

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM**



**ĐẶNG NGUYỄN TÙNG**

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ  
TÁC DỤNG ĐIỀU BIẾN MIỄN DỊCH  
CỦA VIÊN NANG CỨNG TD0070  
TRÊN THỰC NGHIỆM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI, NĂM 2023**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM**



**ĐẶNG NGUYỄN TÙNG**

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ  
TÁC DỤNG ĐIỀU BIẾN MIỄN DỊCH  
CỦA VIÊN NANG CỨNG TD0070  
TRÊN THỰC NGHIỆM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC**

**Chuyên ngành: Y học cổ truyền**

**Mã số: 872 0115**

**Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Trần Thái Hà**

**HÀ NỘI, NĂM 2023**

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, với tất cả lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin được gửi lời cảm ơn đến Đảng ủy, Ban Giám đốc Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam, Phòng đào tạo Sau đại học, các Bộ môn, Khoa phòng của Học viện Y-Dược học cổ truyền Việt Nam, là nơi trực tiếp đào tạo và tận tình giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới toàn thể thầy cô, các anh chị kỹ thuật viên, các em sinh viên đang nghiên cứu khoa học tại bộ môn Dược lý, Đại Học Y Hà Nội đã luôn bên tôi, giúp đỡ tôi trong quá trình tôi thực hiện và nghiên cứu

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Trần Thái Hà, người thầy hướng dẫn trực tiếp luôn theo sát, thường xuyên giúp đỡ, cho tôi nhiều ý kiến quý báu, sát thực trong quá trình học tập và nghiên cứu để hoàn thành luận văn này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS Phạm Thị Vân Anh, Trưởng bộ môn Dược lý, Đại Học Y Hà Nội, người trực tiếp theo dõi, giúp đỡ và cho tôi nhiều ý kiến quý báu trong quá trình nghiên cứu.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất tới gia đình, bạn bè đã luôn đồng hành, động viên, chia sẻ với tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Luận văn hoàn thành có nhiều tâm huyết của người viết, song vẫn không thể tránh khỏi sai sót. Xin cảm ơn sự đóng góp chân thành của quý thầy cô, anh chị em bạn bè đồng nghiệp.

Xin trân trọng cảm ơn!

*Tác giả*

***Đặng Nguyên Tùng***

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Đặng Nguyên Tùng, học viên cao học khóa 14 Học viện Y-Dược Học cổ truyền Việt Nam, chuyên ngành Y học cổ truyền, xin cam đoan:

1. Đây là luận văn do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Trần Thái Hà.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam
3. Các số liệu, thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày ..... tháng .... năm 2023*

Tác giả

Đặng Nguyên Tùng



## MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Tổng quan Miễn dịch theo Y học hiện đại.....	3
1.1.1. Khái niệm.....	3
1.1.2. Phân loại miễn dịch.....	3
1.1.3. Suy giảm miễn dịch.....	10
1.2. Tổng quan suy giảm miễn dịch theo Y học cổ truyền.....	17
1.2.1. Bệnh danh.....	17
1.2.2. Bệnh nguyên.....	18
1.2.3. Các thể lâm sàng.....	18
1.2.4. Thuốc bổ YHCT và tác dụng tăng cường miễn dịch.....	21
1.3. Những nghiên cứu trên thế giới và trong nước về tăng cường miễn dịch và suy giảm miễn dịch.....	22
1.3.1. Trên thế giới.....	22
1.3.2. Tại Việt Nam.....	24
1.4. Tổng quan về bài thuốc nghiên cứu.....	25
1.4.1. Cơ sở khoa học xây dựng bài thuốc.....	25
1.4.2. Tổng quan về các vị thuốc trong nghiên cứu.....	26
1.5. Tổng quan về các phương pháp nghiên cứu độc tính và ý nghĩa về việc nghiên cứu tính an toàn của thuốc y học cổ truyền.....	26
1.5.1. Thuốc y học cổ truyền và nguyên nhân tiến hành thử độc tính.....	26
1.5.2. Các phương pháp thử nghiệm độc tính cấp.....	27
CHƯƠNG 2: CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	31
2.1. Chất liệu nghiên cứu.....	31
2.2. Đối tượng nghiên cứu.....	33

