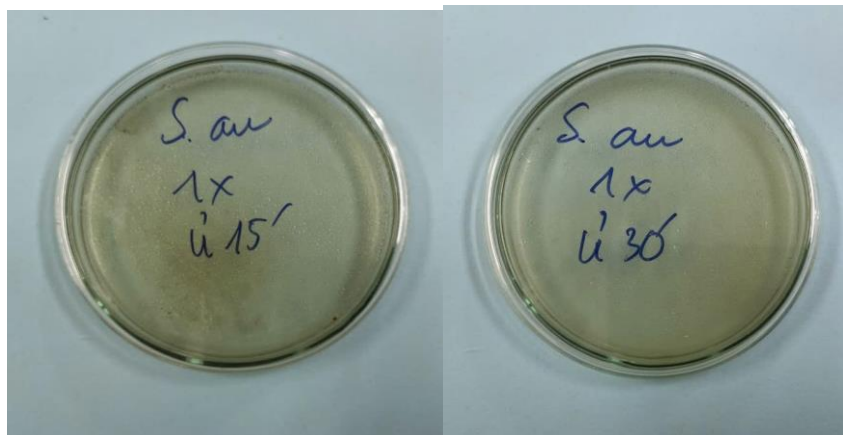
Ở tất cả các nồng độ đã thử, chế phẩm TAD có khả năng kháng *Streptococcus mutans*. Đường kính vòng vô khuẩn tăng giảm tỷ lệ thuận với nồng độ TAD. Đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất ở nồng độ 1 g/ml ($28,67 \pm 0,661$ mm), lớn hơn có ý nghĩa thống kê so với các nồng độ còn lại ($P < 0,05$) và nhỏ nhất ở nồng độ 0,01 g/ml ($8,8 \pm 0,333$ mm).

Kết luận: Như vậy bước đầu đã xác định được hoạt tính kháng khuẩn in vitro của chế phẩm TAD trên 2 chủng vi *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở tất cả các nồng độ thử và có khả năng kháng đến nồng độ 0,01 g/ml.

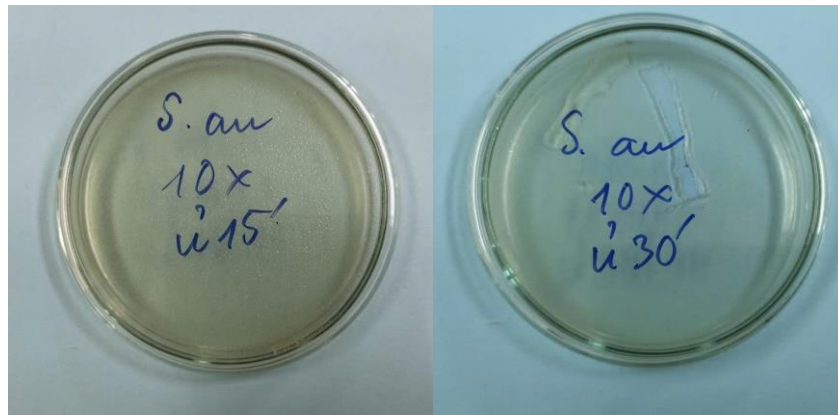
3.2.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của chế phẩm TAD trên 2 chủng vi khuẩn

**Staphylococcus aureus* ATCC 6538

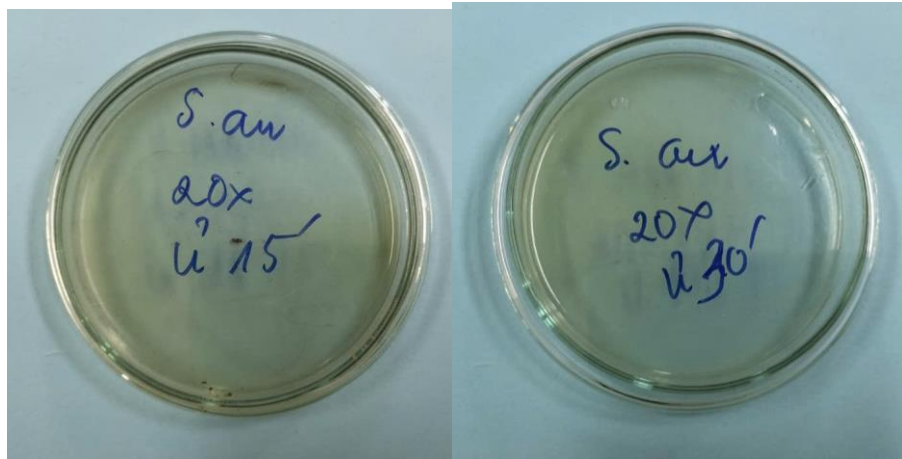
Hình ảnh vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ở các nồng độ chế phẩm 1x, 10x, 20x, 50x, 100x trong 15 phút và 30 phút.



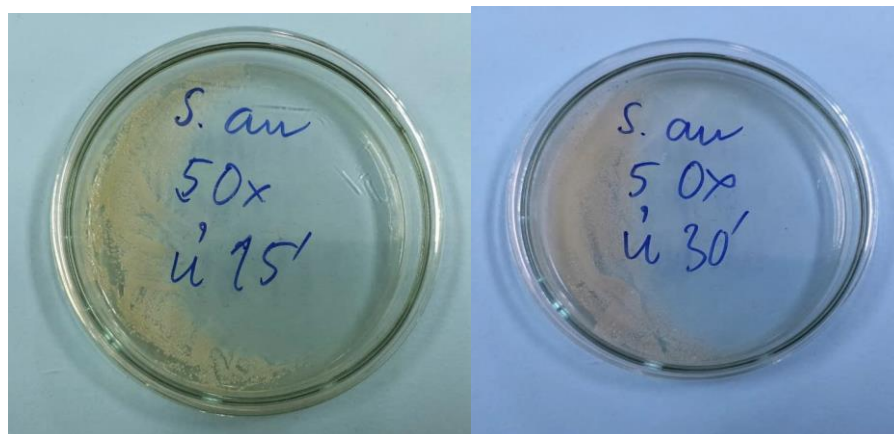
Hình 3.16: Nồng độ cao 1x ủ trong 15 phút và 30 phút



Hình 3.17: Nồng độ cao 10x ủ trong 15 phút và 30 phút



Hình 3.18: Nồng độ cao 20x ủ trong 15 phút và 30 phút



Hình 3.19: Nồng độ cao 50x ủ trong 15 phút và 30 phút



Hình 3.20: Nồng độ cao 100x ủ trong 15 phút và 30 phút

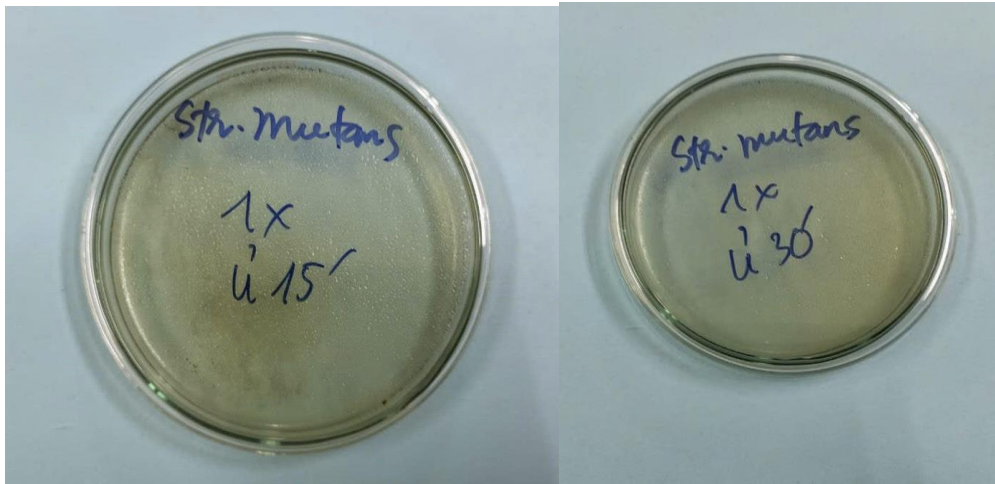
Bảng 3.3. Nồng độ ức chế tối thiểu của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

STT	Nồng độ chế phẩm TAD (g/ml)	Kết quả vi sinh vật còn sống sau thời gian ủ (CFU/ml)	
		Thời gian ủ 15 phút	Thời gian ủ 30 phút
1	Chế phẩm gốc 1g/ml	0	0
2	0,1	0	0
3	0,05	0	0
4	0,02	$34,5 \times 10^2$	$19,5 \times 10^2$
5	0,01	$56,5 \times 10^2$	$27,2 \times 10^2$

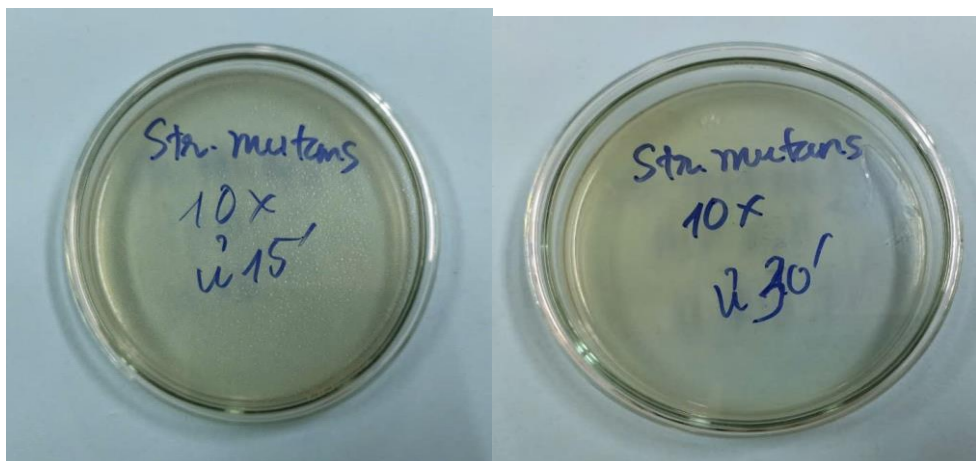
Chế phẩm TAD có khả năng diệt 100% vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ở các nồng độ 0,05, 0,1 và 1 g/ml với thời gian ủ 15 và 30 phút. Ở nồng độ pha loãng 0,02 và 0,01 g/ml, TAD không còn khả năng diệt khuẩn hoàn toàn. MIC của chế phẩm TAD đối với *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ở 15 phút và 30 phút ủ đều là 0,05 g/ml.

**Streptococcus mutans* ATCC 35668

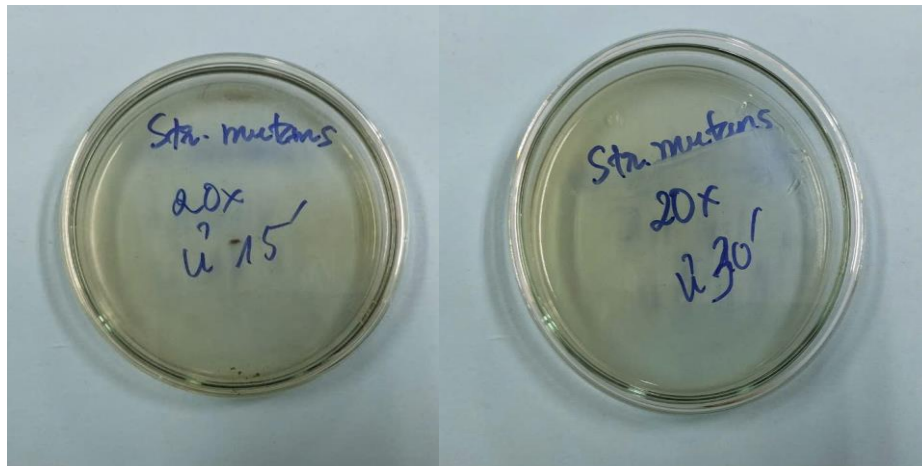
Hình ảnh vi khuẩn *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở các nồng độ chế phẩm 1x, 10x, 20x, 50x, 100x trong 15 phút và 30 phút.



Hình 3.21: Nồng độ cao 1x ủ trong 15 phút và 30 phút



Hình 3.22: Nồng độ cao 10x ủ trong 15 phút và 30 phút



Hình 3.23: Nồng độ cao 20x ủ trong 15 phút và 30 phút



Hình 3.24: Nồng độ cao 50x ủ trong 15 phút và 30 phút



Hình 3.25: Nồng độ cao 100x ủ trong 15 phút và 30 phút

Bảng 3.4. Nồng độ ức chế tối thiểu của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* ATCC 35668

STT	Nồng độ chế phẩm TAD (g/ml)	Kết quả vi sinh vật còn sống sau thời gian ủ (CFU/ml)	
		Thời gian ủ 15 phút	Thời gian ủ 30 phút
1	Chế phẩm gốc 1g/ml	0	0
2	0,1	0	0
3	0,05	0	0
4	0,02	$39,2 \times 10^2$	$22,4 \times 10^2$
5	0,01	$60,5 \times 10^2$	$35,7 \times 10^2$

Ở các nồng độ 0,05, 0,1 và 1 g/ml, chế phẩm TAD có khả năng diệt 100% vi khuẩn *Streptococcus mutans* ATCC 35668 với thời gian ủ 15 và 30 phút. Hai nồng độ 0,01 và 0,02 g/ml không có khả năng diệt khuẩn hoàn toàn ở cả thời gian ủ 15 và 30 phút. MIC của chế phẩm TAD đối với chủng *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở 15 và 30 phút ủ đều là 0,05 g/ml.

Kết luận: Như vậy ta đã xác định được nồng độ kháng khuẩn tối thiểu (MIC) của chế phẩm TAD trên 2 chủng vi *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở thời gian ủ 15 phút và 30 phút đều là 0,05g/ml.

3.3. Đánh giá tính chống viêm, giảm ngứa của Chế phẩm TAD

3.3.1. Tác dụng chống viêm tại cấp do dầu croton

Bảng 3.5. Độ dày trung bình của tai chuột trước và sau khi bôi dầu croton

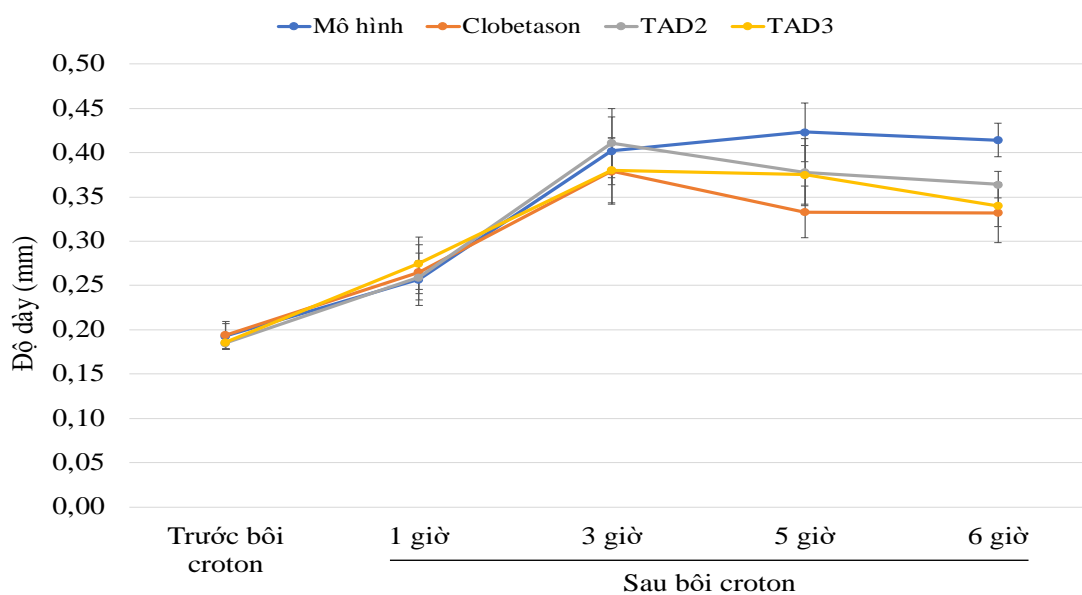
Lô nghiên cứu	Trước bôi croton	Sau bôi croton			
		1 giờ	3 giờ	5 giờ	6 giờ
Mô hình	0,19 ± 0,01	0,26 ± 0,03 (a)	0,40 ± 0,04 (a)	0,42 ± 0,03 (a)	0,41 ± 0,02 (a)
Clobetason	0,19 ± 0,02	0,27 ± 0,03 (a)	0,38 ± 0,04 (a)	0,33 ± 0,03 (a***)	0,33 ± 0,03 (a***)
TAD2	0,19 ± 0,01	0,26 ± 0,02 (a)	0,41 ± 0,04 (a)	0,38 ± 0,04 (a*##)	0,36 ± 0,02 (a***#)
TAD3	0,19 ± 0,01	0,28 ± 0,03 (a)	0,38 ± 0,04 (a)	0,38 ± 0,03 (a**##)	0,34 ± 0,02 (a***\$)

Số liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$ (mm)

^a $p < 0,001$ so với thời điểm trước bôi croton (paired samples t-test)

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ so với lô mô hình (Student's t-test)

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$ so với lô bôi clobetason; \$ $p < 0,05$ so với lô TAD2 (Student's t-test)



Biểu đồ 1. Sự thay đổi độ dày tai chuột theo thời gian trong 6 giờ

Bảng 3.5 và Biểu đồ 1 trình bày số liệu về độ dày trung bình của tai chuột trước và sau khi bôi dầu croton. Clobetason thể hiện hiệu quả chống viêm cấp tốt thông qua tác dụng làm giảm đáng kể độ dày tai chuột sau khi bôi 2 lần cách thời điểm bôi croton 1 giờ và 3 giờ. Tác dụng chống viêm tương tự cũng được quan sát thấy với các lô bôi TAD, hiệu quả cũng được thể hiện sau khi bôi TAD hai lần cách thời điểm bôi croton 1 giờ và 3 giờ. Bên cạnh đó, hiệu quả của TAD được tăng cường thêm khi bôi thêm một lần nữa cách thời điểm bôi croton 5 giờ, nhận định này dựa trên độ dày tai chuột tại thời điểm 6 giờ sau bôi dầu croton ở lô TAD3 nhỏ hơn có ý nghĩa thống kê so với lô TAD2 với $p < 0,05$.

Bảng 3.6. Mức độ ức chế viêm của Chế phẩm TAD sau 6 giờ bôi dầu croton

Lô nghiên cứu	Trọng lượng (mg)			Mức độ ức chế viêm (%)
	Tai phải	Tai trái	Mức tăng trọng lượng [@]	
Lô 1: Mô hình	37,0 ± 4,4	21,1 ± 3,0	15,95 ± 2,33	
Lô 2: Clobetason	25,1 ± 6,2***	19,0 ± 1,9	6,10 ± 5,53***	61,76
Lô 3: TAD2	31,3 ± 6,3* [#]	20,6 ± 2,9	10,69 ± 8,01	32,98
Lô 4: TAD3	30,9 ± 6,1*	20,3 ± 2,2	10,53 ± 5,49*	33,98

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ so với lô mô hình (Student's t-test)

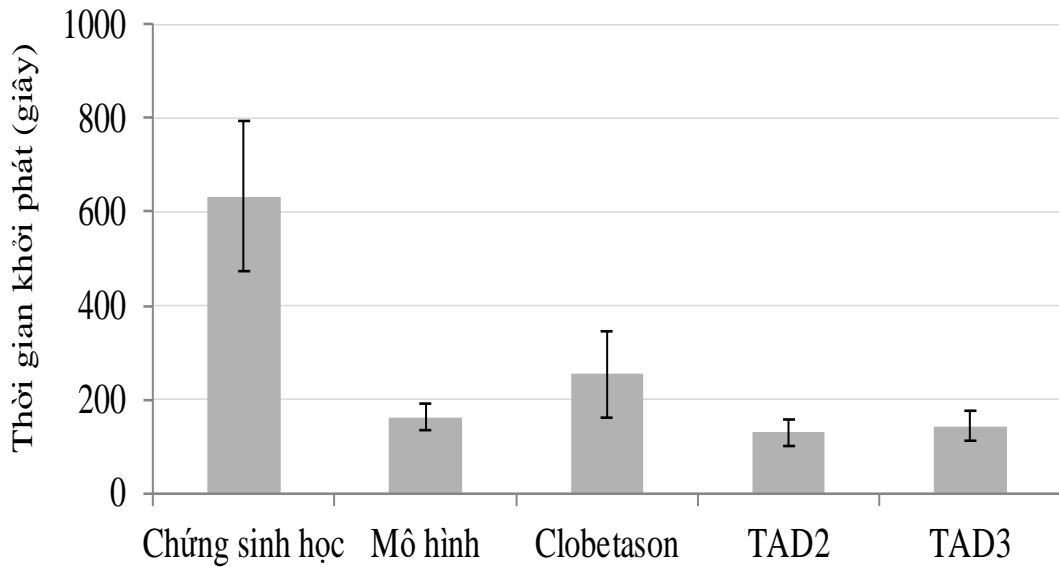
[#] $p < 0,05$ so với lô bôi clobetason (Student's t-test)

[@]Mức tăng trọng lượng = Khối lượng tai phải – Khối lượng tai trái

Số liệu Bảng 3.6 cho thấy:

- Clobetasol có hiệu quả chống viêm rõ rệt, thể hiện ở tác dụng làm giảm đáng kể mức tăng trọng lượng tai so với lô mô hình ($p < 0,001$). Mức độ ức chế viêm của clobetason so với lô mô hình là 61,76%.
- Mức tăng trọng lượng tai chuột ở hai lô bôi TAD có xu hướng giảm, sự khác biệt so với lô mô hình được quan sát thấy với lô bôi TAD ba lần với $p < 0,05$. Mức độ ức chế viêm của hai lô bôi TAD hai lần và ba lần so với lô mô hình lần lượt là 32,98% và 33,98%.

3.3.2. Đánh giá tác dụng chống ngứa



* $p < 0,05$ so với chứng sinh học (Student's t-test)

Biểu đồ 2. Thời điểm khởi phát cơn ngứa đầu tiên

Biểu đồ 2 biểu diễn thời điểm khởi phát cơn ngứa đầu tiên của chuột ở các lô nghiên cứu. Chuột ở các lô được tiêm dưới da gáy compound 48/80 xuất hiện ngứa sớm hơn đáng kể so với chuột lô chứng sinh học được tiêm dưới da gáy NaCl 0,9%. So với lô mô hình, clobetason có xu hướng kéo dài thời điểm khởi phát cơn ngứa, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê. TAD bôi 2 lần (lô TAD2) và bôi 3 lần (lô TAD3) đều chưa thể hiện tác dụng trì hoãn thời điểm khởi phát cơn ngứa so với lô mô hình

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của TAD đến số lần gãi ngứa trung bình của chuột nhắt tại từng khoảng thời gian quan sát

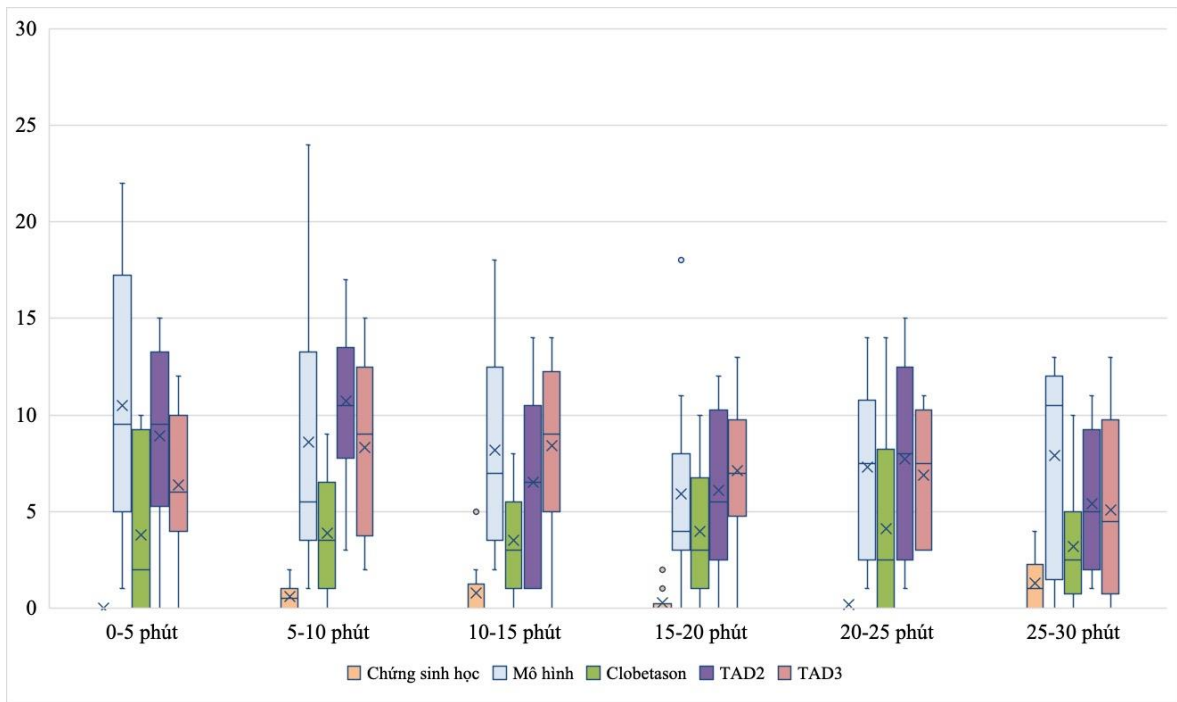
Lô chuột (n = 10)	Số lần gãi (số lần/5 phút)					
	0-5 phút	> 5-10 phút	> 10-15 phút	> 15-20 phút	> 20-25 phút	> 25-30 phút
Lô 1 Chứng sinh học	0	0,60 ± 0,70**	0,80 ± 1,62**	0,30 ± 0,67**	0,20 ± 0,63***	1,30 ± 1,49**
Lô 2 Mô hình	10,50 ± 7,04	8,60 ± 7,37	8,20 ± 5,39	5,90 ± 5,20	7,30 ± 4,55	7,90 ± 5,20
Lô 3 Clobetason	3,80 ± 4,24*	3,90 ± 3,07	3,50 ± 2,72*	4,00 ± 3,56	4,10 ± 4,89	3,20 ± 3,01*
Lô 4 TAD2	8,90 ± 4,91 [#]	10,70 ± 4,08 ^{###}	6,50 ± 4,79	6,10 ± 4,28	7,70 ± 5,21	5,40 ± 3,57
Lô 5 TAD3	6,40 ± 3,66	8,30 ± 4,64 [#]	8,40 ± 4,40 ^{##}	7,10 ± 3,81	6,90 ± 3,38	5,10 ± 4,86

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ so với lô mô hình (Student's t-test)

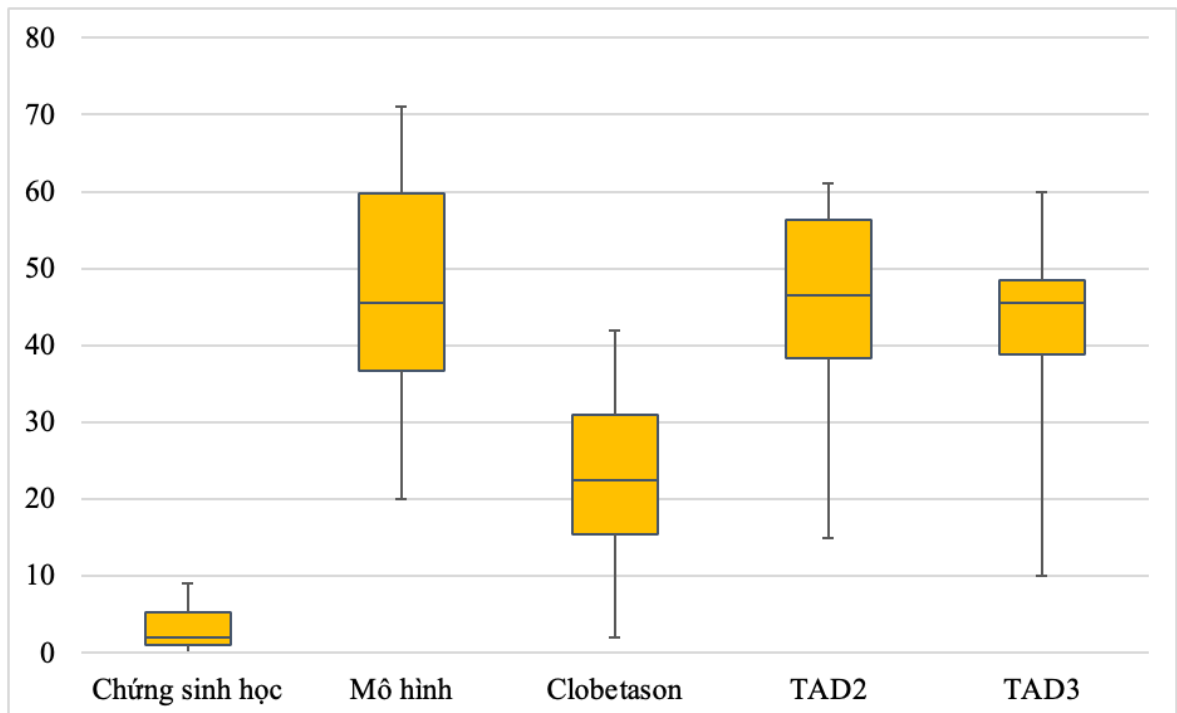
[#] $p < 0,05$; ^{###} $p < 0,001$ so với lô bôi clobetason (Student's t-test)

Kết quả ở Bảng 3.7 và Biểu đồ 2 cho thấy:

- Bôi clobetason có xu hướng làm giảm số lần gãi của chuột so với lô mô hình ở tất cả các khoảng thời gian đánh giá, mức giảm có ý nghĩa thống kê được quan sát rõ nhất tại các khoảng thời gian 0-5 phút, 10-15 phút, và 25-30 phút ($p < 0,05$).
- Cao lỏng TAD thể hiện hiệu quả làm giảm số lần gãi của chuột so với lô mô hình kém hơn tại các khoảng thời gian quan sát ($p > 0,05$).



Biểu đồ 3. Ảnh hưởng của Chế phẩm TAD đến số lần gãi ngứa của chuột nhắt tại từng thời điểm nghiên cứu



Biểu đồ 4. Ảnh hưởng của Chế phẩm TAD đến tổng số lần gãi của chuột nhắt trong 30 phút

Quan sát Biểu đồ 4 nhận thấy:

- Chuột ở lô chứng sinh học có tổng số lần gãi trong 30 phút dao động chủ yếu trong khoảng 1-5 lần, số lần gãi nhiều nhất và ít nhất tương ứng là 9 và 0.
- Chuột ở lô mô hình không được điều trị gì có tổng số lần gãi trong 30 phút dao động chủ yếu trong khoảng 37-60 lần, số lần gãi nhiều nhất và ít nhất tương ứng là 71 và 20.
- Chuột ở lô bôi clobetason vào vùng da gáy có tổng số lần gãi trong 30 phút dao động chủ yếu trong khoảng 16-31 lần, số lần gãi nhiều nhất và ít nhất tương ứng là 42 và 02.
- Chuột ở lô TAD2 được bôi TAD hai lần/ngày vào vùng da gáy có tổng số lần gãi trong 30 phút dao động chủ yếu trong khoảng 38-56 lần, số lần gãi nhiều nhất và ít nhất tương ứng là 61 và 15.

Chuột ở lô TAD3 được bôi TAD ba lần/ngày vào vùng da gáy có tổng số lần gãi trong 30 phút dao động chủ yếu trong khoảng 39-49 lần, số lần gãi nhiều nhất và ít nhất tương ứng là 60 và 10.

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của thuốc thử đến tổng số lần gãi trung bình của chuột nhắt trong 30 phút

Lô nghiên cứu (n = 10)	Số lần gãi trung bình
Lô 1 (Chứng sinh học)	3,20 ± 3,29***
Lô 2 (Mô hình)	48,40 ± 16,65
Lô 3 (Clobetason)	22,50 ± 13,90***
Lô 4 (TAD2)	45,30 ± 13,97 ^{##}
Lô 5 (TAD3)	42,20 ± 13,96 ^{##}

*** $p < 0,001$ so với lô mô hình (Student's t-test); ^{##} $p < 0,01$ so với lô bôi clobetason (Student's t-test)

Kết quả Bảng 2 cho thấy, clobetason và chế phẩm TAD đều có xu hướng làm giảm số lần gãi trung bình trong 30 phút so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được quan sát thấy với lô bôi clobetason ($p < 0,001$).

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Về tính kích ứng da của Chế phẩm TAD

Muốn áp dụng một loại thuốc mới vào điều trị cho người bệnh, trước tiên cần phải xác định tính an toàn của thuốc. Chế phẩm TAD là chế phẩm đường ngoài, dùng để điều trị bệnh viêm da cơ địa. Để có cơ sở khoa học khi sử dụng chế phẩm dưới dạng cao lỏng trong điều trị, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tính kích ứng da, nhằm đánh giá tính an toàn. Đồng thời nghiên cứu tính kháng khuẩn, chống viêm, giảm ngứa của Chế phẩm TAD trên thực nghiệm.

Nghiên cứu tính kích ứng da trên động vật thực nghiệm là một phần nghiên cứu rất quan trọng trong quá trình phát triển thuốc mới. Các kết quả từ nghiên cứu tính kích ứng da sẽ cung cấp bằng chứng cho tính an toàn trước khi sử dụng trên người và là cơ sở để tính liều dùng trên lâm sàng.

Nghiên cứu tính kích ứng da của thuốc được tiến hành trên thỏ trắng theo hướng dẫn của Bộ Y tế và OECD 404.

4.1.1. Lựa chọn động vật nghiên cứu

Trong nghiên cứu đánh giá kích ứng da thường được khuyến cáo nên tiến hành trên da có tính mẫn cảm cao. Da thỏ mỏng và nhạy cảm nhất trong các loài động vật, mỏng và dễ kích ứng hơn da người [73].

Các nghiên cứu về độc tính trên da được thực hiện trên động vật có nhiều lông (động vật gặm nhấm / thỏ) có lớp biểu bì tương đối mỏng so với người. Nhìn chung, da người và da linh trưởng không phải người được cho là ít thấm các chất thử nghiệm hơn nhiều so với da thỏ và / hoặc động vật gặm nhấm. Cần lưu ý kết quả thu được ở thỏ không phải lúc nào cũng dự đoán được phản ứng của con người vì da thỏ dễ bị kích ứng bởi các tác nhân hóa

học hơn da người [73]. Do vậy, khi tính kích ứng trên da thỏ bằng 0 thì gần như chắc chắn trên da người sẽ tương tự.

4.1.2. Chuẩn bị động vật nghiên cứu

Động vật thử nghiệm như chuột, thỏ... có lớp da dày đòi hỏi cạo lông trước khi cho tiếp xúc với thuốc nghiên cứu, điều này có thể làm tăng khả năng tiếp xúc và độc tính toàn thân. Nên sử dụng tông đơ điện, ngoài ra có thể sử dụng tại chỗ các chất hóa học làm rụng lông giúp mang lại bề mặt da mịn màng và không có lông. Tuy nhiên, Sự rụng lông do hóa chất ở động vật có lớp biểu bì tương đối mỏng có thể làm mất hoặc giảm lớp sừng, khiến da nhạy cảm hơn với các tác nhân bên ngoài da. Nó cũng có thể dẫn đến việc tiếp xúc toàn thân với các hợp chất được dùng tại chỗ cao hơn đáng kể so với vùng da bị cắt [73]. Trong nghiên cứu, không tiến hành sử dụng hóa chất làm rụng lông.

Để ngăn chặn việc động vật liếm, nuốt và bắt chước việc sử dụng lâm sàng các công thức thử nghiệm trên da, vị trí ứng dụng thường bề mặt lưng của động vật, sau đó băng kín hoặc cố định bằng băng dính... để cố định gạc tại chỗ. Việc quấn thân hoặc cơ thể quá chặt có thể dẫn đến những hậu quả không lường trước được [73]. Trong nghiên cứu, sau khi đặt lớp gạc tẩm chế phẩm TAD, chúng tôi chỉ cố định gạc cẩn thận bằng băng dính không gây dị ứng.

4.1.3. Kết quả chỉ số kích ứng da

Trong nghiên cứu, tất cả các thỏ ở các giai đoạn đều không có hoạt động bất thường; vùng da thỏ tiếp xúc với thuốc không có biểu hiện tạo ban đỏ, tạo vảy hoặc viêm phù nề. Như vậy, tổng số điểm kích ứng da bằng 0, tương ứng với loại kích ứng da không đáng kể.

Ban đỏ được định nghĩa là đỏ da hoặc niêm mạc, khi ấn vào thì biến mất,

thả ra thì xuất hiện trở lại. Đây là một trong những biểu hiện chính của kích ứng da do hóa chất. Nguyên nhân do chất thử áp dụng trên bề mặt da xâm nhập vào lớp sừng và gây phá hủy các lớp bên dưới các tế bào sừng. Tế bào sừng tổn thương giải phóng chất trung gian viêm hoạt động trên các tế bào lớp trung bì, đặc biệt là lớp đệm và lớp nội mạc mạch máu. Xuất hiện giãn mạch và tăng tính thấm thành mạch bởi sự thay đổi nội mô mạch máu, đặc biệt là ở mao mạch làm tăng lưu lượng máu (xung huyết) gây ban đỏ [73]. Để tránh sự đánh giá chủ quan, ảnh hưởng bởi màu sắc da, da bong vảy do đó khi đánh giá và ghi nhận ban đỏ cần từ một người trở lên.

Kết quả cũng cho thấy không ghi nhận bất cứ phản ứng tạo vảy da nào trên tất cả thử nghiệm ở các thời điểm nghiên cứu. Vảy da được hình thành để ngăn ngừa sự tiến triển của ban đỏ và xuất hiện ở phản ứng mức độ ban đỏ nghiêm trọng (đỏ tẩy) nên không ghi nhận vảy da là hợp lý.

Phù nề được định nghĩa là sự sưng lên so với vùng da kế cận, cũng là một biểu hiện chính của kích ứng da [73]. Phù nề có cùng cơ chế với ban đỏ, sự giãn mạch và tăng tính thấm thành mạch làm tăng thoát dịch vào các mô cơ thể và gây biểu hiện phù nề. Kết quả đồng thời cũng cho thấy không có các biểu hiện thay đổi khác (thay đổi màu sắc da, mụn nước, bọng nước, khô da...) trên da thử tại các vùng da đặt mẫu thử trong thời gian quan sát.

Kết quả đánh giá tính kích ứng da chế phẩm TAD rất quan trọng đối với một chế phẩm dùng trên da để điều trị viêm da cơ địa, việc sử dụng các chế phẩm điều trị có độ kích ứng không phù hợp không chỉ gây đau đớn, khó chịu cho bệnh nhân, mà còn có thể gây ra tổn thương thêm tình trạng các tổn thương.

4.2. Về tính kháng khuẩn của Chế phẩm TAD

VDCĐ có thể bội nhiễm virus herpes, vi khuẩn như liên cầu, tụ

cầu. Một số trường hợp bội nhiễm tổn thương da tại chỗ không được điều trị kịp thời có thể gây nhiễm khuẩn huyết, viêm cầu thận,...[1]. Vậy nên tôi lựa chọn nghiên cứu tính kháng khuẩn của chế phẩm TAD trên 2 chủng vi khuẩn là *Staphylococcus aureus* (tụ cầu vàng) và *Streptococcus mutans* (liên cầu) nhằm đánh giá tác dụng của chế phẩm TAD với các trường hợp VDCĐ có nhiễm khuẩn.

Về tác dụng kháng khuẩn được nghiên cứu bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch và đếm khuẩn lạc, là phương pháp phổ biến hiện nay với ưu điểm đơn giản, chi phí thấp, cho kết quả nhanh chóng, khả năng kháng vi khuẩn được thể hiện qua đường kính vòng ức chế vi khuẩn.

Phương pháp khuếch tán giếng thạch (Agar well diffusion method) là phương pháp được sử dụng rộng rãi để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của vi sinh vật. Hoạt tính kháng khuẩn của những dòng phân lập được tính bằng vùng vô khuẩn quanh miệng giếng trên đĩa [55].

Sau nghiên cứu, ta thấy chế phẩm TAD có khả năng kháng chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ở tất cả các nồng độ. Đường kính giảm dần khi nồng độ chế phẩm giảm xuống. Đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất là 27,10 mm (Chế phẩm gốc) và nhỏ nhất là 8,2 mm (nồng độ 0,01 g/ml). Vậy ở nồng độ gốc và nồng độ 0,01 g/ml thì chế phẩm TAD có khả năng kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* là tốt nhất.

Nghiên cứu về Đại hoàng có kết quả thử nghiệm trải đĩa trong ống thử nghiệm đã tìm thấy 11,02 µg/đĩa hỗn hợp rắn có vùng ức chế trung bình là $8,13 \pm 0,05$ mm đối với *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 [74].

Nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của tinh dầu từ cây sả chanh của Nguyễn Thị Thanh Mai, Trần Bảo Trâm và các công sự cho thấy đường kính kháng khuẩn của tinh dầu sả chanh với *Staphylococcus aureus* lớn nhất là 16,5, nhỏ hơn so với chế phẩm TAD.

Nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu bạch đàn thứ sinh của Phùng Thị Lan Hương và các cộng sự cho thấy đường kính kháng khuẩn của tinh dầu bạch đàn với *Staphylococcus aureus* lớn nhất là 23, ít hơn so với chế phẩm TAD [55].

Chế phẩm TAD có khả năng kháng chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở tất cả các nồng độ. Đường kính giảm dần khi nồng độ cao giảm xuống. Đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất là 28,67 mm (Chế phẩm gốc) và nhỏ nhất là 8,8 mm (nồng độ 0,01 g/ml). Vậy ở nồng độ gốc và nồng độ 0,01 g/ml thì chế phẩm TAD có khả năng kháng khuẩn *Staphylococcus mutans* là tốt nhất.

Vậy có thể nói chế phẩm TAD sẽ đạt hiệu quả cao trong điều trị VDCĐ và kháng khuẩn tốt với *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus mutans* khi để sử dụng chế phẩm gốc hoặc pha loãng chế phẩm ở tỉ lệ $\leq 0,01$ g/ml.

Phương pháp đếm khuẩn lạc cho phép xác định số lượng tế bào vi sinh vật còn sống hiện diện trong mẫu. Đây là 1 trong những phương pháp tốt để xác định mật độ tế bào sống. Ngoài ra phương pháp này còn có ưu điểm là độ nhạy cao, cho phép định lượng vi sinh vật ở mật độ thấp trong mẫu, được sử dụng rộng rãi trong kiểm nghiệm vi sinh vật trong nước, thực phẩm, bệnh phẩm [60].

Sau nghiên cứu, ta thấy chế phẩm TAD có khả năng tiêu diệt 100% vi khuẩn *Streptococcus mutans* ATCC 35668 và *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ở các nồng độ: 0,05, 0,1 và 1g/ml ở cả hai thời gian ủ là 15 phút và 30 phút. Tuy nhiên ở nồng độ 0,02 và 0,01 thì không còn khả năng diệt khuẩn hoàn toàn ở cả thời gian ủ 15 phút và 30 phút. MIC của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* ATCC 35668 và *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ở các nồng độ ủ 15 phút và 30 phút đều là nồng độ pha loãng 0,05 g/ml.