2.3. Phương pháp nghiên cứu .....	33
2.3.1. Nghiên cứu độc tính cấp của TD0070 trên chuột nhắt trắng .....	33
2.3.2. Đánh giá tác dụng điều biến miễn dịch của viên nang cứng TD0070 .....	34
2.4. Thời gian và địa điểm nghiên cứu .....	36
2.5. Sơ đồ nghiên cứu .....	36
2.6. Biến số, chỉ số trong nghiên cứu .....	37
2.7. Phương pháp xử lý số liệu .....	37
2.8. Sai số và biện pháp khống chế sai số .....	37
2.9. Đạo đức trong nghiên cứu .....	38
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....	39
3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của viên nang cứng TD0070 trên chuột nhắt trắng .....	39
3.2. Kết quả về tác dụng của viên nang cứng TD0070 trên các chỉ số miễn dịch chung: .....	40
3.3. Kết quả về tác dụng của viên nang cứng TD0070 trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu:.....	45
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....	51
4.1. Bàn luận về độc tính cấp của viên nang cứng TD0070.....	51
4.2. Bàn luận về tác dụng điều biến miễn dịch của viên nang cứng TD0070. ....	52
CHƯƠNG 5: KẾT LUẬN .....	73
5.1. Kết luận về độc tính cấp của viên nang cứng TD0070. ....	73
5.2. Kết luận về tác dụng điều biến miễn dịch của viên nang cứng TD0070 .....	73
KIẾN NGHỊ .....	73
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

## DANH MỤC BẢNG BIỂU, SƠ ĐỒ

Bảng 2. 1 Thành phần viên nang cứng TD0070 .....	31
Sơ đồ 2.3.1 Nghiên cứu trên mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng CY .....	34
Sơ đồ 2.4 Mô hình nghiên cứu độc tính và tác dụng điều biến miễn dịch trên mô hình thực nghiệm của viên nang cứng TD0070.....	36
Bảng 3.1 Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của TD0070 .....	39
Bảng 3.2 Ảnh hưởng của TD0070 lên trọng lượng lách tương đối.....	40
Bảng 3.3 Ảnh hưởng của TD0070 lên trọng lượng tuyến ức tương đối.....	41
Bảng 3.4 Kết quả giải phẫu vi thể lách và tuyến ức .....	42
Bảng 3.5 Ảnh hưởng của TD0070 lên số lượng bạch cầu .....	43
Bảng 3.6 Ảnh hưởng của TD0070 lên công thức bạch cầu ở máu ngoại vi... 44	
Bảng 3.7 Ảnh hưởng của TD0070 đến phản ứng bì với kháng nguyên OA .. 45	
Bảng 3.8 Ảnh hưởng của TD0070 lên nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi..... 46	
Bảng 3.9 Ảnh hưởng của TD0070 lên nồng độ TNF- $\alpha$ trong máu ngoại vi... 47	
Bảng 3.10 Ảnh hưởng của TD0070 lên nồng độ IFN- $\alpha$ trong máu ngoại vi.. 48	
Bảng 3.11 Ảnh hưởng của TD0070 lên nồng độ IFN- $\gamma$ trong máu ngoại vi. 49	
Bảng 3.12 Ảnh hưởng của TD0070 lên nồng độ IgG trong máu ngoại vi .....	50

## CÁC CHỮ VIẾT TẮT

<b>Chữ viết tắt</b>	<b>Tên Tiếng Anh</b>	<b>Tên Tiếng Việt</b>
BC		Bạch cầu
CCR-5	C-C Chemokin receptor 5	
CXC-4	C-X-C receptor 4	
CY	Cyclophosphamid	
CSF	Colony stimulating factor	Yếu tố kích thích tạo cụm
ĐTB		Đại thực bào
ĐVTN		Động vật thực nghiệm
HCC		Hồng cầu cừu
IL	Interleukin	
INF	Interferon	
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế
DNA	Deoxyribonucleic acid	
KTMD		Kích thích miễn dịch
NK	Natural kill cell	Tế bào diệt tự nhiên
OA		Ovalbumin, albumin lòng trắng trứng gà với Al(OH) <sub>3</sub>
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$	Yếu tố tăng trưởng gây biến chuyển $\beta$
Tc	Cytotoxic T cell	Tế bào T độc
Th	Helper T cell	Tế bào T hỗ trợ
TLLTĐ		Trọng lượng lách tương đối
TLTƯTĐ		Trọng lượng tuyến ức tương đối
TNF	Tumor necrosis factor	Yếu tố hoại tử khối u