Vậy có thể nói chế phẩm TAD sẽ đạt hiệu quả cao trong điều trị VDCĐ và

kháng khuẩn tốt với *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus mutans* khi ngâm tẩm thương từ 15 phút đến 30 phút.

Nghiên cứu pha chế dung dịch Nano bạc trong ethanol của Lê Thị Tường Vi, 2021 về Dung dịch thử nghiệm kết hợp Ethanol 30,4% và Nano bạc 1,53 ppm có khả năng ức chế hoàn toàn E.coli ngay khi vừa tiếp xúc và ở mọi thời gian ủ. Đối với S.aureus, khả năng ức chế có được sau khi ủ 15 phút [55].

Một nghiên cứu của Sato và cộng sự năm 1997 đã chỉ ra rằng hợp chất xanthatin được phân lập từ Lá móng cho thấy tiềm năng chống lại mạnh mẽ các loài *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus mutans* [13]. Và ở đây Cao tiêu viêm trị độc – TAD (Chế phẩm TAD) có thành phần Lá móng cũng đạt được kháng khuẩn với 2 chủng vi khuẩn trên và có khả năng kháng đến nồng độ pha loãng 0,01g/ml.

Một số hợp chất từ cây Lá móng có tác dụng ức chế *Staphylococcus aureus* với đường kính kháng khuẩn dao động từ 15 đến 26mm ở nồng độ 0,06-0,08mg/MI [75]. Vậy đường kính kháng của chế phẩm TAD cao hơn so với hợp chất phân lập từ Lá móng với chủng *Staphylococcus aureus*.

4.3. Về tính chống viêm, giảm ngứa của Chế phẩm TAD

4.3.1. Tính chống viêm

Dầu croton có chứa 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) và các ester phorbol khác là các tác nhân gây kích ứng mạnh. Dầu croton thường dùng như một tác nhân gây viêm trong các mô hình thực nghiệm trên chuột nhất để đánh giá tác động kháng viêm da của các chất/chế phẩm dùng ngoài [76].

Vì có hoạt tính kích ứng ngoài da mạnh nên dầu croton được sử dụng để nghiên cứu các chất chống viêm. Cơ chế gây kích ứng da của dầu croton được giải thích thông qua phospholipase A2 (PLA2). Dầu croton làm tăng

hoạt tính của PLA2 dẫn tới tăng tạo acid arachidonic và sau đó là các yếu tố liên quan tới quá trình viêm như leucotrien và prostaglandin. Cơ chế gây kích ứng da của dầu croton có sự tham gia hoạt hóa của hai hệ enzym là cyclooxygenase (COX) và lipooxygenase (LOX). Mô hình này đã được nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới sử dụng để đánh giá tác dụng chống viêm của các thuốc hoặc dược chất [28].

Mô hình này được xây dựng dựa trên nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của VDCĐ, bệnh có thể xuất hiện hoặc nặng lên khi BN tiếp xúc với các dị nguyên như mỹ phẩm, các thuốc bôi, một số chất tiếp xúc trong môi trường làm việc hoặc sinh hoạt cũng có thể gây viêm da. Và dựa trên biểu hiện lâm sàng của bệnh VDCĐ, bệnh xuất hiện với nhiều đợt cấp xen kẽ mạn tính, giai đoạn cấp tính bệnh có thể biểu hiện chỉ là những dát đỏ, hoặc giai đoạn chảy nước, xuất tiết thì thương tổn thường bị tẩy đỏ, phù nề [28].

Clobetason (một loại corticoid) được sử dụng để làm thuốc đối chứng dương. Corticoid đã được chứng minh là có tác dụng mạnh nhất trên mô hình viêm cấp bằng dầu croton [28].

Nghiên cứu sử dụng dầu croton để thực hiện, kết quả cho thấy tác dụng chống viêm của chế phẩm TAD khi bôi 2 lần cách thời điểm bôi croton 1 giờ và 3 giờ tương tự hiệu quả chống viêm của Clobetason. Thậm chí, hiệu quả của chế phẩm TAD còn tăng thêm khi bôi thêm 1 lần nữa cách thời điểm bôi croton 5 giờ.

Sau 6 giờ bôi croton thu được kết quả, mức độ ức chế viêm của Clobetasol so với lô mô hình là 61,76% còn mức độ ức chế viêm của hai lô bôi chế phẩm TAD 2 lần và 3 lần so với lô mô hình lần lượt là 32,98% và 33,98%. Đây cũng là kết quả có ý nghĩa đối với điều trị bệnh VDCĐ.

Như vậy, với bệnh VDCĐ là một bệnh viêm da mạn tính hay tái phát, nếu dùng thuốc chống viêm lâu dài thì sẽ có nhiều tác dụng phụ đặc biệt là

corticoid, do vậy nếu sử dụng lâu dài chế phẩm TAD dường như cũng là một ưu thế trong điều trị VDCĐ.

Nghiên cứu của Nguyễn Mạnh Tuyên và các cộng sự năm 2017 có nghiên cứu về tính chống viêm của Viên nang hỗ trợ điều trị Eczema và Cao đặc EZ có đưa ra Hoàng bá có tác dụng chống viêm trên chuột nhắt trắng [77].

Kruti M.Patel, Pratik R.Patel nghiên cứu về tính chống viêm của chiết xuất lá dạng nước của Lá móng đã phát hiện tác dụng làm giảm phù chân của chế phẩm thử trên mô hình gây phù chân chuột cống bằng carrageenin với liều uống 250 mg/kg. Chiết xuất lá móng methanol cũng cho thấy hoạt động chống viêm đáng kể ($p < 0,01$) trong thử nghiệm gây quặn đau bằng acid axetic gây ra ở chuột nhắt [75].

4.3.2. Tính giảm ngứa

Sử dụng Compound 48/80 là sản phẩm polymer hóa của n-methyl-p-methoxy-phenethylamine với formaldehyde từ 3-6 đơn phân có vai trò là một dị nguyên kích ứng giải phóng histamin từ tế bào mast, từ đó kích thích tế bào mast giải phóng tiếp các chất trung gian gây biểu hiện dị ứng. Compound 48/80 khi dùng liều thấp có thể gây ra tình trạng phù ngứa nên thường được sử dụng trong các mô hình dị ứng, giảm ngứa [77].

Sau nghiên cứu cho thấy, clobetason và chế phẩm TAD đều có xu hướng làm giảm số lần gãi trung bình trong 30 phút so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được quan sát thấy với lô bôi clobetason.

Theo nghiên cứu của Nguyễn Mạnh Tuyên và các cộng sự năm 2017 nghiên cứu về tính chống viêm của Viên nang hỗ trợ điều trị Eczema và Cao đặc EZ có đưa ra Hoàng bá có tác dụng chống dị ứng, giảm ngứa trên chuột nhắt trắng do compound 48/80 gây ra [77].

Dựa trên tổng số cơn ngứa được ghi nhận trong 30 phút, chế phẩm TAD có xu hướng làm giảm số lần gãi trung bình trong 30 phút so với lô mô hình, xu hướng tác dụng cũng rõ hơn khi TAD được bôi 3 lần so với bôi 2 lần/ngày. Bên cạnh tác dụng chống viêm, dược liệu Hoàng bá có mặt trong TAD còn được chứng minh tác dụng ngăn chặn sự giải phóng các chất trung gian gây viêm từ tế bào mast, một trong những tác nhân gây viêm và ngứa ở VDCĐ [27]. Dược liệu Ké đầu ngựa cũng cho thấy hiệu quả vừa ức chế giải phóng histamin, IgE vừa có tính chống viêm thông qua việc ức chế sản xuất TNF- α , IL-1 β , IL-5 và IL-6 bằng đường uống [78].

KẾT LUẬN

1. Nghiên cứu tính kích ứng da của Chế phẩm TAD

- Da thỏ hoàn toàn bình thường, khỏe mạnh, không bất cứ biểu hiện dị ứng hay viêm nào trong suốt thời gian đặt mẫu với chế phẩm TAD.
- Chế phẩm TAD an toàn với da thỏ ở mức liều đã thử nghiệm.

2. Nghiên cứu tính kháng khuẩn, chống viêm, giảm ngứa của Chế phẩm TAD

Tính kháng khuẩn:

- Chế phẩm TAD có khả năng kháng 2 chủng vi *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở tất cả các nồng độ thử, khả năng kháng tốt nhất ở nồng độ 1g/ml và có khả năng kháng đến nồng độ 0,01 g/ml.
- Nồng độ kháng khuẩn tối thiểu (MIC) của chế phẩm TAD trên 2 chủng vi *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở thời gian ủ 15 phút và 30 phút đều là nồng độ 0,05 g/ml.

Tính chống viêm:

- Chế phẩm TAD bôi 2 lần/ngày và 3 lần/ngày đã thể hiện tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây viêm tai cấp bằng dầu croton thông qua khả năng làm giảm độ dày tai và trọng lượng tai so với lô mô hình. Chế phẩm TAD bôi 3 lần thể hiệu quả chống viêm tốt hơn khi bôi 2 lần.

Tính giảm ngứa:

- Chế phẩm TAD bôi 2 lần/ngày và 3 lần/ngày liên tục trong 5 ngày có xu hướng làm giảm ngứa trên mô hình gây ngứa bằng compound 48/80 liều 100 µg/chuột, thể hiện ở xu hướng làm giảm tổng số lần gãi của chuột trong 30 phút so với lô mô hình.

KIẾN NGHỊ

Mặc dù đã thu được một số kết quả khả quan, nhưng do thời gian và kinh phí có hạn nên nghiên cứu mới chỉ tập trung đánh giá được tính kích ứng da, kháng khuẩn và chống viêm, giảm ngứa.

Để có thể tiếp tục phát triển Chế phẩm TAD, chúng tôi xin đề xuất một số khuyến nghị sau:

+ Nghiên cứu tính kháng nấm của Chế phẩm TAD nhằm giúp điều trị những trường hợp VDCĐ có kết hợp nhiễm nấm.

+ Nghiên cứu tác dụng trong điều trị VDCĐ của Chế phẩm TAD trên lâm sàng nhằm làm rõ tác dụng của chế phẩm trong các chứng bệnh cụ thể theo YHCT.

+ Hiện đại hóa chế phẩm TAD để chế phẩm được ứng dụng tốt hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Trần Hậu Khang** (2019), “*Bệnh học da liễu tập 1*”, NXB Y học, 90-98.
2. **Avena-Woods C.** (2017), “*Overview of atopic dermatitis*”, Am J Manag Care, 23, 115-123.
3. **Phạm Văn Hiến** (2001), “*Tình hình chàm thể tạng tại Viện da liễu từ 1995 – 2000*”, Nội san da liễu, số 3, 1–9.
4. **Hanifin J.M.** (1993), “*Atopic dermatitis, Eczema*”, 1582-1603.
5. **Leung D.Y.M** (2000), “*Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention*”, J Allergy Clin Immunol, 105, 860-876.
6. **Williams H, Robertson C, Stewart A et al** (1999), “*Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood*”, J Allergy Clin Immunol, 103.
7. **Bộ y tế** (2008), “*Bệnh học ngoại – phụ Y học cổ truyền*”, NXB Y học, 75-89.
8. **Lê Kinh Duệ** (2000), “*Những hiểu biết hiện nay về atopy và viêm da atopy*”, Nội san da liễu, số 1,1–9.
9. **Holden C.A., Parish W.E.** (1998), “*Atopic dermatitis*”, Textbook of dermatology, 6th edition, Rook/Wilkinson/Ebling. Blackwell science, 681 – 708.
10. **Anold H.L et al** (1990), “*Atopic dermatitis*”, Andrew’s diseases of the skin, 68 – 74.
11. **Saito H.** (2005), “*Much atopy about the skin: genome-wide molecular dermatitis*”, Dermatology, 189(1), 41-46.

12. **Cuéllar M.J et al** (2001), “*Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders*”, *Fitoterapia*, vol.72, no.3, 221–229.
13. **Parish W.E., Breathnach S.M.** (1998), “*Clinical immunology and allergy*”, *Textbook of dermatology*, 277 – 336.
14. **Odhiambo JA et al** (2009), “*Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three*”, *J Allergy Clin Immunol*, 124(6), 1251-1258.
15. **Bộ môn Da liễu, ĐHY Hà Nội** (1992), “*Bệnh chàm. Bệnh da liễu*”, NXB Y học, 173–191.
16. **Đỗ Thị Thu Hiền (2016)**, “*Cơ chế bệnh sinh và chẩn đoán VDCĐ*”, <https://dalieu.vn/co-che-benh-sinh-va-chan-doan-viem-da-co-dia-d3306.html>.
17. **Kim J, Kim BE, Leung DYM** (2019), “*Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications*”, *Allergy Asthma Proc*, 1, 40(2), 84-92.
18. **David Boothe W, Tarbox JA, Tarbox MB** (2017), “*Atopic Dermatitis: Pathophysiology*”, *Adv Exp Med Biol*, 1027, 21-37.
19. **Bộ y tế** (2015), “*Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị các bệnh da liễu*”, 114-118.
20. **Nguyễn Thê Thịnh** (2016), “*Bệnh học ngoại khoa y học cổ truyền*, ” tr. 112-128.
21. **Sheehan MP et al** (1992) “*Efficacy of traditional Chinese herbal therapy in adult atopic dermatitis*”.
22. **Yan Fenggen et al** (2020), “*The formulae and biologically active ingredients of Chinese herbal medicines for the treatment of atopic dermatitis*”, *Biomed Pharmacother*, 127.

23. **Meng Yuan-Cui, Fan JC, Bian WN** (2022), “*Effectiveness of calamine lotion as an adjunctive therapy to mometasone furoate ointment in the treatment of infant eczema: A retrospective study*”, *Medicine* (Baltimore), 101(35).
24. **Park Beom-Chan et al** (2021), “*Effect of Coptischinensis, Glycyrrhiza uralensis, and Fermented Glycine max Extract as Proactive Therapy for Atopic dermatitis*”.
25. **Chen Yunlong** (2016), “*Anti-inflammatory and anti-allergic effects and underlying mechanisms of Huang-Lian-Jie-Du extract: Implication for atopic dermatitis treatment*”.
26. **Seon Gyeong Bak** (2023), “*Effects of Vigna angularis extract and its active compound hemiphloin against atopic dermatitis-like skin inflammation*”.
27. **Nguyễn Thị Phượng** (2015), “*Đánh giá tác dụng của bài thuốc Tứ vật tiêu phong ẩm trong điều trị viêm da cơ địa*”.
28. **Đỗ Thị Kim Chung** (2012), “*Đánh giá một số tác dụng dược lý của chế phẩm Viêm da AD trên thực nghiệm*”, Luận văn thạc sĩ y học.
29. **Bộ y tế** (2005), “*Dược điển Việt Nam*”, NXB Y học.
30. **Đỗ Tất Lợi** (2004), “*Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*”, NXB Y học.
31. **Ben Chung Lap Chan** (2008), “*Traditional Chinese medicine for atopic eczema: PentaHerbs formula suppresses inflammatory mediators release from mast cells*”.
32. **Tsang Mirida , D. Jiao, B. Chan et al** (2016), “*Anti-inflammatory activities of pentaherbs formula, berberine, gallic acid and chlorogenic acid in atopic dermatitis-like skin inflammation*”, *Molecules*, vol. 21, no. 4, 519.
33. **Kim B.Y et al** (2015), “*Berberine reduce allergic inflammation in a house dust mite allergic rhinitis mouse model*”, *Rhinology*.

34. **Trần Văn Kỳ** (2004), “*Tuệ Tĩnh toàn tập*”, Nhà xuất bản Y học, 323-325.
35. **Bá Thị Dương** (2016), “*Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các chất phân lập được từ cây Đại hoàng*”, Luận văn thạc sỹ ngành kỹ thuật hóa học Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.
36. **Nguyễn Nhược Kim** (2009), “*Phương tế học*”, Nhà xuất bản y học, Hà Nội, 185.
37. **Li Zhiguo et al** (2020), “*Genipin attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis via suppressing inflammatory and oxidative responses*”, *Inflammopharmacology*, vol.28, no.1, 333–339.
38. **Li Rong Sun et al** (2007), “*Cimicifoetisides A and B, two cytotoxic cycloartane triterpenoid glycosides from the rhizomes of Cimicifuga foetida, inhibit proliferation of cancer cells*”, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, vol.3, no.3.
39. **Y Kimura, M. Sumiyoshi, and M. Sakanaka** (2012), “*Effects of ginsenoside Rb(1) on skin changes*”, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, 11.
40. **Nguyễn Phương Anh** (2004), “*Nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp chế biến đến tác dụng sinh học của vị thuốc Đại hoàng*”, Khóa luận tốt nghiệp dược sỹ ĐH khóa 1999-2004 Trường Đại Học Dược Hà Nội.
41. **Đỗ Thị Thanh Thủy** (2008), “*Nghiên cứu thiết lập chất chuẩn Emodin từ Đại hoàng phục vụ công tác kiểm tra chất lượng thuốc*”, Luận văn thạc sỹ dược học chuyên ngành kiểm nghiệm thuốc và độc chất Trường Đại học dược Hà Nội.
42. **Daiane S.Alves et al** (2004), “*Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin*”, *Biochemica Parmacology*, 68 (3), 549-561.

43. **Trần Đức Long** (2004), “*Góp phần nghiên cứu cây Hoàng đằng (fibraurea tinctoria lour) thuộc họ tiết dê (menispermaceae) mọc hoang ở 1 số vùng ở Nghệ An*”, Khóa luận tốt nghiệp Trường Đại học Vinh.
44. **Seaman, Frederick C** (1982), “*Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae*”, The Botanical Review, 48(2), 121-594
45. **Vasas A, Hohmann J** (2011), “*Xanthane sesquiterpenoids: structure, synthesis and biological activity*”, Natural Product Reports, 28(4), 824-842
46. **Sato Y et al** (1997), “*A Xanthanolide with Potent Antibacterial Activity against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*”, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 49(10), 1042-1044.
47. **Devkota A, Das RK** (2015), “*Antibacterial Activities of Xanthium Strumarium L.* ”, Journal of Natural History Museum, 29, 70-77.
48. **Kim DK, Shim CK, Bae DW, Kawk YS, Yang MS, Kim HK** (2002), “*Identification and biological characteristics of an antifungal compound extracted from Cocklebur (Xanthium Strumarium) against Phytophthora drechsleri*”, The Plant Pathology Journal, 18 (5), 288-292.
49. **Parveen Z et al** (2017), “*Chemical composition and antifungal activity of essential oil from Xanthium strumarium L. leaves*”, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 79(2), 316-321.
50. **Bé Thị Thuần, Trương Văn Như, Nguyễn Duy Khang** (1991), “*Tạp chí dược học, số 1, 11-12,16-17.*
51. **Phan Tổng Sơn, Lê Huyền Trâm, Phan Minh Giang** (2002), “*Đóng góp vào việc nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học cây khố sâm cho lá (Croton tonkinensis Gagnep, Euphorbiaceae)* ”, Tạp chí Hoá học, 40 (Số ĐB), 53-57.
52. **Đinh Thị Thu Hiền** (2010), “*Các hợp chất Triterpenoit phân lập từ cây*

- lá móng tay Lawsonia inermis*”, Tạp chí khoa học và công nghệ các trường Đại học.
53. **Bùi Thị Hồng** (2010), “*Nghiên cứu thành phần flavonoid của cây lá móng tay Lawsonia Inermis L*”, Luận văn thạc sỹ khoa học hóa hữu cơ trường Đại học Bách khoa Hà Nội.
 54. **K.R.Mewes et al** (2016), “*Catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis*”, Toxicology in Vitro, 238-253.
 55. **Đỗ Thị Bích Trà** (2023), “*Nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn in vitro của cao giàu alkaloid chiết từ hạt cau*”, Luận văn tốt nghiệp Dược sĩ Đại học Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam
 56. **Kalpesh R Patil et al** (2019), “*Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals*”, Int J Mol Sci. 2019 Sep 5;20(18):4367.
 57. **Hans Gerhard Vogel** (2008), “*Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*”, Chapter P, 1956-1958.
 58. **Organisation for Economic Co-operation and Development** (1981), “*OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*”, 4, 410.
 59. **Ana Gallegos Saliner, Grace Patlewicz & Andrew P. Worth** (2007), “*Review of Literature – Based Model*”.
 60. **Trần Linh Thuớc** (2006), “*Phương pháp phân tích vi sinh vật*”, 65.
 61. **Meyer-Bertenrath** (1969), “*150 years of croton oil research*”, Experientia, 25: (1) 1 – 5.
 62. **McColl SR, Hurst NP & Cleland LG** (1986), “*Modulation by phorbol myristate acetate of arachidonic acid release and leukotriene syn-thesis by human polymorphonuclear leukocytes stimulated with A23187*”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 141: 399-404.
 63. **Ashendel GL & Boutwell RK** (1979), “*Prostaglandin E and F levels*

- in mouse epidermis are increased by tumor promoting phorbol esters*”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 90: 623-627.
64. **Orley DULCETTI JUNIOR, Vanesa Celeste ANDREUCCI, Ildenize Barbosa da Silva CUNHA, Carlos Eduardo Pulz ARAUJO, Fernando de OLIVEIRA & Maria Cristina MARCUCCI** (2004), “*Investigation of the Anti-inflammatory and Analgesic Activities of a Sample of Brazilian Propolis*”, Acta Farm. Bonaerense, 23 (3): 285-91.
 65. **A.C.B. Paula, L.S.S. Hayash and J.C. Freitas** (2003), “*Anti-inflammatory and antispasmodic activity of Ipomoea imperati (Vahl) Griseb (Convolvulaceae)*”, Pharmacological effects of Ipomoea imperati Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 36: 105-112.
 66. **Ezequiel Paulo Viriato, Erica Silva Bianchetti, Kelém Costa dos Santos et al** (2009), “*Study of high dilutions of copaiba oil on inflammatory process*”, Int J High Dilution Res, 8(26): 9-14.
 67. **A. Tubaro, P. Dri, G. Delbello, C. Zilli, R. Della Loggia** (1985), “*The croton oil ear test revisited*”, Agents and Actions, 17: (3-4) 347 – 349.
 68. **Antwi AO, Obiri DD, Osafo N, Essel LB, Forkuo AD, Atobiga C** (2018), “*Stigmasterol Alleviates Cutaneous Allergic Responses in Rodents*”, Biomed Res Int. 2018;2018:3984068. doi: 10.1155/2018/3984068.
 69. **Zhang L, Zhang JT, Huang Y, Zhou GK, Zhou Y, Yang JP, Liu T.** “*Melatonin attenuates acute and chronic itch in mice: the antioxidant and anti-inflammatory effects of melatonin receptors*”, Ann Transl Med. 2022;10(18):972. doi: 10.21037/atm-22-3804.
 70. **Gerhard Vogel H** (2008). “*Chapter H: Analgesic, anti-inflammatory,*

- anti- pyretic activity*”, Drug discovery and evaluation Pharmacological assays, Springer, 669-774.
71. **Patil KR, Mahajan UB, Unger BS, et al.** “*Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals*”, Int J Mol Sci. 2019;20(18):4367. doi:10.3390/ijms20184367.
 72. **Barbosa AG, Oliveira CD, Lacerda-Neto LJ, et al** (2017), “Evaluation of chemical composition and antiedematogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth”. Saudi J Biol Sci, 24(2):355-361.
 73. **Nguyễn Ngọc Tuấn, Lê Quốc Chiểu, Nguyễn Thái Biêng** (2022), “*Nghiên cứu tính kích ứng da của gel nano berberin trên da lành của động vật thực nghiệm*”, Tạp chí Y học Thảm họa và Bông số 2.
 74. **Shuyi Ning và cộng sự** (2022), “*Botanical Drugs in Traditional Chinese Medicine With Wound Healing Properties*”.
 75. **Kruti M. Patel, Pratik R. Patel.** “*Review on Lawsonia inermis Linn: An Update*”. Asian J. Pharm. Tech. 2017; 7 (4): 237-250. doi: 10.5958/2231-5713.2017.00036.8.
 76. **Huỳnh Ngọc Trinh, Tống Minh Tâm** (2015), “*Mô hình viêm tai chuột nhắt trắng bằng dầu ba đậu – Khảo sát tác dụng kháng viêm của cao chiết từ lá tía tô (Perilla frutescens L.)*”, Tạp chí Dược học, tập 55, số 12.
 77. **Nguyễn Mạnh Tuyển và cộng sự** (2017), “*Đánh giá tác dụng chống viêm dị ứng và làm bền tế bào mast của cao đặc EZ trên thực nghiệm*”, Tạp chí Y học Việt Nam.
 78. **Nam-Gil Gwak và cộng sự** (2015). *Xanthii Fructus inhibits allergic response in the ovalbumin-sensitized mouse allergic rhinitis model*, Pharmacogn Mag.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM TAD

1. ĐẶC ĐIỂM THÀNH PHẨM

1.1. Công thức bào chế: Cho 1 chai 250ml

Nguyên liệu	Số lượng	Nguyên liệu	Số lượng
Hoàng bá	41,67g	Ké đầu ngựa	41,67g
Đại hoàng	41,67g	Khổ sâm	41,67g
Hoàng đằng	41,67g	Lá móng	41,67g
Nước tinh khiết	Vừa đủ		

1.2. Dạng thuốc: Cao lỏng

1.3. Tiêu chuẩn:

1.3.1. Tính chất: Chất lỏng hơi sánh, màu vàng nâu, mùi thơm dược liệu.

1.3.2. Độ trong và độ đồng nhất: Sánh, đồng nhất, không có váng mốc, cặn bã dược liệu và vật lạ.

1.3.3. Thể tích: Không dưới thể tích ghi nhãn.

1.3.4. Tỷ trọng (ở 20°C) : 0,90 - 1,15.

1.3.5. Kim loại nặng: Không được quá 20 phần triệu.

1.3.6. Định tính: Chế phẩm phải thể hiện phép thử định tính của Hoàng bá, Đại hoàng, Hoàng đằng, Khổ sâm.

1.4. Công dụng:

- Điều trị các bệnh ngoài da: viêm da cơ địa, eczema, nấm da, zona, trứng cá,...

1.5. Liều lượng, cách dùng:

- Viêm da cơ địa, nấm da: Pha 100ml với 1000ml nước sạch, ngâm vùng tổn thương 30p vào buổi tối.

- Trứng cá, viêm da cơ địa, nấm da, zona, eczema: bôi vùng tổn thương 2 lần/ ngày

1.6. Đóng gói: Chai 250ml nút kín.

1.7. Bảo quản: Bảo quản nơi khô mát.

1.8. Hạn dùng: 12 tháng kể từ ngày sản xuất.

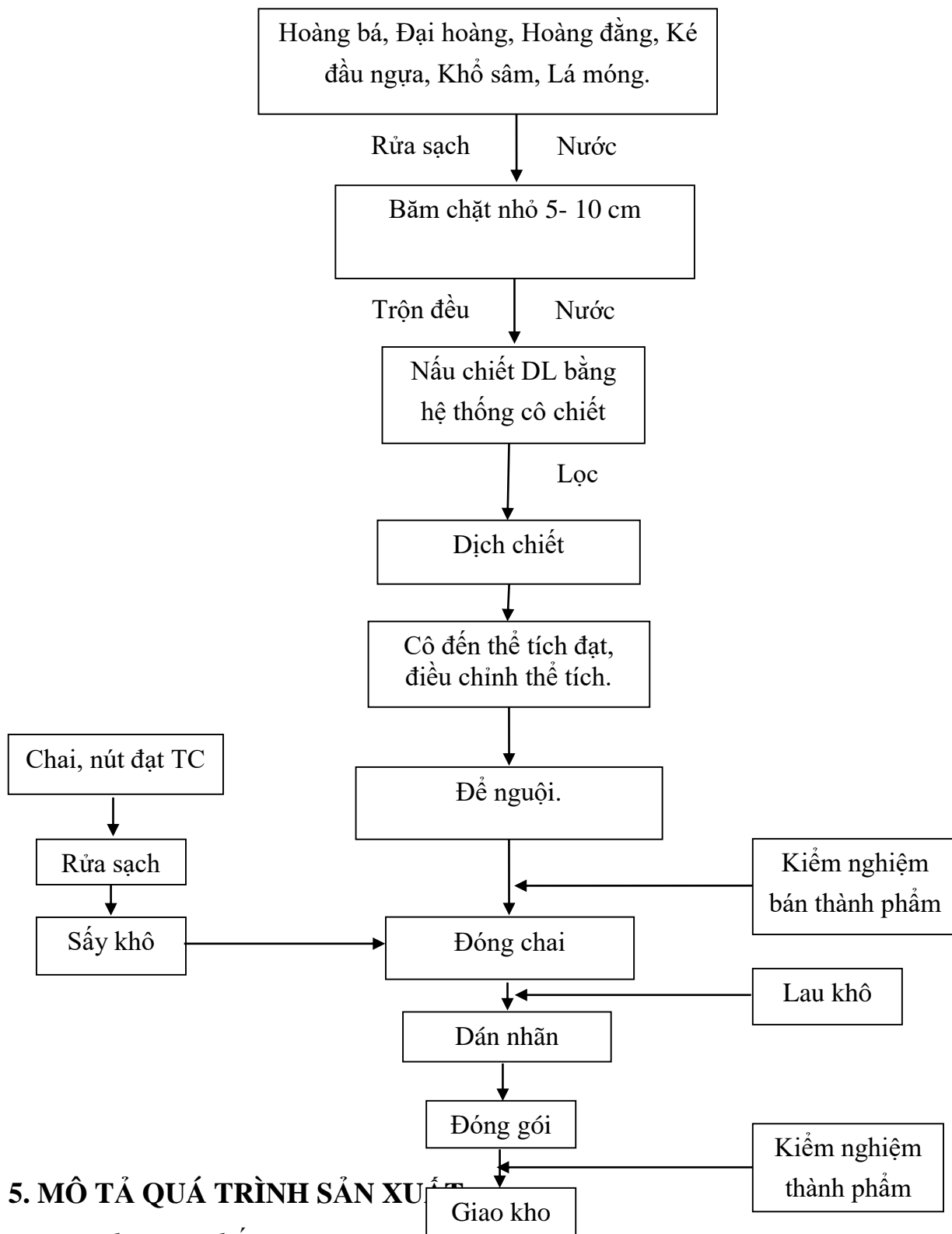
2. ĐẶC ĐIỂM NGUYÊN PHỤ LIỆU

STT	TÊN NGUYÊN LIỆU	ĐẠT TIÊU CHUẨN
1	Hoàng bá	Đạt tiêu chuẩn ĐĐVN V.
2	Hoàng đằng	Đạt tiêu chuẩn ĐĐVN V.
3	Đại hoàng	Đạt tiêu chuẩn ĐĐVN V.
4	Ké đầu ngựa	Đạt tiêu chuẩn ĐĐVN V.
5	Lá móng	Đạt tiêu chuẩn ĐĐVN V.
6	Khổ sâm	Đạt tiêu chuẩn ĐĐVN V.
6	Nước tinh khiết	Đạt tiêu chuẩn ĐĐVN V.

3. MÁY MÓC, THIẾT BỊ

STT	Tên máy móc thiết bị	ĐVT	Số lượng
1	Hệ thống chiết xuất	Hệ thống	01
2	Hệ thống cô chân không	Hệ thống	01
3	Cân kỹ thuật	Cái	01
4	Cân đĩa	Cái	01
5	Ống đồng các loại	Cái	02
6	Xô Inox	Cái	04
7	Cốc thủy tinh	Cái	01
8	Túi lọc	Cái	01

4. SƠ ĐỒ CÁC GIAI ĐOẠN SẢN XUẤT



5. MÔ TẢ QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT

Giai đoạn sơ chế:

- Lựa chọn nguyên liệu: Để loại bỏ những bộ phận không dùng, không

đủ tiêu chuẩn làm thuốc. Tạo ra sự đồng đều về mặt kích thước.

- Rửa: Nhằm làm sạch, làm mềm nguyên liệu để thuận tiện cho việc thái phiến, định hình nguyên liệu.

- Sấy: Nguyên liệu được cho vào các khay và tiến hành sấy trong tủ sấy. Nhiệt độ sấy được cài ở 70°C.

Giai đoạn chiết xuất

- Cho dược liệu đã sơ chế vào nồi nấu tuần hoàn.

- Gài vỉ nồi nấu. Đổ dung môi ngập dược liệu khoảng 20 cm

- Vận hành nồi nấu, mở van hơi từ từ, cấp hơi vào nồi chiết.

- Các thông số của quá trình chiết xuất:

+ Dung môi chiết: Nước tinh khiết

+ Thời gian chiết mỗi lần: 2h / 3 dịch

+ Nhiệt độ chiết xuất: 100°C

- Rút dịch chiết, lắng, lọc.

Các tiểu phân, các tạp chất không tan, tủa hoặc vẩn đục lơ lửng trong dịch chiết, sẽ lắng xuống sau một thời gian. Thời gian để lắng tỷ lệ nghịch với kích thước của tiểu phân và hiệu số tỷ trọng của các tiểu phân chất rắn với dịch chiết, tỷ lệ thuận với độ nhớt của dịch chiết. Các tạp chất tan trong dịch chiết cần phải loại bằng nhiều cách khác nhau. Dịch chiết sau khi để lắng, gạn lọc qua vải lọc. Thu lấy dịch trong.

- Tiếp tục bổ sung dung môi. Số lần chiết xuất: 3 lần

- Chế phẩm TAD thu được có tỷ lệ (01 ml cao lỏng tương ứng với 01 g nguyên liệu), thêm chất bảo quản.

- Đóng gói, dán nhãn, bảo quản: Dán nhãn đúng quy chế, bảo quản nơi thoáng mát, khô ráo, nhiệt độ ít thay đổi.

- Kiểm nghiệm thành phẩm: Kiểm nghiệm theo Tiêu chuẩn cơ sở.

6. PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT VÀ KIỂM NGHIỆM

6.1. Kiểm soát nguyên liệu

Giai đoạn kiểm tra	Nội dung kiểm tra	Số lần kiểm tra	Thời gian kiểm tra	Phương pháp kiểm tra	Người kiểm tra
Nguyên phụ liệu	Đúng loại, tạp chất chỉ trong giới hạn cho phép, không mốc	01	Khi nhận từ kho chính	Cảm quan, đối chiếu với tiêu chuẩn.	Phụ trách kỹ thuật SX + CB được phân công thực hiện.
Cân, đong	Công thức, trọng lượng, thể tích	01	Trước khi sơ chế	3 kiểm tra 3 đối chiếu	Phụ trách kỹ thuật SX + CB được phân công thực hiện

6.2. Kiểm tra bán thành phẩm, bao bì, nhãn.

Giai đoạn kiểm tra	Nội dung kiểm tra	Số lần kiểm tra	Thời gian kiểm tra	Phương pháp kiểm tra	Người kiểm tra
Bán thành phẩm	Màu sắc, mùi vị, độ trong, độ đồng nhất, tỉ trọng, giới hạn kim loại nặng	01	Trước khi đóng chai	Kiểm tra theo TCCS	Người lấy mẫu: Cán bộ phụ trách chất lượng.
Bao bì, nhãn	Đúng quy chế	01	Trước khi đóng chai	Cảm quan đối chiếu với nhãn gốc	Cán bộ kỹ thuật + Người được phân công thực hiện

6.3. Kiểm tra thành phẩm, đóng gói, nhập kho.

Giai đoạn kiểm tra	Nội dung kiểm tra	Số lần kiểm tra	Thời gian kiểm tra	Phương pháp kiểm tra	Người kiểm tra
Thành phẩm	Màu sắc, mùi vị, độ trong, độ đồng nhất, tỉ trọng, giới hạn kim loại nặng, định tính	01	Trước khi đóng chai	Gửi mẫu Trung tâm kiểm nghiệm để kiểm tra theo TCCS	Người lấy mẫu: cán bộ phụ trách chất lượng
Nhập kho	Đúng số lượng	01	Trước khi nhập kho	Đối chứng phiếu nhập kho	Thủ kho

7. ĐÓNG GÓI

Chai nhựa, nút rửa sạch, đem sấy nhẹ cho khô. Dung dịch thuốc đóng chai 250ml đã được xử lý, nút chặt, dán nhãn đúng quy chế.

8. VỆ SINH AN TOÀN LAO ĐỘNG

Phòng sản xuất phải được vệ sinh sạch sẽ trước và sau khi sản xuất

Máy móc phải được lau chùi sạch sẽ.

Khay chậu và các dụng cụ cần thiết phải được rửa sạch, sấy khô trước khi sản xuất.

Người sản xuất phải mặc trang phục, đội mũ, đeo khẩu trang đúng quy chế trong khi làm việc.

Máy móc thiết bị phải có nội quy sử dụng

Phụ lục 2: TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

BỆNH VIỆN YHCT TW	CHẾ PHẨM TAD	Số TC:
		Có hiệu lực kể từ ngày ký

1. YÊU CẦU KỸ THUẬT

1.1. Công thức điều chế cho 250 ml chế phẩm:

Hoàng bá (vỏ thân)	Bốn mươi một phẩy sáu mươi bảy gam	41,67g
Đại hoàng (thân rễ)	Bốn mươi một phẩy sáu mươi bảy gam	41,67g
Hoàng đằng (thân và rễ)	Bốn mươi một phẩy sáu mươi bảy gam	41,67g
Ké đầu ngựa (quả)	Bốn mươi một phẩy sáu mươi bảy gam	41,67g
Khổ sâm (lá và cành)	Bốn mươi một phẩy sáu mươi bảy gam	41,67g
Lá móng (lá)	Bốn mươi một phẩy sáu mươi bảy gam	41,67g
Nước tinh khiết	Vừa đủ hai trăm năm mươi mililit	Vđ 250 ml

1.2. Nguyên liệu:

Hoàng bá (vỏ thân)	<i>Cortex Phellodendri</i>	Đạt tiêu chuẩn ĐĐVN V
Đại hoàng (thân rễ)	<i>Rhizoma Rhei</i>	Đạt tiêu chuẩn ĐĐVN V
Hoàng đằng (thân và rễ)	<i>Caulis et Radix Fibraureae</i>	Đạt tiêu chuẩn ĐĐVN V

Ké đầu ngựa (quả)	<i>Fructus Xanthii strumarii</i>	Đạt tiêu chuẩn DĐVN V
Khỏ sâm (lá và cành)	<i>Folium et Ramulus Crotonis tonkinensis</i>	Đạt tiêu chuẩn DĐVN V
Lá móng (lá)	<i>Folium Lawsoniae</i>	Đạt tiêu chuẩn DĐVN V
Nước tinh khiết	<i>Aqua purificata</i>	Đạt tiêu chuẩn DĐVN V

1.3. Chất lượng thành phẩm:

1.3.1. Tính chất: Chất lỏng hơi sánh, màu vàng nâu, mùi thơm dược liệu.

1.3.2. Độ trong và độ đồng nhất: Sánh, đồng nhất, không có váng mốc, cặn bã dược liệu và vật lạ.

1.3.3. Thể tích: Không dưới thể tích ghi nhãn.

1.3.4. Tỷ trọng (ở 20⁰C) : 0,90 - 1,15.

1.3.5. Kim loại nặng: Không được quá 20 phần triệu.

1.3.6. Định tính: Ché phẩm phải thể hiện phép thử định tính của Hoàng bá, Đại hoàng, Hoàng đằng, Khỏ sâm.

1.3.7. Độ nhiễm khuẩn:

- Tổng số vi sinh vật hiếu khí: Không quá 10⁵ CFU/ml.
- Tổng số nấm: Không quá 10⁴ CFU/ml.
- Tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật: Không quá 10⁴ CFU/ml.
- Không được có *Salmonella sp.* trong 10 ml.
- Không được có *Escherichia coli* trong 1 ml.

1.3.8. Kích ứng da: Không kích ứng.

2. PHƯƠNG PHÁP THỬ

2.1. Tính chất: Kiểm tra bằng cảm quan, chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.

2.2. Độ trong và độ đồng nhất: Thử theo DĐVN V, phụ lục 1.1. Mục cao lỏng.

Lấy riêng phần phía trên của chai thuốc, chỉ để lại khoảng 10 ml đến 15 ml. Chuyển phần còn lại trong chai vào một bát sứ men trắng, nghiêng bát cho chảy trên thành bát tạo thành một lớp để quan sát. Quan sát dưới ánh sáng tự nhiên, thuốc phải đạt các yêu cầu quy định. Nếu không đạt, phải thử lại lần hai với chai thuốc khác, nếu không đạt, coi như lô thuốc không đạt chỉ tiêu này.

2.3. Thể tích: Thử theo DĐVN V, phụ lục 11.1 - “Giới hạn cho phép về thể tích của các thuốc dạng lỏng”.

2.4. Tỷ trọng (ở 20°C): Thử theo DĐVN V, phụ lục 6.5, phương pháp dùng tỷ trọng kế.

2.5. Kim loại nặng: Thử theo DĐVN V, phụ lục 9.4.8 – Phương pháp 3.

Tiến hành: Lấy 1,0 g chế phẩm, dùng 2 ml dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb để làm dung dịch mẫu đối chiếu.

2.6. Định tính:

2.4.1. Hoàng bá: Phương pháp sắc ký lớp mỏng (DĐVN V, phụ lục 5.4).

Dụng cụ, thuốc thử:

- Bản mỏng silica gel GF₂₅₄ trắng sẵn (Merck), hoạt hóa ở 100 °C trong 30 phút.

- n-butanol, acid acetic, ethanol (TT).

- Hệ dung môi triển khai sắc ký: n-butanol- acid acetic – nước (7 : 1:2)
- Quan sát bản mỏng dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 366 nm

Cách thử:

- *Dung dịch thử:* Lấy 3 ml chế phẩm, cô đến cạn, thêm 5 ml methanol, siêu âm 20 phút, để nguội, lọc được dung dịch chấm sắc ký.

- *Dung dịch đối chiếu:* Lấy 0,5 g Hoàng bá (mẫu chuẩn) đã cắt nhỏ hoặc nghiền thành bột, thêm 50 ml nước đun sôi nhẹ 1h, để nguội, lọc. Dịch lọc đem cô đến cạn, thêm 5 ml methanol, lắc siêu âm 20 phút, để nguội, lọc được dung dịch chấm sắc ký.

Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Triển khai sắc ký cho đến khi dung môi đi được khoảng 12-13 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng rồi quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm

Kết quả: Sắc ký đồ của mẫu thử phải cho các vết phát quang có cùng màu sắc và cùng giá trị R_f với các vết thu được trên sắc ký đồ của mẫu đối chiếu.

2.6.2. Hoàng đằng: Phương pháp sắc ký lớp mỏng (DĐVN V, phụ lục 5.4).

Dụng cụ, thuốc thử:

- Bản mỏng silica gel GF₂₅₄ trắng sẵn (Merck), hoạt hóa ở 100⁰C trong 30 phút

- Toluene, ethyl acetat, methanol, dung dịch amoniac đặc, ethanol tuyệt đối (TT).

- Hệ dung môi triển khai sắc ký:

Toluene – ethyl acetat – isopropanol – methanol – amoniac (6:3:1,5:1,5:0,5) (v/v).

- Thuốc thử hiện vết:

Thuốc thử 1: Dung dịch Dragendorff (TT).