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Miễn dịch học đang là một trong những lĩnh vực phát triển mạnh mẽ và có nhiều triển vọng của ngành công nghệ y sinh học. Một hướng nghiên cứu quan trọng và cấp thiết của miễn dịch là các vấn đề liên quan đến phòng ngừa và điều trị rối loạn chức năng miễn dịch: Các bệnh lý suy giảm miễn dịch như viêm gan mạn, ung thư,...[1], [2]; Các bệnh lý do tăng đáp ứng miễn dịch quá mức như bệnh tự miễn, bệnh hệ thống,... Vì vậy, điều biến miễn dịch nhằm khôi phục lại sự cân bằng của hệ thống miễn dịch đang là mục tiêu của các thuốc và hoá chất hiện nay. Các chất điều biến miễn dịch được gọi là các chất kích thích miễn dịch khi làm tăng cường hoạt động chức năng của các tế bào miễn dịch và ngược lại, nếu làm suy giảm hệ miễn dịch của cơ thể được gọi là chất ức chế miễn dịch [1], [2], [3], [4].

Theo Y học cổ truyền hệ thống miễn dịch của cơ thể tương ứng với phản ứng và đấu tranh giữ chính khí và tà khí. Cơ chế tự động điều chỉnh sẽ điều hoà các quá trình sống khác nhau và thích nghi với những thay đổi của môi trường bên trong và bên ngoài cơ thể (Chính khí) . Khi các yếu tố gây bệnh (Tà khí) vượt quá khả năng điều chỉnh thích nghi trong nội bộ cơ thể và bệnh sẽ phát sinh. Vì vậy, phù chính khu tà là nguyên tắc trọng yếu trong điều trị bệnh.

TD0070 dựa trên bài thuốc kinh nghiệm trong đó có sự kết hợp của các vị thuốc: Sài hồ, Tiền hồ, Xuyên khung, Chỉ xác, Khương hoạt, Độc hoạt, Phục linh, Cát cánh, Đảng sâm, Cam thảo, Sinh khương, Bạc hà, Quế chi, Đại diệp đẳng, Cách. Trong đó Đảng sâm, Phục linh, Cam thảo có tác dụng bổ trung ích khí, kiện tỳ, tăng cường chính khí; Sài hồ: thăng dương khí; Tiền hồ, Cát cánh, Chỉ xác lý khí; Bạc hà, Sinh khương giải biểu; Độc hoạt, Xuyên khung, Khương hoạt, Đại diệp đẳng, Quế chi, Cách lông vàng tán phong hàn

thấp, hoạt huyết, thông kinh, chỉ thống. Toàn bài có tác dụng ích khí giải biểu, tán phong hàn, trừ thấp.

Tuy nhiên, hiện tại chưa có nghiên cứu về độc tính cấp và hiệu quả điều biến miễn dịch của TD0070. Vì vậy, để có cơ sở khoa học chính xác trước khi đưa viên nang vào thử nghiệm lâm sàng đồng thời tiến hành những thử nghiệm trên động vật thực nghiệm nhằm minh chứng cho tác dụng của thuốc, chúng tôi tiến hành đề tài **“Nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng điều biến miễn dịch của viên nang cứng TD0070 trên thực nghiệm”** với 2 mục tiêu:

- 1. Đánh giá độc tính cấp của viên nang cứng TD0070 trên thực nghiệm.*
- 2. Đánh giá tác dụng điều biến miễn dịch của viên nang cứng TD0070 trên thực nghiệm.*

## **CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU**

### **1.1. Tổng quan Miễn dịch theo Y học hiện đại**

#### **1.1.1. Khái niệm**

Miễn dịch là khả năng của cơ thể nhận ra và loại bỏ các vật lạ (kháng nguyên). Hệ miễn dịch là một hệ thống bảo vệ vật chủ gồm nhiều cấu trúc và quá trình sinh học của cơ thể nhằm bảo vệ chống lại bệnh tật. Để được coi là hoạt động bình thường, hệ thống miễn dịch phải phát hiện được rất nhiều yếu tố, gọi là mầm bệnh, có thể là từ virus đến ký sinh trùng, và phải phân biệt chúng với những mô khỏe mạnh của cơ thể [1],[8].