Thuốc thử 2: Dung dịch acid sulfuric 10 % trong ethanol (TT).

Cách thử:

- *Dung dịch đối chiếu:* Lấy 0,5 g Hoàng đằng (mẫu chuẩn) đã cắt nhỏ hoặc nghiền thành bột, đã cắt nhỏ hoặc nghiền thành bột, thêm 50 ml nước đun sôi nhẹ 1h, để nguội, lọc. Dịch lọc đem cô đến cạn, thêm 5 ml methanol, lắc siêu âm 20 phút, để nguội, lọc được dung dịch chấm sắc ký.

- *Dung dịch thử:* Dùng dung dịch thử định tính Hoàng bá

Châm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l mỗi dung dịch đối chiếu và dung dịch thử. Triển khai sắc ký cho đến khi dung môi đi được khoảng 12-13 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng rồi phun thuốc thử Dragendorff, sau đó tiếp tục phun dung dịch acid sulfuric 10% trong ethanol. Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng thường

Kết quả: Sắc ký đồ của dung dịch thử phải cho các vết có cùng màu sắc, cùng giá trị R_f với các vết thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

2.6.3. Đại hoàng: Phương pháp sắc ký lớp mỏng (DĐVN V, phụ lục 5.4).

Thuốc thử, dụng cụ:

- Bản mỏng silicagel 60 F₂₅₄ trắng sẵn (Merck), hoạt hoá ở 100⁰ C trong 30 phút.

- Toluene, ethyl acetat, methanol, acid formic, ethanol tuyệt đối, cloroform, acid hydrochloric (TT).

- Dung môi triển khai sắc ký: Toluene - ethylacetat - methanol - acid formic - nước (30 : 10 : 2 : 0,5 : 5) (lắc kỹ, để tách lớp, lấy lớp trên).

- Quan sát bản mỏng dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 366 nm

Cách thử:

- *Dung dịch thử:* Lấy 6 ml chế phẩm, thêm 20 ml dung dịch acid hydrochloric 10 % và 20 ml cloroform, đun hồi lưu trong cách thủy trong 2 h, để nguội. Chuyển dịch thu được vào bình gạn, gạn lấy lớp cloroform. Lớp nước còn lại lắc với cloroform thêm 2 lần nữa, mỗi lần 20 ml. Gộp các dịch chiết cloroform ở trên, cô trên cách thủy đến cạn. Hòa lẫn thu được trong 5 ml ethanol được dung dịch chấm sắc ký.

- *Dung dịch dược liệu đối chiếu:* Lấy 1,0 g bột dược liệu, thêm 50 ml nước, đun sôi nhẹ 2 h, để nguội. Thêm vào cần 20 ml dung dịch acid hydrochloric 10 % và 20 ml cloroform, đun hồi lưu trong cách thủy trong 2 h, để nguội. Chuyển dịch thu được vào bình gạn, gạn lấy lớp cloroform. Lớp nước còn lại lắc với cloroform thêm 2 lần nữa, mỗi lần 20 ml. Gộp các dịch chiết cloroform ở trên, cô trên cách thủy đến cạn. Hòa lẫn thu được trong 5 ml ethanol được dung dịch chấm sắc ký.

Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l mỗi dung dịch đối chiếu và dung dịch thử. Triển khai sắc ký cho đến khi dung môi đi được khoảng 12 -14 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, quan sát bản mỏng dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 366 nm, sau đó đem hơi amoniac, quan sát bản mỏng dưới ánh sáng thường.

Kết quả: Sắc ký đồ của mẫu thử phải cho các vết phát quang có cùng màu sắc và cùng giá trị R_f với các vết thu được trên sắc ký đồ của mẫu đối chiếu. Các vết phát quang vàng chuyển thành màu hồng khi hơi trong hơi amoniac.

2.6.4. Khổ sâm: Phương pháp sắc ký lớp mỏng (ĐDVN V, phụ lục 5.4)

Dụng cụ, thuốc thử:

- Bản mỏng Silica gel GF₂₅₄ trắng sẵn (Merck), hoạt hoá ở 100 °C trong 30 phút.
- n-hexan, methanol, ethyl acetat, acid sulfuric, ethanol (TT).
- Hệ dung môi triển khai sắc ký: n-Hexan - ethyl acetat (2: 1).
- Thuốc thử: Dung dịch acid sulfuric 10 % trong ethanol.

Cách thử:

- *Dung dịch thử:* Lấy 3 ml chế phẩm, cô đến cạn, thêm 5 ml methanol, siêu âm 20 phút, để nguội, lọc được dung dịch chấm sắc ký.

- *Dung dịch đối chiếu:* Lấy 0,5 g Khổ sâm (mẫu chuẩn) đã cắt nhỏ hoặc nghiền thành bột, thêm 50 ml nước đun sôi nhẹ 1h, để nguội, lọc. Dịch lọc đem cô đến cạn, thêm 5 ml methanol, lắc siêu âm 20 phút, để nguội, lọc được dung dịch chấm sắc ký.

Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Triển khai sắc ký cho đến khi dung môi đi được khoảng 12-13 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Phun dung dịch acid sulfuric 10 % trong ethanol, sấy bản mỏng ở 110 °C trong 5 min đến khi hiện rõ vết. Quan sát bản mỏng dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 366 nm.

Kết quả: Sắc ký đồ của dung dịch thử phải cho các vết có cùng màu sắc, cùng vị trí với các vết thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

2.7. Độ nhiễm khuẩn: Tiến hành thử theo ĐĐVN V, phụ lục 13.6 - Thử giới hạn nhiễm khuẩn, phương pháp đĩa thạch.

2.8. Kích ứng da:

***Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị**

- Tông đơ điện hoặc dụng cụ thích hợp để cạo sạch lông thô.
- Kéo, panh, bông và băng dính y tế.

- Gạc không gây kích ứng (2,5cm x 2,5cm), có độ dày từ 2-3 mm.

*** Chuẩn bị động vật thí nghiệm**

- Trước thí nghiệm, làm sạch lông thú ở vùng bên sườn một khoảng đủ rộng để đặt các mẫu thử và đối chứng (khoảng 10 x 15 cm). Chỉ những thú có da khoẻ mạnh, đồng đều và lành lặn mới được dùng vào thí nghiệm

*** Tiến hành:**

- Cắt các miếng gạc vô trùng với kích thước 2,5 x 2,5 cm từ miếng gạc lớn ban đầu có độ dày 2 mm. Tẩm mỗi miếng gạc với 2,0 ml Chế phẩm TAD. Mỗi miếng gạc chứa 2,0 g dược liệu. Mỗi thú đều có vùng da bên sườn đặt 1 miếng gạc Chế phẩm TAD và bên cạnh đó đặt 1 miếng gạc tẩm nước cất, cách nhau 2 cm.

- Cắt những miếng gạc có kích thước 2,5 x 2,5 cm, tẩm nước cất với tỷ lệ 2,0 mL/miếng (đối chứng).

- Đặt trên da thú ở một bên sườn 1 miếng gạc tẩm mẫu thử và bên cạnh là 1 miếng gạc tẩm nước cất. Cố định miếng gạc bằng băng dính không gây kích ứng da và gạc trong 24 giờ. Tại mỗi thời điểm quan sát, bỏ gạc và băng dính, dùng nước cất lau nhẹ để làm sạch mẫu thử còn lại trên da.

- Quan sát và ghi điểm phản ứng trên chỗ da đặt chất thử so với da không đặt chất thử ở các thời điểm 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ và 24 giờ sau khi làm sạch mẫu thử. Đánh giá phản ứng trên da ở các mức độ gây ban đỏ, phù nề theo qui định ở bảng sau.

Bảng 1. Mức độ phản ứng trên da thỏ

Số tt	Phản ứng trên da thỏ	Thang điểm
Ban đỏ và sự tạo vảy		
1	Không có ban đỏ	0
2	Ban đỏ rất nhẹ (có thể phân biệt)	1
3	Ban đỏ được nhìn thấy rõ	2
4	Ban đỏ từ mức trung bình đến nặng	3
5	Ban đỏ nặng (màu đỏ thẫm) đến tạo thành vảy để ngăn ngừa sự tiến triển của ban đỏ.	4
Phù nề		
1	Không có phù nề	0
2	Phù nề rất nhẹ (có thể phân biệt)	1
3	Phù nề nhẹ (xác định được gờ của khu vực bị phù nề)	2
4	Phù nề trung bình (gờ cao khoảng 1 mm)	3
5	Phù nề nặng (gờ cao hơn 1 mm và lan ra xung quanh)	4
Tổng số điểm kích ứng tối đa có thể		8

*** Tính kết quả:**

- Điểm phản ứng trên mỗi thỏ được tính bằng tổng số điểm ở hai mức độ ban đỏ và phù nề chia cho số lần quan sát. Điểm kích ứng của mẫu thử được lấy trung bình điểm phản ứng của các thỏ đã thử.

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI
BỘ MÔN DƯỢC LÝ
TRUNG TÂM DƯỢC LÝ LÂM SÀNG



KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG
GIẢM NGỪA VÀ CHỐNG VIÊM DA CẤP
CỦA CAO TIÊU VIÊM TRỊ ĐỘC TAD
TRÊN THỰC NGHIỆM

Nơi tiến hành nghiên cứu: **Bộ môn Dược lý và**
Trung tâm Dược lý lâm sàng
Đại học Y Hà Nội

HÀ NỘI – 2024

1. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1.1. Sản phẩm nghiên cứu

- *Tên sản phẩm:* Cao tiêu viêm trị độc TAD (TAD)
- *Thành phần:* 100 mL chứa Đại hoàng, Hoàng bá, Hoàng đằng, Ké đầu ngựa, Lá móng, Khổ sâm.
 - *Tiêu chuẩn:* Cao tiêu viêm trị độc TAD được sản xuất tại Khoa Dược, Bệnh viện Y học cổ truyền Trung ương, sản phẩm đạt tiêu chuẩn cơ sở và Dược điển Việt Nam V.
- *Cách dùng:*
 - + Viêm da cơ địa, nấm da: Pha 100 ml với 1000 ml nước sạch, ngâm vùng tổn thương 30 phút vào buổi tối.
 - + Trứng cá, viêm da cơ địa, nấm da, zona, eczema: Bôi vùng tổn thương 2 lần/ngày.
 - + Lưu ý: Không được uống
- NSX: 22/05/2024 HSD: 05/2025

1.2. Máy móc và hóa chất phục vụ nghiên cứu

- Clobetason propionat 0,05%, biệt dược Eumovate (Glaxo Operations UK., LTD, Anh)
- Compound 48/80 lọ 250 mg (Sigma-Aldrich, Đức)
- Croton oil (Sigma-Aldrich, Đức)
- Dung dịch acetone (Xilong, Trung Quốc)
- Dung dịch NaCl 0,9%
- Đồng hồ bấm giờ

1.3. Động vật thí nghiệm

- Chuột nhắt trắng, chủng *Swiss*, cả hai giống, khỏe mạnh, trọng lượng $20 \pm 2g$, do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

- Động vật được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm với đầy đủ thức ăn và nước uống tại Bộ môn Dược lý - Trường Đại học Y Hà Nội.

1.4. Phương pháp nghiên cứu

1.4.1. Mô hình gây ngứa bằng compound 48/80

Pha compound 48/80: 10 mg compound + NaCl 0,9% = vừa đủ 10 mL dung dịch compound 48/80 nồng độ 0,1%.

Phương pháp gây mô hình: tiêm dưới da gáy chuột dung dịch compound 48/80 nồng độ 0,1% với thể tích 0,1 mL/chuột (100 µg compound/chuột) [1]. Chuột nhất trắng, được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con. Cạo lông vùng da gáy chuột để bôi thuốc với diện tích 1,5 cm² trước khi tiến hành nghiên cứu 24 giờ.

Chuột ở các lô được bôi thuốc như sau:

STT	Lô nghiên cứu	Bôi thuốc	Tiêm dưới da gáy
1	Chứng sinh học	Nước	NaCl 0,9%
2	Mô hình	Nước	Compound 48/80
3	Chứng dương	Clobetason 0,02 g/lần, bôi 2 lần, khoảng cách giữa các lần bôi là 3 giờ	Compound 48/80
4	TAD 2	TAD 0,2 mL/lần, bôi 2 lần, khoảng cách giữa các lần bôi là 3 giờ	Compound 48/80
5	TAD 3	TAD 0,2 mL/lần, bôi 3 lần, khoảng cách giữa các lần bôi là 3 giờ	Compound 48/80

Chuột được bôi thuốc thử liên tục trong thời gian 5 ngày. Ngày thứ 5, sau khi bôi thuốc thử lần cuối 30 phút, chuột ở các lô 2-5 được tiêm dưới da gáy dung dịch Compound 48/80 nồng độ 0,1% với thể tích 0,1 mL/chuột, chuột lô

chúng sinh học được tiêm dưới da gáy dung dịch NaCl 0,9% với thể tích tương tự. Ngay sau khi tiêm, chuột được đưa vào các lồng quan sát để đếm số lần gãi của chuột trong thời gian 30 phút (0-5 phút, 5-10 phút, 10-15 phút, 15-20 phút, 20-25 phút, 25-30 phút).

Chỉ số đánh giá:

-Thời điểm gãi đầu tiên

- Số lần gãi trung bình tại từng thời điểm

- Số lần gãi trung bình trong 30 phút

Các kết quả thu được so sánh giữa các lô để đánh giá tác dụng giảm ngứa của Cao tiêu viêm trị độc TAD.

1.4.2. Mô hình gây viêm da tai cấp bằng dầu croton

Chuẩn bị dầu croton: Pha 40 mg dầu croton vào 2 mL acetone (như vậy trong mỗi 20 μ L hỗn hợp sẽ chứa 0,4 mg dầu croton).

Mặt ngoài và mặt trong của tai chuột được bôi 20 μ L dung dịch dầu croton (trong acetone) để gây mô hình viêm tai (mỗi mặt 10 μ L), tiến hành việc bôi dung dịch dầu croton bằng pipet.

Chuột nhất trắng được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 10 con, được gây mô hình ở tai phải và dùng thuốc như sau:

- Lô 1 (Mô hình): Bôi croton + Không bôi thuốc gì vào tai PHẢI
- Lô 2 (Clobetason): Bôi croton + Bôi clobetason liều 0,02 g/lần, bôi 2 lần ở tai PHẢI sau khi gây mô hình 1 giờ và 3 giờ.
- Lô 3 (TAD2): Bôi croton + Bôi TAD liều 0,2 mL/lần, bôi 2 lần ở tai PHẢI sau khi gây mô hình 1 giờ và 3 giờ.
- Lô 4 (TAD3): Bôi croton + Bôi TAD liều 0,2 mL/lần, bôi 3 lần ở tai PHẢI sau khi gây mô hình 1 giờ, 3 giờ, và 5 giờ.

Ở tất cả các chuột, tai phải được bôi thuốc thử tại thời điểm sau khi bôi croton 1 giờ và 3 giờ, tai trái không gây mô hình và không bôi thuốc gì. Trước khi

gây mô hình bằng dung dịch dầu croton (trong acetone), chuột được đo chiều dày tai ở tất cả các lô. Đo chiều dày tai tại vị trí sát đỉnh của tai cách xa chóp sụn vành tai. Chỉ một nghiên cứu viên tiến hành đo chiều dày tai để hạn chế sai số.

Độ dày tai chuột được đo lại tại các thời điểm sau khi bôi croton 1, 3, 5 (đo ngay trước khi bôi thuốc) và 6 giờ.

6 giờ sau khi gây mô hình, giết chuột bằng cách làm chệch đốt sống cổ, dùng dụng cụ sinh thiết có đường kính 7 mm để cắt phần trung tâm tai chuột để xác định cân nặng. Sự chênh lệch trọng lượng giữa tai trái và phải của cùng một chuột được đánh giá là mức độ phù nề (E). Mức độ ức chế viêm (I%) ở mỗi lô được tính theo công thức sau:

$$I\% = (E_{\text{control}} - E_{\text{treated}}) \div E_{\text{control}} \times 100$$

Trong đó: E_{control} : mức độ phù nề của nhóm mô hình

E_{treated} : mức độ phù nề của nhóm được bôi thuốc

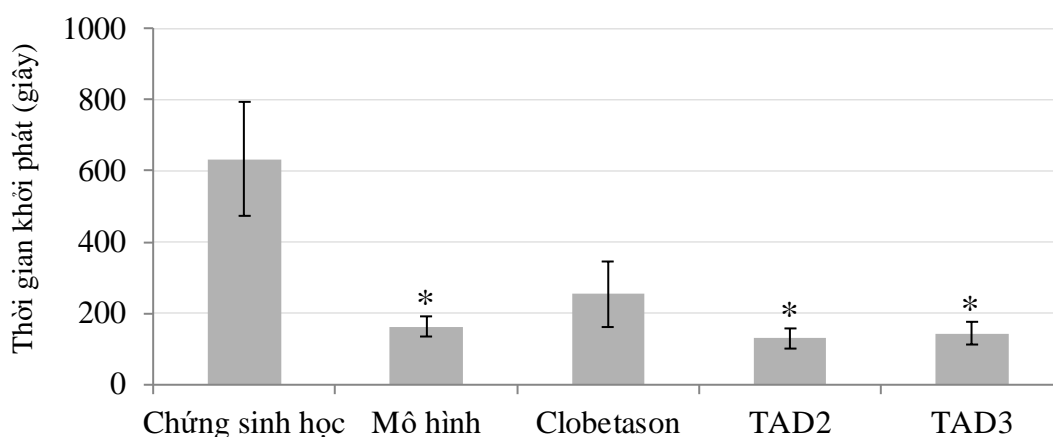
So sánh mức độ phù nề và ức chế viêm giữa các lô để đánh giá kết quả.

1.5. Xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$ và xử lý bằng phương pháp thống kê y sinh học sử dụng test thống kê thích hợp trên phần mềm Microsoft Excel 2010 và SPSS 20.0.

2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

2.1. Tác dụng giảm ngứa do compound 48/80



* $p < 0,05$ so với chứng sinh học (Student's *t*-test)

Biểu đồ 1. Thời điểm khởi phát cơn ngứa đầu tiên

Biểu đồ 1 biểu diễn thời điểm khởi phát cơn ngứa đầu tiên của chuột ở các lô nghiên cứu. Chuột ở các lô được tiêm dưới da gáy compound 48/80 xuất hiện ngứa sớm hơn đáng kể so với chuột lô chứng sinh học được tiêm dưới da gáy NaCl 0,9%. So với lô mô hình, clobetason có xu hướng kéo dài thời điểm khởi phát cơn ngứa, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê. TAD bôi 2 lần (lô TAD2) và bôi 3 lần (lô TAD3) đều chưa thể hiện tác dụng trì hoãn thời điểm khởi phát cơn ngứa so với lô mô hình.

Bảng 1. Ảnh hưởng của TAD đến số lần gãi ngứa trung bình của chuột nhất tại từng khoảng thời gian quan sát

Lô chuột (n = 10)	Số lần gãi (số lần/5 phút)					
	0-5 phút	> 5-10 phút	> 10-15 phút	> 15-20 phút	> 20-25 phút	> 25- 30 phút
Lô 1 Chứng sinh học	0	0,60 ± 0,70**	0,80 ± 1,62**	0,30 ± 0,67**	0,20 ± 0,63***	1,30 ± 1,49**
Lô 2 Mô hình	10,50 ± 7,04	8,60 ± 7,37	8,20 ± 5,39	5,90 ± 5,20	7,30 ± 4,55	7,90 ± 5,20

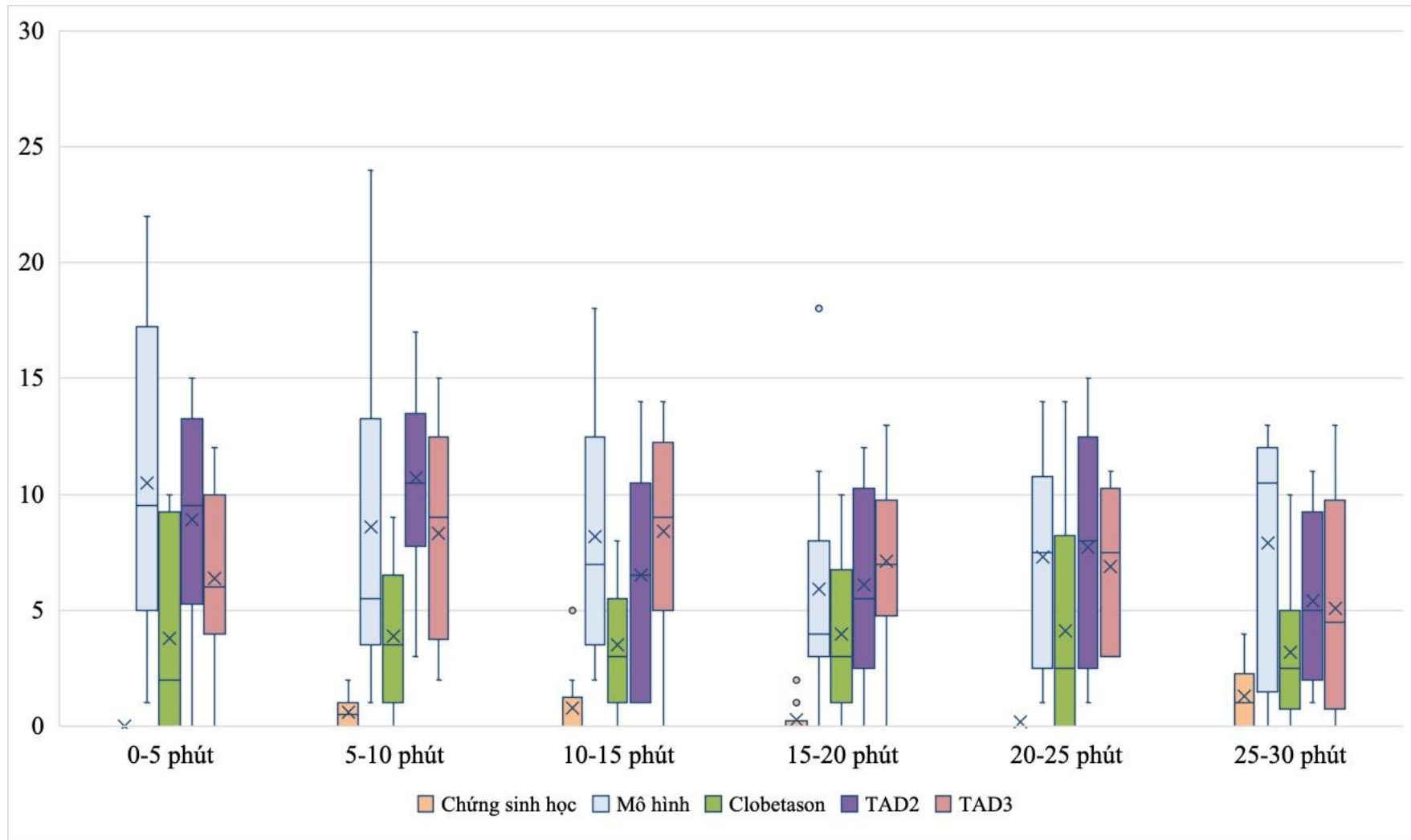
Lô chuột (n = 10)	Số lần gãi (số lần/5 phút)					
	0-5 phút	> 5-10 phút	> 10-15 phút	> 15-20 phút	> 20-25 phút	> 25- 30 phút
Lô 3 Clobetason	3,80 ± 4,24*	3,90 ± 3,07	3,50 ± 2,72*	4,00 ± 3,56	4,10 ± 4,89	3,20 ± 3,01*
Lô 4 TAD2	8,90 ± 4,91 [#]	10,70 ± 4,08 ^{###}	6,50 ± 4,79	6,10 ± 4,28	7,70 ± 5,21	5,40 ± 3,57
Lô 5 TAD3	6,40 ± 3,66	8,30 ± 4,64 [#]	8,40 ± 4,40 ^{##}	7,10 ± 3,81	6,90 ± 3,38	5,10 ± 4,86

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ so với lô mô hình (Student's t-test)

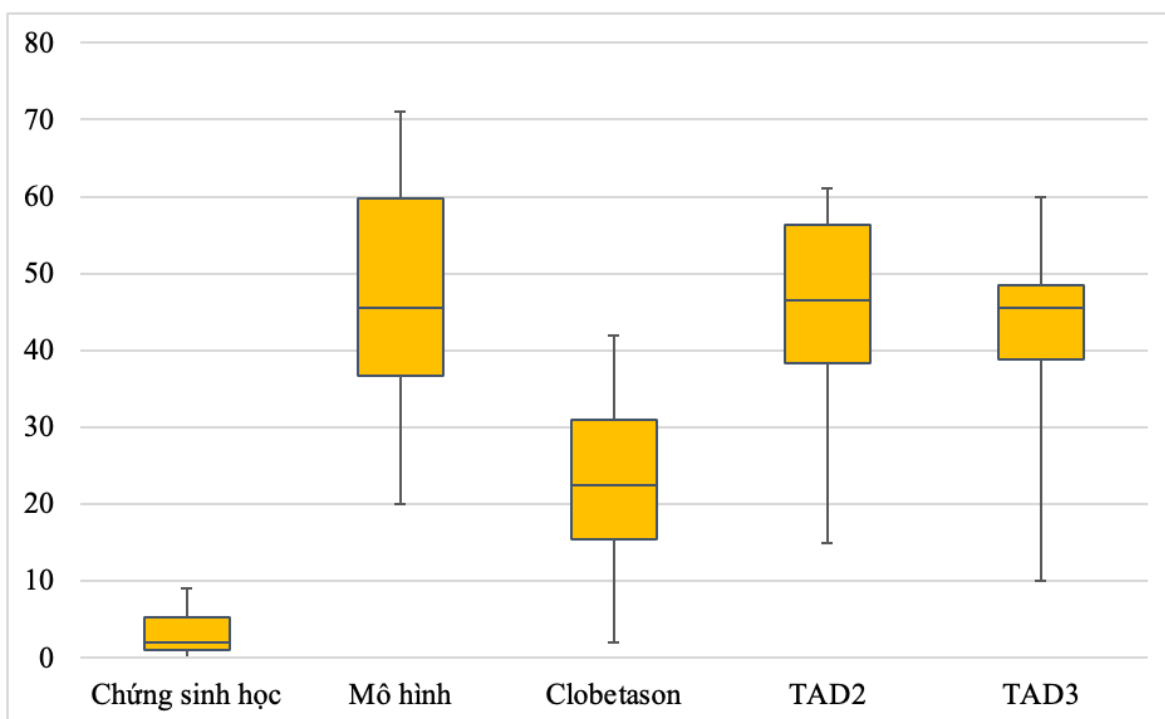
[#] $p < 0,05$; ^{###} $p < 0,001$ so với lô bôi clobetason (Student's t-test)

Kết quả ở Bảng 1 và Biểu đồ 2 cho thấy:

- Bôi clobetason có xu hướng làm giảm số lần gãi của chuột so với lô mô hình ở tất cả các khoảng thời gian đánh giá, mức giảm có ý nghĩa thống kê được quan sát rõ nhất tại các khoảng thời gian 0-5 phút, 10-15 phút, và 25-30 phút ($p < 0,05$).
- Cao tiêu viêm trị độc TAD chưa thể hiện rõ hiệu quả làm giảm số lần gãi của chuột so với lô mô hình tại các khoảng thời gian quan sát ($p > 0,05$).



Biểu đồ 2. Ảnh hưởng của TAD đến số lần gãi ngứa của chuột nhất tại từng thời điểm nghiên cứu



Biểu đồ 3. Ảnh hưởng của Cao tiêu viêm trị độc TAD đến tổng số lần gãi của chuột nhất trong 30 phút

Quan sát Biểu đồ 3 nhận thấy:

- Chuột ở lô chứng sinh học có tổng số lần gãi trong 30 phút dao động chủ yếu trong khoảng 1-5 lần, số lần gãi nhiều nhất và ít nhất tương ứng là 9 và 0.
- Chuột ở lô mô hình không được điều trị gì có tổng số lần gãi trong 30 phút dao động chủ yếu trong khoảng 37-60 lần, số lần gãi nhiều nhất và ít nhất tương ứng là 71 và 20.
- Chuột ở lô bôi clobetason vào vùng da gáy có tổng số lần gãi trong 30 phút dao động chủ yếu trong khoảng 16-31 lần, số lần gãi nhiều nhất và ít nhất tương ứng là 42 và 02.
- Chuột ở lô TAD2 được bôi TAD hai lần/ngày vào vùng da gáy có tổng số lần gãi trong 30 phút dao động chủ yếu trong khoảng 38-56 lần, số lần gãi nhiều nhất và ít nhất tương ứng là 61 và 15.

- Chuột ở lô TAD3 được bôi TAD ba lần/ngày vào vùng da gáy có tổng số lần gãi trong 30 phút dao động chủ yếu trong khoảng 39-49 lần, số lần gãi nhiều nhất và ít nhất tương ứng là 60 và 10.

Bảng 2. Ảnh hưởng của Cao tiêu viêm trị độc TAD đến tổng số lần gãi trung bình của chuột nhất trong 30 phút

Lô nghiên cứu (n = 10)	Số lần gãi trung bình
Lô 1 (Chứng sinh học)	3,20 ± 3,29***
Lô 2 (Mô hình)	48,40 ± 16,65
Lô 3 (Clobetason)	22,50 ± 13,90***
Lô 4 (TAD2)	45,30 ± 13,97##
Lô 5 (TAD3)	42,20 ± 13,96##

*** $p < 0,001$ so với lô mô hình (Student's *t*-test); ## $p < 0,01$ so với lô bôi clobetason (Student's *t*-test)

Kết quả Bảng 2 cho thấy, clobetason và TAD đều có xu. Hướng làm giảm số lần gãi trung bình trong 30 phút so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được quan sát thấy với lô bôi clobetason ($p < 0,001$).

2.2. Tác dụng chống viêm da tại cấp do dầu croton

Bảng 3. Độ dày trung bình của tai chuột trước và sau khi bôi dầu croton

Lô nghiên cứu	Trước bôi croton	Sau bôi croton			
		1 giờ	3 giờ	5 giờ	6 giờ
Mô hình	0,19 ± 0,01	0,26 ± 0,03 (a)	0,40 ± 0,04 (a)	0,42 ± 0,03 (a)	0,41 ± 0,02 (a)
Clobetason	0,19 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,38 ± 0,04	0,33 ± 0,03	0,33 ± 0,03

		(a)	(a)	(a***)	(a***)
TAD2	0,19 ± 0,01	0,26 ± 0,02 (a)	0,41 ± 0,04 (a)	0,38 ± 0,04 (a*##)	0,36 ± 0,02 (a***#)
TAD3	0,19 ± 0,01	0,28 ± 0,03 (a)	0,38 ± 0,04 (a)	0,38 ± 0,03 (a**##)	0,34 ± 0,02 (a***\$)

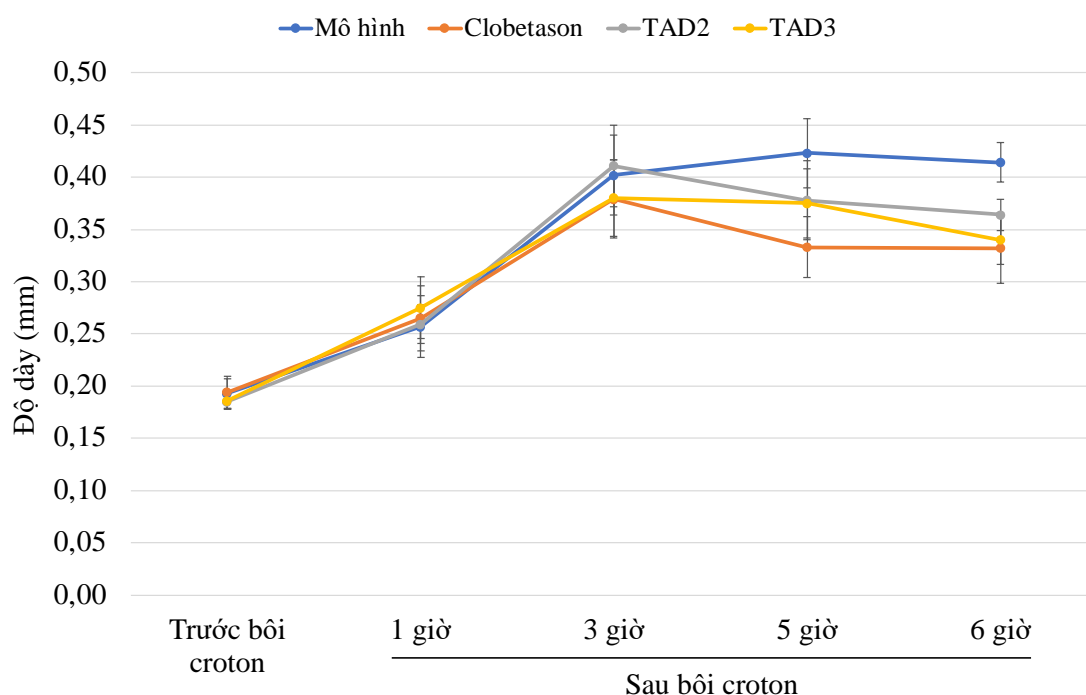
Số liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$ (mm)

^a $p < 0,001$ so với thời điểm trước bôi croton (paired samples t-test)

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ so với lô mô hình (Student's t-test)

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$ so với lô bôi clobetason; \$ $p < 0,05$ so với lô TAD2

(Student's t-test)



Biểu đồ 4. Sự thay đổi độ dày tai chuột theo thời gian trong 6 giờ

Bảng 3 và Biểu đồ 4 trình bày số liệu về độ dày trung bình của tai chuột trước và sau khi bôi dầu croton. Clobetason thể hiện hiệu quả chống viêm cấp tốt thông qua tác dụng làm giảm đáng kể độ dày tai chuột sau khi bôi 2 lần cách thời điểm bôi croton 1 giờ và 3 giờ. Tác dụng chống viêm tương tự cũng được quan sát thấy với các lô bôi TAD, hiệu quả cũng được thể hiện sau khi bôi TAD hai lần cách thời điểm bôi croton 1 giờ và 3 giờ. Bên cạnh đó, hiệu quả của TAD được tăng cường thêm khi bôi thêm một lần nữa cách thời điểm bôi croton 5 giờ, nhận định này dựa trên độ dày tai chuột tại thời điểm 6 giờ sau bôi dầu croton ở lô TAD3 nhỏ hơn có ý nghĩa thống kê so với lô TAD2 với $p < 0,05$.

Bảng 4. Mức độ ức chế viêm của TAD sau 6 giờ bôi dầu croton

Lô nghiên cứu	Trọng lượng (mg)			Mức độ ức chế viêm (%)
	Tai phải	Tai trái	Mức tăng trọng lượng [@]	
Lô 1: Mô hình	37,0 ± 4,4	21,1 ± 3,0	15,95 ± 2,33	
Lô 2: Clobetason	25,1 ± 6,2***	19,0 ± 1,9	6,10 ± 5,53***	61,76
Lô 3: TAD2	31,3 ± 6,3*#	20,6 ± 2,9	10,69 ± 8,01	32,98
Lô 4: TAD3	30,9 ± 6,1*	20,3 ± 2,2	10,53 ± 5,49*	33,98

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ so với lô mô hình (Student's t-test)

$p < 0,05$ so với lô bôi clobetason (Student's t-test)

[@]Mức tăng trọng lượng = Khối lượng tai phải – Khối lượng tai trái

Số liệu Bảng 4 cho thấy:

- Clobetasol có hiệu quả chống viêm rõ rệt, thể hiện ở tác dụng làm giảm đáng kể mức tăng trọng lượng tai so với lô mô hình ($p < 0,001$). Mức độ ức chế viêm của clobetason so với lô mô hình là 61,76%.

- Mức tăng trọng lượng tai chuột ở hai lô bôi TAD có xu hướng giảm, sự khác biệt so với lô mô hình được quan sát thấy với lô bôi TAD ba lần với $p < 0,05$. Mức độ ức chế viêm của hai lô bôi TAD hai lần và ba lần so với lô mô hình lần lượt là 32,98% và 33,98%.

3. KẾT LUẬN

3.1. Tác dụng giảm ngứa do compound 48/80

Cao tiêu viêm trị độc TAD bôi 2 lần/ngày và 3 lần/ngày liên tục trong 5 ngày có xu hướng làm giảm ngứa trên mô hình gây ngứa bằng compound 48/80 liều 100 μg /chuột, thể hiện ở xu hướng làm giảm tổng số lần gãi của chuột trong 30 phút so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê.

3.2. Tác dụng chống viêm da tai cấp do dầu croton

Cao tiêu viêm trị độc TAD bôi 2 lần/ngày và 3 lần/ngày đã thể hiện tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây viêm da tai cấp bằng dầu croton thông qua khả năng làm giảm độ dày tai và trọng lượng tai so với lô mô hình. Cao tiêu viêm trị độc TAD bôi 3 lần thể hiện quả chống viêm tốt hơn khi bôi 2 lần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kim KH, Lee WR, An HJ, et al. Bee venom ameliorates compound 48/80-induced atopic dermatitis-related symptoms. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;**6(12)**:2896–2903.
2. Maria Alejandra HOSSEN et al. Caffeic Acid Inhibits Compound 48/80-Induced Allergic Symptoms in Mice. *Biol Pharm Bull.* 2006;**29(1)**:64-66
3. In Hwa Jeon et al. Anti-Inflammatory and Antipruritic Effects of Luteolin from Perilla (*P. frutescens* L.) Leaves. *Molecules.* 2014;**19(6)**:6941-6951
4. Gerhard Vogel H (2008). Chapter H: Analgesic, anti-inflammatory, anti-pyretic activity. Drug discovery and evaluation Pharmacological assays, Springer, 669-774.
5. Patil KR, Mahajan UB, Unger BS, et al. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. *Int J Mol Sci.* 2019;**20(18)**:4367. doi:10.3390/ijms20184367
6. Barbosa AG, Oliveira CD, Lacerda-Neto LJ, et al. Evaluation of chemical composition and antiedematogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. *Saudi J Biol Sci.* 2017;**24(2)**:355-361.

Hà Nội, ngày 20 tháng 9 năm 2024

Trưởng Bộ môn Dược lý

Giám đốc Trung tâm Dược lý lâm sàng

Phạm Thị Vân Anh

BÁO CÁO KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM
TÍNH KÍCH ỨNG DA VÀ XÁC ĐỊNH TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA
CAO TIÊU VIÊM TRỊ ĐỘC – TAD TRÊN THỰC NGHIỆM

1. Nhóm nghiên cứu

1. BS. Lê Hải Thảo
2. TS. Nguyễn Thị Minh Thu
3. TS. Phạm Thanh Tùng
4. Ths. Nguyễn Thị Thu Hằng
5. Và một số KTV

**CHƯƠNG 1: TÍNH KÍCH ỨNG DA CỦA CAO TIÊU VIÊM TRỊ ĐỘC-
TAD
TRÊN THỰC NGHIỆM**

1.1. Địa điểm, thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tháng 7 năm 2024 tại Phòng thí nghiệm Bộ môn Dược lý, Bộ môn Vi sinh – Ký sinh trùng và Viện Nghiên cứu Y - Dược cổ truyền Tuệ Tĩnh, Học viện Y - Dược học cổ truyền Việt Nam.

1.2. Đối tượng nghiên cứu

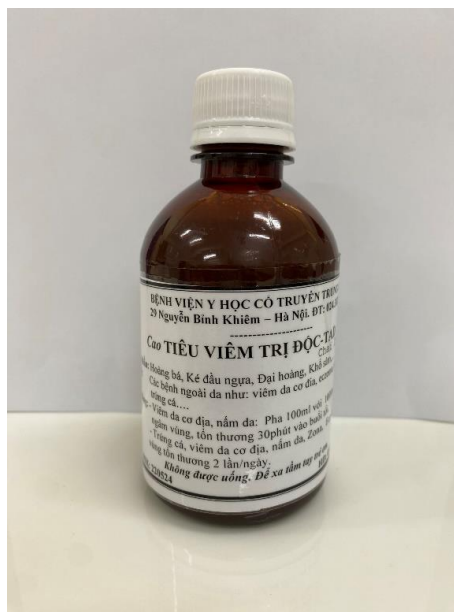
Mẫu nghiên cứu là Cao Tiêu viêm trị độc -TAD (ché phẩm TAD) được bào chế dưới dạng cao lỏng, có màu nâu đen, mùi thơm dược liệu. Tỷ lệ các thành phần trong 1 chai 250 ml cao lỏng như sau:

Bảng 1. Thành phần của Cao Tiêu viêm trị độc-TAD

TT	Tên vị thuốc	Số gam
1	Hoàng Bá (<i>Cortex Phellodendri</i>)	Đồng lượng
2	Ké đầu ngựa (<i>Fructus Xanthii strumarii</i>)	
3	Đại hoàng (<i>Rhizoma Rhei</i>)	
4	Khổ sâm (<i>Folium et Ramulus Crotonis tonkinensis</i>)	

5	Hoàng đằng (<i>Caulis et Radix Fibraureae</i>)	
6	Lá móng (<i>Folium Lawsoniae</i>)	
	Tổng	250

Các dược liệu đều đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V, được rửa sạch, nấu thành cao lỏng tỷ lệ 1:1, đóng chai 250 ml.



Hình 1. Cao tiêu viêm trị độc-TAD

1.3. Động vật dùng trong nghiên cứu

Thỏ trưởng thành (*Oryctolagus cuniculus* L.), tổng số 06 con, cân nặng trung bình $2,1 \pm 0,2$ kg, 2 tháng tuổi, khỏe mạnh, không phân biệt đực - cái, do Trung tâm nghiên cứu dê và thỏ Sơn Tây cung cấp. Động vật cái không mang thai, không nuôi con bú và chưa sinh sản lần nào. Động vật được nuôi ổn định 5 ngày trong điều kiện thí nghiệm trước khi tiến hành nghiên cứu.

1.4. Dụng cụ dùng trong nghiên cứu

- + Tông đơ điện.
- + Kéo, pank
- + Cốc thủy tinh, ống đong thủy tinh chia vạch.
- + Băng, gạc vô trùng.
- + Kính lúp.

1.5. Tiến hành nghiên cứu

Thử nghiệm tiến hành trên thỏ theo hướng dẫn của Bộ Y tế và OECD 404.

Chuẩn bị động vật:

Trước thí nghiệm, làm sạch lông thỏ ở vùng bên sườn một khoảng đủ rộng để đặt các mẫu thử và đối chứng (khoảng 10 x 15 cm). Chỉ những thỏ có da khoẻ mạnh, đồng đều và lành lặn mới được dùng vào thí nghiệm (hình 2 & 3).



Hình 2: Cạo lông thỏ



Hình 3: Chọn thỏ có da lành lặn

Chuẩn bị mẫu thử:

Cắt các miếng gạc vô trùng với kích thước 2,5 x 2,5 cm từ miếng gạc lớn ban đầu có độ dày 2 mm. Tẩm mỗi miếng gạc với 2,0 ml Cao Tiêu viêm trị độc-TAD. Mỗi miếng gạc chứa 2,0 g dược liệu. Mỗi thỏ đều có vùng da bên sườn đặt 1 miếng gạc Cao Tiêu viêm trị độc-TAD và bên cạnh đó đặt 1 miếng gạc tẩm nước cất, cách nhau 2 cm.