#### **1.1.2. Phân loại miễn dịch**

Đáp ứng miễn dịch ở cơ thể con người chia thành 2 loại: đáp ứng miễn dịch tự nhiên và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.

##### **1.1.2.1. Miễn dịch tự nhiên**

Miễn dịch tự nhiên là khả năng tự bảo vệ sẵn có và mang tính di truyền trong các cơ thể. Đó là khả năng tự bảo vệ của một cá thể có ngay từ lúc mới sinh, không đòi hỏi phải có sự tiếp xúc trước của cơ thể với kháng nguyên của vật lạ (không cần có giai đoạn mẫn cảm). Cơ chế này phát huy tác dụng dù là kháng nguyên xâm nhập lần đầu hay những lần sau, nhưng nó có vai trò quan trọng ở lần đầu tiên vì lúc này đáp ứng miễn dịch đặc hiệu chưa phát huy tác dụng. Trong nhiều trường hợp miễn dịch tự nhiên là giai đoạn mở đầu cho miễn dịch đặc hiệu [1],[9],[10].

##### **Các hàng rào đáp ứng miễn dịch tự nhiên:**

*Hàng rào vật lý:* Đó là da và niêm mạc có tác dụng ngăn cách nội môi của cơ thể với môi trường xung quanh. Da lành lặn, không bị tổn thương sẽ cản trở sự xâm nhập của kháng nguyên, đặc biệt lớp tế bào ngoài cùng (sừng hoá) luôn được bong ra và đổi mới tạo ra một cản trở vật lý trước sự xâm

nhập của kháng nguyên. Niêm mạc gồm một lớp tế bào có tác dụng cản trở sự xâm nhập của kháng nguyên lạ, vì ngoài tính đàn hồi như da, nó còn được phủ bởi một lớp chất nhầy. Chất nhầy do những tuyến dưới niêm mạc tiết ra tạo nên màng bảo vệ làm cho vi khuẩn và các vật lạ không bám thẳng được vào tế bào, mà sự bám này là điều kiện tiên quyết để chúng có thể xâm nhập vào sâu hơn. Một số niêm mạc như mắt, miệng... thường xuyên được rửa sạch bởi các dịch tiết loãng. Một số niêm mạc khác như niêm mạc đường hô hấp lại có các vi nhung mao luôn rung động cản bụi mang theo vi sinh vật và các vật lạ, không cho chúng vào phế nang và đẩy ra khỏi phế quản cùng với các phản xạ ho và hắt hơi [1],[9],[10].

*Hàng rào hóa học:* Da và niêm mạc ngoài tác dụng cản trở cơ học chúng còn được tăng cường bởi một số yếu tố hoá học. Trên da có các chất tiết: acid lactic, acid béo của mồ hôi và tuyến mỡ dưới da mà các vi khuẩn không tồn tại lâu được. Tại niêm mạc chất nhầy bảo vệ bề mặt tế bào khỏi bị enzyme của virus tác động. Dịch tiết của các tuyến như nước mắt, nước bọt, nước mũi, sữa... có chứa nhiều lysozym có tác dụng trên vỏ của một số vi khuẩn. Khi kháng nguyên vượt qua được hàng rào da và niêm mạc sẽ gặp phải hàng rào hoá học ngay bên trong cơ thể, đó là dịch nội môi, huyết thanh có chứa lysozym, protein phản ứng C, các thành phần của bổ thể, interferon... Protein phản ứng C là một protein trong huyết thanh có nồng độ tăng cao trong viêm cùng với sự có mặt của ion calci, có tác dụng đối với phế cầu trùng và cố định bổ thể. Bổ thể là một hệ thống gồm nhiều thành phần, bản chất là các chuỗi poly peptid được hoạt hoá theo một trình tự nhất định, khi được hoạt hoá mỗi thành phần của nó sẽ được cắt ra ít nhất là 2 thành phần, mỗi phần có tác dụng riêng. Ví dụ phần C3a và C5a có tác dụng hoá ứng động bạch cầu, gây giãn mạch... Phần C3b, C5b dính vào vi khuẩn giúp cho tế bào thực bào dễ tiếp cận và tiêu diệt vi khuẩn. Interferon là một họ protein được sản xuất bởi nhiều loại tế bào có đặc tính chống một cách không đặc hiệu các