Hình 4: Chuẩn bị mẫu thử đặt lên da



Hình 5: Đặt mẫu thử lên da thỏ

thỏ

Chuẩn bị miếng gạc tẩm dung môi (nước cất):

Cắt những miếng gạc có kích thước 2,5 x 2,5 cm, tẩm nước cất với tỷ lệ 2,0 mL/miếng (đối chứng).

Đặt mẫu thử:

Đặt trên da thỏ ở một bên sườn 1 miếng gạc tẩm mẫu thử và bên cạnh là 1 miếng gạc tẩm nước cất (hình 5). Cố định miếng gạc bằng băng dính không gây kích ứng da và gạc trong 24 giờ (hình 6, 7). Tại mỗi thời điểm quan sát, bỏ gạc và băng dính, dùng nước cất lau nhẹ để làm sạch mẫu thử còn lại trên da.



Hình 6. Đặt mẫu thử lên da thỏ



Hình 7. Băng cố định miếng dán

Quan sát và ghi điểm:

Quan sát và ghi điểm phản ứng trên chỗ da đặt chất thử so với da không đặt chất thử ở các thời điểm 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ và 24 giờ sau khi làm sạch mẫu thử. Đánh giá phản ứng trên da ở các mức độ gây ban đỏ, phù nề theo qui định ở bảng 2.

Bảng 2. Mức độ phản ứng trên da thỏ

Phản ứng	Điểm đánh giá
Sự tạo vảy và ban đỏ	

- Không ban đỏ	0
- Ban đỏ rất nhẹ (vừa đủ nhận thấy)	1
- Ban đỏ nhận thấy rõ	2
- Ban đỏ vừa phải đến nặng	3
- Ban đỏ nghiêm trọng (đỏ tấy) đến tạo thành vảy để ngăn ngừa sự tiến triển của ban đỏ	4
Gây phù nề	
- Không phù nề	0
- Phù nề rất nhẹ (vừa đủ nhận thấy)	1
- Phù nề nhận thấy rõ (viền phù nề phồng lên rõ)	2
- Phù nề vừa phải (da phồng lên khoảng 1mm)	3
- Phù nề nghiêm trọng (da phồng lên trên 1mm và có lan rộng ra vùng xung quanh)	4
Tổng số điểm kích ứng tối đa có thể	8

Những thay đổi khác trên da sẽ được theo dõi và ghi chép đầy đủ.

Đánh giá kết quả:

Trên mỗi thử, điểm phản ứng được tính bằng tổng số điểm ở hai mức độ ban đỏ và phù nề chia cho số lần quan sát. Điểm kích ứng của mẫu thử được lấy trung bình điểm phản ứng của các thử đã thử. Trong trường hợp có dùng mẫu đối chứng, điểm phản ứng của mẫu thử được trừ đi số điểm của mẫu đối chứng.

Chỉ sử dụng các điểm tại thời gian quan sát ở 6 giờ để tính kết quả. Đối chiếu điểm kích ứng với các mức độ quy định trên bảng 2 để xác định khả năng gây kích ứng trên da thử của mẫu thử.

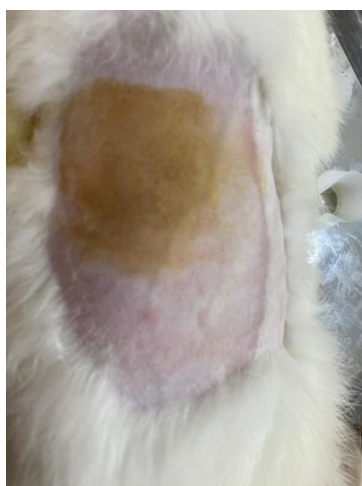
Bảng 3. Phân loại các phản ứng trên da thử

Loại phản ứng	Điểm trung bình
Kích ứng không đáng kể	0-0,5

Kích ứng nhẹ	> 0,5-2,0
Kích ứng vừa phải	> 2,0-5,0
Kích ứng nghiêm trọng	> 5,0 - 8,0

1.6. Kết quả nghiên cứu

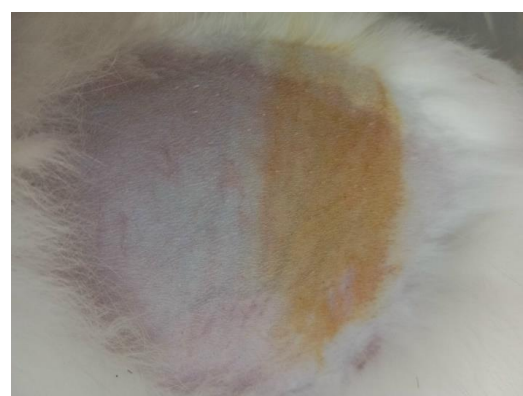
Trong suốt thời gian theo dõi, tại các thời điểm sau khi đặt thuốc 1, 2, 4, 6 và 24 giờ, vùng da đặt mẫu thử vẫn bình thường, không có dấu hiệu ban đỏ, không bị kích ứng, không phù nề hay viêm. Sau khi bóc mẫu thử, vùng da đặt chất thử có màu nâu vàng, nhưng da nguyên vẹn, lành lặn, không có biểu hiện sưng tấy, đỏ hay viêm nhiễm. Da hoàn toàn khỏe mạnh. Vùng da đặt chất thử và vùng da chứng tương tự nhau (hình 8-12).



Hình 8: Da thử số 3 sau 1 giờ đặt mẫu thử



Hình 9: Da thử 2 sau 2 giờ đặt mẫu thử



Hình 10: Da thử 5 sau 4 giờ đặt mẫu thử



Hình 11: Da thỏ 1 sau 6 giờ đặt mẫu **Hình 12:** Da thỏ 6 sau 24 giờ đặt mẫu thử

Cả 6 thỏ đều có vùng da đặt mẫu thử lành lặn, không viêm, không sưng tấy, không kích ứng hay ban đỏ. Vùng da đặt mẫu thử và vùng da đặt nước cất tương tự nhau.

1.7. Kết luận

Đã thử nghiệm tác dụng kích ứng da thỏ của Cao Tiêu viêm trị độc-TAD với liều 2,0 g dược liệu, đặt trên diện tích da 2,5 x 2,5 cm nhận thấy, da thỏ hoàn toàn bình thường, khỏe mạnh, không bất cứ biểu hiện dị ứng hay viêm nào trong suốt thời gian đặt mẫu 24 giờ. Cao Tiêu viêm trị độc-TAD (chế phẩm TAD) an toàn với da thỏ ở mức liều đã thử nghiệm.

CHƯƠNG 2: XÁC ĐỊNH TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA CAO TIÊU VIÊM TRỊ ĐỘC - TAD

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Cao Tiêu viêm trị độc – TAD (chế phẩm TAD)

Nguồn gốc: Khoa Dược, bệnh viện YHCT Trung Ương

2.2. Phương tiện nghiên cứu

2.2.1. Chủng vi khuẩn khuẩn

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

- *Streptococcus mutans* ATCC 35668

Nguồn gốc: Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

2.2.2. Môi trường nuôi cấy VSV

❖ *Môi trường Casein đậu tương lỏng*

Bảng 2.1. Môi trường casein đậu tương lỏng

Thành phần	Khối lượng
Pancreatic digest of casein	17,0 g/l
Enzymatic digest of soya bean	3,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Dipotassium hydrogen phosphate	2,5 g/l
Glucose	2,5g/l
pH 7,3	

❖ *Môi trường Thạch dinh dưỡng*

Bảng 2.2. Môi trường thạch dinh dưỡng

Thành phần	Khối lượng
Peptone	6,0 g/l
Beef Extract	1,0 g/l
Yeast Extract	2,0 g/l
NaCl	5,0 g/l

Agar	14,0 g/l
pH 7,3	

❖ *Môi trường Mueller – Hinton*

Bảng 2.3. Môi trường Mueller - Hinton

Thành phần	Khối lượng
Acid Digest of Casein	17,5 g/l
Beef Extract	2 g/l
Starch	1,5 g/l
NaCl	5,0 g/l
Agar	17 g/l
pH 7,3	

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp khuếch tán giếng thạch, Phương pháp đếm khuẩn lạc

2.2.4. Chỉ số nghiên cứu

Đường kính vòng kháng khuẩn (mm), Số lượng khuẩn lạc (CFU/ml)

2.2.5. Thiết bị, dụng cụ

Thiết bị

STT	Thiết bị	Model/xuất xứ
1	Cân phân tích	Sartorius – BP 121S – Đức
2	Nồi hấp tiệt trùng	HIRAYAMA HV-110
3	Tủ ấm	FROILABO BC 120
4	Tủ cấy vi sinh	CLEAN BENCH
5	Tủ lạnh	Panasonic
6	Tủ sấy	Memmert ULE 600
7	Ống MacFaland	bioMerieux – Mỹ

Dụng cụ

STT	Dụng cụ	STT	Dụng cụ
1	Bình định mức 100ml	8	Nhiệt kế
2	Bình tam giác	9	Ống nghiệm
3	Bông không thấm nước	10	Phễu thủy tinh
4	Cốc thủy tinh 100 ml, 250ml	11	Pipet vạch, pipet bầu, micro pipet
5	Đèn cồn	12	Que cấy thủy tinh
6	Đĩa Petri	13	Que trang thủy tinh
7	Đũa thủy tinh	14	Thước đo

Hóa chất, dung môi

STT	Hóa chất/dung môi	Công thức	Tiêu chuẩn
1	Nước cất	H ₂ O	ĐDVN V

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Quy trình nghiên cứu

Giai đoạn 1: Hoạt hóa chủng vi khuẩn

Cấy vi sinh vật trên môi trường dinh dưỡng Casein đậu tương. Khi vi sinh vật phát triển làm đục môi trường thì cấy chuyển vi khuẩn sang môi trường thạch dinh dưỡng, bảo quản trong tủ lạnh ở 2 – 8 độ C.

Giai đoạn 2: Khảo sát nồng độ kháng khuẩn của chế phẩm TAD

Bước 1: Chuẩn bị dung dịch pha loãng chế phẩm TAD và huyền dịch 02 loại vi khuẩn

Ống nghiệm gốc chứa chế phẩm TAD (ống nghiệm ghi 1x). Thêm chế phẩm TAD và nước cất tương đương với các tỉ lệ 1:9; 1:19; 1:49; 1:99; khuấy cho đến khi hòa tan hoàn toàn, pha loãng chế phẩm TAD ở nhiệt độ 25°C. Như vậy chế phẩm TAD sẽ có các nồng độ: 1x, 10x, 20x, 50x, 100x.

Pha huyền dịch chứa 02 loại vi sinh vật chủng chuẩn từ khuẩn lạc thuần nuôi trong môi trường thạch dinh dưỡng đến khi đạt độ đục tương đương 0.5 độ McFarland (mật độ vi khuẩn đạt 10^8 vi khuẩn/ml). Cấy chuyển vi sinh vật sang môi trường Mueller Hinton để thử tính kháng khuẩn.

Bước 2: Đánh giá tác dụng kháng khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch

Từ khuẩn lạc thuần, pha huyền dịch vi khuẩn nồng độ 10^8 vi khuẩn/ml để thực hiện thử nghiệm: Dùng que cấy chạm vòng cấy vào bề mặt thạch dinh dưỡng rồi cấy chuyển vào 2ml nước cất vô trùng. Điều chỉnh độ đục của huyền dịch vi khuẩn tương đương độ đục chuẩn 0,5 McFarland.

Dùng pipet hút 100 μ l huyền dịch vi khuẩn, đổ lên bề mặt thạch Mueller-Hinton. Dùng que trang dàn đều vi khuẩn trên đĩa môi trường, lần lượt đục các lỗ, nhỏ cao vào các lỗ trên môi trường, để ngoài nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút, sau đó để tủ ấm 37°C. Sau 18-24 giờ đọc kết quả bằng cách đo vòng ức chế vi khuẩn.

Đo đường kính vòng ức chế vi khuẩn bằng thước kẹp Panme có độ chính xác 0,1mm. Đường kính vòng ức chế vi khuẩn được tính bằng giá trị trung bình giữa 3 lần thử nghiệm.

Giai đoạn 3: Xác định nồng độ MIC của chế phẩm TAD

Bước 1: Chuẩn bị dung dịch pha loãng chế phẩm TAD và huyền dịch 02 loại vi khuẩn

Ống nghiệm gốc chứa chế phẩm TAD (ống nghiệm ghi 1x). Thêm chế phẩm TAD và nước cất tương đương với các tỉ lệ 1:9; 1:19; 1:49; 1:99; khuấy cho

đến khi hòa tan hoàn toàn, pha loãng chế phẩm TAD ở nhiệt độ 25°C. Như vậy chế phẩm TAD sẽ có các nồng độ: 1x, 10x, 20x, 50x, 100x.

Pha huyền dịch chứa 02 loại vi sinh vật chủng chuẩn từ khuẩn lạc thuần nuôi trong môi trường thạch dinh dưỡng đến khi đạt độ đục tương đương 0.5 độ McFarland (mật độ vi khuẩn đạt 10^8 vi khuẩn/ml). Cấy chuyển vi sinh vật sang môi trường Mueller Hinton để thử tính kháng khuẩn.

Bước 2: ủ vi khuẩn trong dung dịch chế phẩm TAD ở các nồng độ khác nhau trong thời gian 15 phút và 30 phút

Bước 3: Xác định MIC của dung dịch chế phẩm TAD

Cấy 100 µl dung dịch ủ ở bước 2 lên đĩa thạch Muller – Hinton và xác định nồng độ chế phẩm TAD thấp nhất cùng thời gian ủ mà vi khuẩn không mọc được (diệt 99% số lượng vi khuẩn)

2.3.2. Xử lý số liệu

- Số liệu được ghi chép đầy đủ và chính xác theo thời gian
- Xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel

2.4. Đạo đức nghiên cứu

Thực hiện số liệu trung thực với phương pháp khoa học đảm bảo số liệu khách quan, trung thực

Thực hiện đầy đủ quy trình kiểm soát vi sinh vật trong phòng thí nghiệm.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xác định hoạt tính kháng khuẩn in vitro của chế phẩm TAD trên 2 chủng vi khuẩn (Hình ảnh minh họa ở phụ lục).

❖ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Bảng 3.1. Kết quả khảo sát nồng độ kháng khuẩn của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

STT	Nồng độ chế phẩm TAD	Đường kính khuếch tán vòng kháng khuẩn (mm)
1	Cao chiết gốc	27,10 ± 0,707
2	Cao chiết pha loãng 1/9	25,05 ± 0,289
3	Cao chiết pha loãng 1/19	15,95 ± 0,2889
4	Cao chiết pha loãng 1/49	12,67 ± 0,381
5	Cao chiết pha loãng 1/99	8,20 ± 0,5

❖ Nhận xét: Chế phẩm TAD có khả năng kháng chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ở tất cả các nồng độ. Đường kính giảm dần khi nồng độ cao giảm xuống. Đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất là 27,10 mm (cao chiết gốc) và nhỏ nhất là 8,2 mm (pha loãng 1/99).

❖ *Streptococcus mutans* ATCC 35668

Bảng 3.2. Kết quả khảo sát nồng độ kháng khuẩn của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* ATCC 35668

STT	Nồng độ cao chiết	Đường kính khuếch tán vòng kháng
-----	-------------------	----------------------------------

		khuẩn (mm)
1	Cao chiết gốc	28,67 ± 0,661
2	Cao chiết pha loãng 1/9	26,50 ± 0,541
3	Cao chiết pha loãng 1/19	16,33 ± 0,567
4	Cao chiết pha loãng 1/49	13,10 ± 0,567
5	Cao chiết pha loãng 1/99	8,8 ± 0,333

Nhận xét: Chế phẩm TAD có khả năng kháng chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở tất cả các nồng độ. Đường kính giảm dần khi nồng độ cao giảm xuống. Đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất là 28,67 mm (cao chiết gốc) và nhỏ nhất là 8,8 mm (pha loãng 1/99).

KẾT LUẬN: Như vậy bước đầu nhóm nghiên cứu đã xác định được hoạt tính kháng khuẩn in vitro của chế phẩm TAD trên 2 chủng vi *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở tất cả các nồng độ thử và có khả năng kháng đến nồng độ pha loãng 1/99.

3.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của chế phẩm TAD trên 2 chủng vi khuẩn

❖ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Bảng 3.3. Kết quả khảo sát nồng độ ức chế tối thiểu của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

STT	Nồng độ chế phẩm TAD	Kết quả vi sinh vật còn sống sau thời gian ủ (CFU/l)

		Thời gian ủ 15 phút	Thời gian ủ 30 phút
1	Cao chiết gốc	0	0
2	Cao chiết pha loãng 1/9	0	0
3	Cao chiết pha loãng 1/19	0	0
4	Cao chiết pha loãng 1/49	34,5 x 10 ²	19,5 x 10 ²
5	Cao chiết pha loãng 1/99	56,5 x 10 ²	27,2 x 10 ²

Nhận xét: Chế phẩm TAD có khả năng tiêu diệt 100% vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ở các nồng độ: cao chiết gốc, cao chiết pha loãng 1/9, cao chiết pha loãng 1/19 ở cả hai thời gian ủ là 15 phút và 30 phút. Tuy nhiên ở nồng độ pha loãng 1/49 và 1/99 thì không còn khả năng diệt khuẩn hoàn toàn ở cả thời gian ủ 15 phút và 30 phút. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ở các nồng độ ủ 15 phút và 30 phút đều là nồng độ pha loãng 1/19.

❖ *Streptococcus mutans* ATCC 35668

Bảng 3.4. Kết quả khảo sát nồng độ ức chế tối thiểu của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* ATCC 35668

STT	Nồng độ chế phẩm TAD	Kết quả vi sinh vật còn sống sau thời gian ủ (CFU/l)	
		Thời gian ủ 15 phút	Thời gian ủ 30 phút
1	Cao chiết gốc	0	0

2	Cao chiết pha loãng 1/9	0	0
3	Cao chiết pha loãng 1/19	0	0
4	Cao chiết pha loãng 1/49	39,2 x 10 ²	22,4 x 10 ²
5	Cao chiết pha loãng 1/99	60,5 x 10 ²	35,7 x 10 ²

Nhận xét: Chế phẩm TAD có khả năng tiêu diệt 100% vi khuẩn *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở các nồng độ: cao chiết gốc, cao chiết pha loãng 1/9, cao chiết pha loãng 1/19 ở cả hai thời gian ủ là 15 phút và 30 phút. Tuy nhiên ở nồng độ pha loãng 1/49 và 1/99 thì không còn khả năng diệt khuẩn hoàn toàn ở cả thời gian ủ 15 phút và 30 phút. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của chế phẩm TAD đối với chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở các nồng độ ủ 15 phút và 30 phút đều là nồng độ pha loãng 1/19.

KẾT LUẬN: : Như vậy bước đầu nhóm nghiên cứu đã xác định được nồng độ kháng khuẩn tối thiểu (MIC) của chế phẩm TAD trên 2 chủng vi *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở thời gian ủ 15 phút và 30 phút đều là nồng độ pha loãng 1/19.

Phụ lục hình ảnh

3.1. Xác định hoạt tính kháng khuẩn in vitro của chế phẩm TAD



3.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu của chế phẩm TAD trên 2 chủng vi khuẩn



Nghiên cứu tính kích ứng da và tác dụng kháng khuẩn của “Cao tiêu viêm trị độc-TAD” trên thực nghiệm

EXPERIMENTAL STUDY ON SKIN IRRITATION AND ANTIBACTERIAL EFFECTS OF “TAD - ANTI-INFLAMMATORY AND DETOXIFYING EXTRACT”

Lê Hải Thảo¹, Vũ Nam¹, Nguyễn Thị Thu Hằng²,
Phạm Thanh Tùng², Nguyễn Thị Minh Thu²

¹ Bệnh viện Y học cổ truyền Trung Ương, ² Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

Tác giả liên hệ: Lê Hải Thảo

Điện thoại: 0986189006

E-mail: lehaithaogd@gmail.com

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá tính kích ứng da và tác dụng kháng khuẩn của Cao tiêu viêm trị độc-TAD (chế phẩm TAD) trên thực nghiệm.

Đối tượng và phương pháp: Đánh giá tính kích ứng da trên thỏ theo hướng dẫn của Bộ Y tế và OECD. Tác dụng kháng khuẩn được đánh giá trên 2 chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 và *Streptococcus mutans* ATCC 35668 bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch và đếm khuẩn lạc.

Kết quả: Da thỏ hoàn toàn bình thường, khỏe mạnh, không có biểu hiện dị ứng, phù nề hay viêm khi đắp 2,0 g mẫu thử trên diện tích da $2,5 \times 2,5$ cm trong suốt 24 giờ. Chế phẩm TAD có tính kháng khuẩn tốt in vitro trên 2 chủng *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus mutans* ở các nồng độ 0,01, 0,02, 0,05, 0,1 và 1 g/ml với giá trị MIC ở 15 và 30 phút ở đều là 0,05 g/ml.

Kết luận: Cao tiêu viêm trị độc-TAD không gây kích ứng da thỏ và có tính kháng khuẩn với 2 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 và *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

Từ khóa: Cao tiêu viêm trị độc-TAD, kích ứng da, tác dụng kháng khuẩn in vitro.

SUMMARY

Objectives: To evaluate the skin irritation and antibacterial effects of "TAD-anti-inflammatory and detoxifying extract" (TAD preparation) in experiments.

Subjects and Methods: Skin irritation was assessed on rabbits according to the guidelines of the Ministry of Health of Vietnam and OECD. Antibacterial effects were evaluated on two bacterial strains including *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Streptococcus mutans* ATCC 35668 by agar well diffusion and colony counting methods.

Results: Rabbits' skins were completely healthy with no signs of allergy, edema or inflammation when 2.0 g of samples were applied to skin areas of 2.5×2.5 cm continuously for 24 hours. The TAD preparation had good in vitro antibacterial effects on 2 strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* at concentrations of 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 and 1 g/ml with MIC values at 15 and 30 minutes of incubation both being 0.05 g/ml.

Conclusions: "TAD-anti-inflammatory and detoxifying extract" did not irritate rabbits' skins and had good antibacterial effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

Key words: TAD-Anti-inflammatory and Detoxifying Extract, skin irritation, in vitro antibacterial effect.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm da cơ địa (VDCĐ) là một bệnh da mạn tính tái phát, có liên quan đến cơ địa dị ứng. Nguyên nhân của VDCĐ là tổng hợp của nhiều yếu tố như di truyền, miễn dịch, nhiễm trùng hàng rào bảo vệ da [5].

Hiện nay, điều trị VDCĐ chủ yếu là điều trị triệu chứng bằng corticoid bôi và các chế phẩm ức chế calcineurin tại chỗ, kết hợp giữ ẩm cho da, dùng kháng histamin H1 theo đường uống kết hợp các chất ức chế miễn dịch khác và chống phân bào. Y học cổ truyền (YHCT) có nhiều vị thuốc dưới dạng uống, ngâm rửa, bôi ngoài để điều trị VDCĐ. Một số bài thuốc, vị thuốc đã được nghiên cứu dược lý và thể hiện hiệu quả tốt, độc tính thấp, dễ sử dụng và có khả năng phát triển thành dạng thuốc dùng điều trị trên người [1]. Xuất phát từ nhu cầu phát triển dược liệu trong y học, Khoa Da liễu, bệnh viện YHCT Trung Ương, với hơn 10 năm kinh nghiệm sử dụng bài thuốc gồm các vị Đại hoàng, Hoàng bá, Hoàng đằng, Ké đầu ngựa, Lá móng, Khổ sâm dùng làm thuốc ngâm để điều trị tổn thương của VDCĐ, đã đạt được những kết quả khả quan nhất định. Tuy nhiên, cho đến nay, chưa có nghiên cứu khoa học rõ ràng để đánh giá tính an toàn và tác dụng của bài thuốc trên.

Vì vậy, để góp phần phát triển dạng thuốc dùng ngoài da trong điều trị VDCĐ từ các dược liệu trên, nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá tính kích ứng da và tác dụng kháng khuẩn trên thực nghiệm của Cao tiêu viêm trị độc-TAD (chế phẩm TAD) do Bệnh viện sản xuất.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Chế phẩm TAD

Cao tiêu viêm trị độc-TAD (chế phẩm TAD) được chiết xuất từ 6 dược liệu (đạt tiêu chuẩn cơ sở hoặc tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V) gồm: Hoàng bá (*Cortex Phellodendri*), Đại hoàng (*Rhizoma Rhei*), Hoàng bá (*Caulis et Radix Fibraureae*), Ké đầu ngựa (*Fructus Xanthii strumarii*), Khổ sâm (*Folium et Ramulus Crotonis tonkinensis*), Lá móng (*Folium Lawsoniae*). Dược liệu sau khi thu hái, được phân loại, rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ 70°C, sau đó thái phiến rồi chiết với nước tinh khiết (3 lần), lọc lấy dịch trong. Gộp 3 dịch chiết rồi cô bột để được cao lỏng. Mỗi 252 ml chế phẩm TAD chứa: Hoàng bá 42 g, hoàng đằng 42 g, đại hoàng 42 g, ké đầu ngựa 42 g, khổ sâm 42 g, lá móng 42 g. Liều dùng dự kiến trên người là 100 ml/ngày (100 g dược liệu/ngày). Chế phẩm được chiết xuất tại Khoa Dược, Bệnh viện Y học cổ truyền Trung Ương và đã được kiểm nghiệm đạt tiêu chuẩn cơ sở.

Động vật, vi khuẩn

Thỏ trưởng thành (*Oryctolagus cuniculus* L.), 06 con, cân nặng $2,1 \pm 0,2$ kg, 2 tháng tuổi, khỏe mạnh, không phân biệt đực - cái, do Trung tâm nghiên cứu dê và thỏ Sơn Tây cung cấp. Động vật cái không mang thai, không nuôi con bú và chưa sinh sản lần nào. Thỏ được nuôi ổn định 5 ngày trong điều kiện thí nghiệm trước khi tiến hành nghiên cứu.

Các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 và *Streptococcus mutans*

ATCC 35668 do Viện kiểm nghiệm thuốc Trung Ương cung cấp.

Thuốc, hóa chất

Các hóa chất để pha môi trường nuôi cấy vi khuẩn gồm: môi trường casein đậu tương lỏng, thạch dinh dưỡng và Mueller-Hinton đều tinh khiết, do công ty Himedia (Ấn Độ) sản xuất.

Thiết bị và dụng cụ

- Nước cất, tông đơ điện, kéo, pank, ống đong thủy tinh chia vạch, băng, gạc vô trùng, kính lúp.

- Cân phân tích, nồi hấp tiệt trùng, tủ ấm, tủ cấy vi sinh, tủ lạnh, tủ sấy, ống MacFaland, bình định mức 100 ml, bình tam giác, bông không thấm nước, cốc thủy tinh 100 ml, 250 ml, đèn cồn, đĩa petri, đĩa thủy tinh.

Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá tính kích ứng da

Tiến hành trên thỏ theo hướng dẫn của Bộ Y tế và OECD 404 [2], [3], [6].

Trước thí nghiệm, làm sạch lông thỏ ở vùng bên sườn một khoảng đủ rộng để đặt các mẫu thử và đối chứng (khoảng 10 x 15 cm). Chỉ những thỏ có da khoẻ mạnh, đồng đều và lành lặn mới được dùng vào thí nghiệm. Cắt các miếng gạc vô trùng với kích thước 2,5 x 2,5 cm từ miếng gạc lớn ban đầu có độ dày 2 mm. Tẩm mỗi miếng gạc với 2,0 ml Cao Tiêu viêm trị độc-TAD. Mỗi miếng gạc chứa 2,0 g dược liệu. Mỗi thỏ đều có vùng da bên sườn đặt 1 miếng gạc Cao Tiêu viêm trị độc-TAD và bên cạnh đó đặt 1 miếng gạc tẩm nước cất, cách nhau 2 cm. Đặt trên da thỏ ở một bên sườn 1 miếng gạc tẩm mẫu thử và bên cạnh là 1 miếng gạc tẩm nước cất. Cố định miếng gạc bằng băng dính không gây kích ứng da và gạc trong 24 giờ. Tại mỗi thời điểm quan sát, bỏ gạc và băng dính, dùng nước cất lau nhẹ để làm sạch mẫu thử còn lại trên da.

Quan sát và ghi điểm phản ứng trên chỗ da đặt chất thử so với da không đặt chất thử ở các thời điểm 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ và 24 giờ sau khi làm sạch mẫu thử. Đánh giá phản ứng trên da ở các mức độ gây ban đỏ, phù nề theo qui định ở bảng 2.

Bảng 1. Mức độ phản ứng trên da thỏ

Phản ứng	Điểm đánh giá
Sự tạo vảy và ban đỏ	
- Không ban đỏ	0
- Ban đỏ rất nhẹ (vừa đủ nhận thấy)	1
- Ban đỏ nhận thấy rõ	2
- Ban đỏ vừa phải đến nặng	3
- Ban đỏ nghiêm trọng (đỏ tấy) đến tạo thành vảy để ngăn ngừa sự tiến triển của ban đỏ	4
Gây phù nề	
- Không phù nề	0
- Phù nề rất nhẹ (vừa đủ nhận thấy)	1

- Phù nề nhận thấy rõ (viên phù nề phồng lên rõ)	2
- Phù nề vừa phải (da phồng lên khoảng 1mm)	3
- Phù nề nghiêm trọng (da phồng lên trên 1mm và có lan rộng ra vùng xung quanh)	4
Tổng số điểm kích ứng tối đa có thể	8

Trên mỗi thỏ, điểm phản ứng được tính bằng tổng số điểm ở hai mức độ ban đầu và phù nề chia cho số lần quan sát. Điểm kích ứng của mẫu thử được lấy trung bình điểm phản ứng của các thỏ đã thử. Chỉ sử dụng các điểm tại thời gian quan sát ở 6 giờ để tính kết quả. Đối chiếu điểm kích ứng với các mức độ quy định trên bảng 2 để xác định khả năng gây kích ứng trên da thỏ của mẫu thử.

Bảng 2. Phân loại các phản ứng trên da thỏ

Loại phản ứng	Điểm trung bình
Kích ứng không đáng kể	0-0,5
Kích ứng nhẹ	> 0,5-2,0
Kích ứng vừa phải	> 2,0-5,0
Kích ứng nghiêm trọng	> 5,0 - 8,0

Đánh giá tác dụng kháng khuẩn

Tiến hành theo phương pháp khuếch tán giếng thạch và đếm khuẩn lạc [4].

Hoạt hóa chủng vi khuẩn: Cây vi khuẩn trên môi trường dinh dưỡng Casein đậu tương. Khi vi khuẩn phát triển làm đục môi trường thì cấy chuyển sang môi trường thạch dinh dưỡng, bảo quản trong tủ lạnh ở 2 - 8 °C.

Thăm dò nồng độ kháng khuẩn của chế phẩm TAD

- Chuẩn bị dung dịch pha loãng chế phẩm TAD và huyền dịch 02 loại vi khuẩn:

Từ ống nghiệm gốc chứa chế phẩm TAD (1 g/ml), pha loãng với nước cất để được các dung dịch có nồng độ 0,1, 0,05, 0,02 và 0,01 g/ml.

Pha huyền dịch chứa vi khuẩn chuẩn từ khuẩn lạc thuần nuôi trong môi trường thạch dinh dưỡng đến khi đạt độ đục tương đương 0.5 độ McFarland (10^8 vi khuẩn/ml). Cấy chuyển vi khuẩn sang môi trường Mueller Hinton.

- Đánh giá tác dụng kháng khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch: Từ khuẩn lạc thuần, pha huyền dịch vi khuẩn nồng độ 10^8 vi khuẩn/ml (cấy chuyển vào 2ml nước cất vô trùng), điều chỉnh độ đục của huyền dịch vi khuẩn tương đương độ đục chuẩn 0,5 McFarland. Hút 100 µl huyền dịch vi khuẩn, đổ lên bề mặt thạch Mueller- Hinton, dàn đều vi khuẩn trên đĩa môi trường, lần lượt đục các lỗ nhỏ cao trên môi trường, để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, rồi để tủ âm 37°C. Sau 24 giờ, đo vòng ức chế vi khuẩn bằng thước kẹp Panme có độ chính xác 0,1 mm. Đường kính vòng ức chế vi khuẩn được tính bằng giá trị trung bình giữa 3 lần thử nghiệm.

Xác định MIC của chế phẩm TAD

- Chuẩn bị dung dịch pha loãng chế phẩm TAD và huyền dịch 02 loại vi khuẩn: tiến hành tương tự như phần Thăm dò ở trên.

- Ủ vi khuẩn trong dung dịch chế phẩm TAD ở các nồng độ khác nhau trong 15 phút và 30 phút.

- Cấy 100 µl dung dịch ủ ở trên lên đĩa thạch Muller – Hinton và xác định nồng độ chế phẩm TAD thấp nhất và thời gian ủ mà vi khuẩn không mọc được (diệt 99% số lượng vi khuẩn).

Chỉ tiêu đánh giá

Mức độ phản ứng trên da thỏ, sự tạo vảy và ban đỏ, phù nề, kích ứng.

Đường kính vòng kháng khuẩn (mm), Số lượng khuẩn lạc (CFU/ml), nồng độ ức chế tối thiểu (MIC).

Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Số liệu được xử lý **theo phương pháp thống kê y học với cỡ mẫu nhỏ (< 30)**, sử dụng T-test Student, test trước sau (Avant - Après) bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Thời gian và địa điểm

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 5 - 7 năm 2024, tại Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam.

Đạo đức nghiên cứu

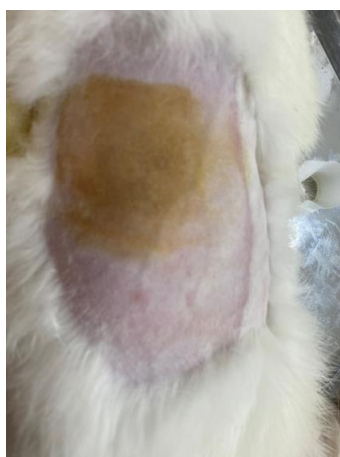
Nghiên cứu tuân thủ các quy định về an toàn sinh học. Số lượng động vật và vi khuẩn nằm trong giới hạn quy định, đủ để thu được kết quả có độ tin cậy và xử lý thống kê.

Động vật và vi khuẩn sau khi sử dụng được loại bỏ theo quy định.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Tính kích ứng da

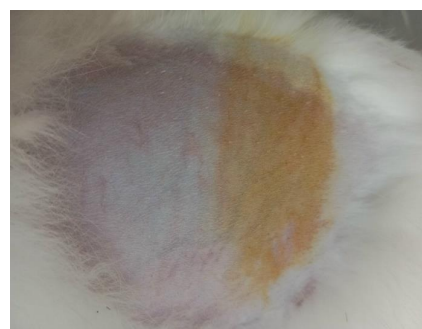
Trong suốt thời gian theo dõi, sau khi đặt thuốc 1, 2, 4, 6 và 24 giờ, vùng da đặt mẫu thử vẫn bình thường, không có dấu hiệu ban đỏ, không bị kích ứng, không phù nề hay viêm. Sau khi bóc mẫu thử, vùng da đặt chất thử có màu nâu vàng, nhưng da nguyên vẹn, lành lặn, không có biểu hiện sưng tấy, đỏ hay viêm nhiễm. Da hoàn toàn khỏe mạnh. Vùng da đặt chất thử và vùng da chứng tương tự nhau (hình 1-5).



Hình 1: Da thỏ số 3 sau 1 giờ đặt mẫu thử



Hình 2: Da thỏ 2 sau 2 giờ đặt mẫu thử



Hình 3: Da thỏ 5 sau 4 giờ đặt mẫu thử



Hình 4: Da thỏ 1 sau 6 giờ đặt mẫu thử

Hình 5: Da thỏ 6 sau 24 giờ đặt mẫu thử

Cả 6 thỏ đều có vùng da đặt mẫu thử lành lặn, bình thường. Vùng da đặt mẫu thử và vùng da đặt nước cất tương tự nhau.

Đánh giá tác dụng kháng khuẩn

Kết quả thử tác dụng kháng khuẩn của chế phẩm TAD được thể hiện ở bảng 3-6.

Bảng 3. Nồng độ kháng khuẩn của chế phẩm TAD đối với *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Nồng độ chế phẩm TAD (g/ml)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)
Cao chiết gốc 1 g/ml	27,10 ± 0,707
0,1	25,05 ± 0,289
0,05	15,95 ± 0,2889
0,02	12,67 ± 0,381
0,01	8,20 ± 0,500

Chế phẩm TAD có khả năng kháng *Staphylococcus aureus* ở tất cả các nồng độ. Đường kính vòng vô khuẩn giảm dần khi nồng độ TAD giảm xuống. Đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất là 27,10 ± 0,707 mm (nồng độ 1 g/ml), lớn hơn có ý nghĩa thống kê so với các nồng độ còn lại ($P < 0,05$) và nhỏ nhất là 8,2 ± 0,500 mm (nồng độ 0,01 g/ml).

Bảng 4. Nồng độ kháng khuẩn của chế phẩm TAD đối với *Streptococcus mutans* ATCC 35668

Nồng độ chế phẩm TAD (g/ml)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)
Cao chiết gốc 1 g/ml	28,67 ± 0,661
0,1	26,50 ± 0,541
0,05	16,33 ± 0,567
0,02	13,10 ± 0,567
0,01	8,8 ± 0,333

Ở tất cả các nồng độ đã thử, chế phẩm TAD có khả năng kháng *Streptococcus*

mutans. Đường kính vòng vô khuẩn tăng giảm tỷ lệ thuận với nồng độ TAD. Đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất ở nồng độ 1 g/ml ($28,67 \pm 0,661$ mm), lớn hơn có ý nghĩa thống kê so với các nồng độ còn lại ($P < 0,05$) và nhỏ nhất ở nồng độ 0,01 g/ml ($8,8 \pm 0,333$ mm).

Bảng 5. MIC của chế phẩm TAD đối với *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Nồng độ chế phẩm TAD (g/ml)	Số vi khuẩn còn sống sau thời gian ủ (CFU/ml)	
	15 phút	30 phút
Cao chiết gốc 1 g/ml	0	0
0,1	0	0
0,05	0	0
0,02	$34,5 \times 10^2$	$19,5 \times 10^2$
0,01	$56,5 \times 10^2$	$27,2 \times 10^2$

Chế phẩm TAD có khả năng diệt 100% vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ở các nồng độ 0,05, 0,1 và 1 g/ml với thời gian ủ 15 và 30 phút. Ở nồng độ pha loãng 0,02 và 0,01 g/ml, TAD không còn khả năng diệt khuẩn hoàn toàn. MIC của chế phẩm TAD đối với *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ở 15 phút và 30 phút ủ đều là 0,05 g/ml.

Bảng 6. MIC của chế phẩm TAD đối với *Streptococcus mutans* ATCC 35668

Nồng độ chế phẩm TAD (g/ml)	Số vi khuẩn còn sống sau thời gian ủ (CFU/ml)	
	15 phút	30 phút
Cao chiết gốc 1 g/ml	0	0
0,1	0	0
0,05	0	0
0,02	$39,2 \times 10^2$	$22,4 \times 10^2$
0,01	$60,5 \times 10^2$	$35,7 \times 10^2$

Ở các nồng độ 0,05, 0,1 và 1 g/ml, chế phẩm TAD có khả năng diệt 100% vi khuẩn *Streptococcus mutans* ATCC 35668 với thời gian ủ 15 và 30 phút. Hai nồng độ 0,01 và 0,02 g/ml không có khả năng diệt khuẩn hoàn toàn ở cả thời gian ủ 15 và 30 phút. MIC của chế phẩm TAD đối với chủng *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở 15 và 30 phút ủ đều là 0,05 g/ml.

BÀN LUẬN

Việc đánh giá tính kích ứng da thường được tiến hành trên động vật có tính mẫn cảm cao. Trong số các loài động vật, thỏ có vùng da rất mỏng và nhạy cảm, đồng thời khá rộng

đủ để đặt mẫu thử nên thường được lựa chọn. Các chỉ số đánh giá gồm ban đỏ, phù nề, viêm, tạo vảy, mụn nước hoặc bất cứ biểu hiện bất thường nào trên da [6], [7].

Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở liều 2,0 g/diện tích da $2,5 \times 2,5$ cm trong 24 giờ liên tục, da thỏ vẫn bình thường, lành lặn, không có ban đỏ, không phù nề, không viêm. Vùng da đặt thuốc tương tự vùng da chứng. Điều này chứng tỏ chế phẩm TAD an toàn với da thỏ ở liều đã thử nghiệm.

Tác dụng kháng khuẩn được nghiên cứu bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch và đếm khuẩn lạc, là phương pháp phổ biến hiện nay với ưu điểm đơn giản, chi phí thấp, cho kết quả nhanh chóng, khả năng kháng vi khuẩn được thể hiện qua đường kính vòng ức chế vi khuẩn và số CFU/ml. Kết quả từ bảng 3-6 cho thấy, chế phẩm TDA ở các nồng độ 0,01, 0,02, 0,05, 0,1 và 1 g/ml đều có tác dụng kháng 2 loài *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus mutans* với giá trị MIC đều là 0,05 g/ml ở 15 và 30 phút ủ. Điều này chứng tỏ TAD có khả năng diệt khuẩn tốt.

Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Sato và cộng sự (1997) khi đánh giá tác dụng của xanthatin (phân lập từ Lá móng) cho thấy kháng tốt các loài *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus mutans* [8].

KẾT KUẬN

Cao Tiêu viêm trị độc-TAD (chế phẩm TAD) với liều 2,0 g dược liệu/diện tích da $2,5 \times 2,5$ cm an toàn với da thỏ. Da thỏ hoàn toàn bình thường, khỏe mạnh, không bất cứ biểu hiện dị ứng hay viêm nào trong 24 giờ đắp mẫu thử.

Chế phẩm TAD có tính kháng khuẩn tốt *in vitro* trên 2 chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 và *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ở các nồng độ 0,01, 0,02, 0,05, 0,1 và 1 g/ml. MIC của TAD với 2 chủng trên ở 15 và 30 phút ủ đều là 0,05 g/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ y tế (2008), “*Bệnh học ngoại – phụ Y học cổ truyền*”, NXB Y học, 75-89.
2. Bộ y tế (2015), “*Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu*”, QĐ 141-BYT-QĐ.
3. Bộ y tế (1999), “*Phương pháp thử kích ứng trên da (áp dụng cho các sản phẩm dùng trong y tế và mỹ phẩm)*”, ban hành kèm quyết định số 3113/1999/QĐ-BYT ngày 11 tháng 10 năm 1999 của bộ trưởng.
4. Trần Linh Thước. - Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm, Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội (2013) 71-101.
5. Trần Hậu Khang (2019), “*Bệnh học da liễu tập 1*”, NXB Y học, 90-98.
6. OECD (2015), *OECD Guidelines for testing of Chemicals, Acute Dermal Irritation/Corrosion*, No.404.
7. Flarer Franco (1955). “*The causes of inflammatory erythema*”, J. Invest. Dermatol, Vol 24, pp. 201-209.
8. Sato Y, Oketani H, Yamada T, Singyouchi KI, Ohtsubo T (1997), “*A Xanthanolide with Potent Antibacterial Activity against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*”, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 49(10), 1042-1044.