virus, làm cản trở sự xâm nhập và nhân lên của virus. Những tế bào bị nhiễm virus lại có khả năng sinh ra interferon thấm vào các tế bào xung quanh, giúp các tế bào không bị virus xâm nhập tiếp [1],[9],[10].

*Hàng rào tế bào:* Đây là hàng rào quan trọng và phức tạp nhất. Các tế bào có khả năng thực bào đã được Mechnikoff phát hiện ra từ những năm đầu của thế kỷ XX, gồm hai loại: Tiểu thực bào và đại thực bào. Không những trong máu, trong nội môi có tế bào thực bào mà trên niêm mạc cũng có rất nhiều tế bào có khả năng thực bào di tản từ nội môi ra. Tiểu thực bào là những bạch cầu hạt trung tính. Đại thực bào cũng bắt nguồn từ tuỷ xương, phân hoá thành mono bào ở máu hoặc di tản đến các mô trở thành các tế bào của hệ thống võng nội mô. [1],[9],[10].

*Hàng rào thể chất:* là tổng hợp tất cả các đặc điểm hình thái và chức năng của cơ thể. Những đặc điểm đó khá bền vững, có tính di truyền quyết định tính phản ứng của cơ thể trước các yếu tố xâm nhập. Hàng rào thể chất đã tạo nên sự khác biệt về sức đề kháng, tính nhạy cảm giữa các cá thể, các loài.

*Viêm không đặc hiệu:* Tất cả các cơ chế bảo vệ kể trên có thể thấy ở một hiện tượng rất hay gặp đó là viêm không đặc hiệu (viêm cấp) với biểu hiện là phản ứng tuần hoàn và phản ứng tế bào với các triệu chứng sưng, nóng, đỏ, đau, nhằm tiêu diệt và loại bỏ các tác nhân xâm nhập.

#### **1.1.2.2. Miễn dịch đặc hiệu**

Miễn dịch đặc hiệu (miễn dịch đặc hiệu) là trạng thái miễn dịch xuất hiện khi cơ thể đã có tiếp xúc với kháng nguyên. Kháng nguyên được đưa vào chủ động hay ngẫu nhiên. Miễn dịch đặc hiệu có thể có được khi truyền các tế bào có thẩm quyền miễn dịch hoặc truyền kháng thể vào cơ thể [9],[11].

#### **Hệ thống đáp ứng miễn dịch đặc hiệu:**

Để loại trừ kháng nguyên lạ khi xâm nhập vào cơ thể, hệ thống đáp ứng miễn dịch đặc hiệu sử dụng hai phương thức: Đáp ứng miễn dịch dịch thể và

đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào. Cả hai phương thức đáp ứng miễn dịch đều trải qua 3 bước: Nhận diện, hoạt hoá và hiệu ứng.

*Bước nhận diện kháng nguyên:* Khi kháng nguyên xâm nhập vào cơ thể sống sẽ gặp sức đề kháng đầu tiên của cơ thể là đáp ứng miễn dịch tự nhiên. Trong phản ứng bảo vệ này, đại thực bào đóng một vai trò rất quan trọng. Nếu hiện tượng thực bào là một phần của đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu thì đồng thời cũng là bước khởi đầu của đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Trong đáp ứng miễn dịch đặc hiệu đại thực bào có chức năng xử lý và trình diện kháng nguyên. Những kháng nguyên lạ sau khi bị các tế bào thực bào tiêu trong túi thực bào thì một số sản phẩm giáng hoá của chúng được đưa ra ngoài màng thực bào kết hợp với phân tử MHC II (Phức hợp hoà hợp mô chủ yếu) để trình diện cho các tế bào có thẩm quyền miễn dịch. Lympho bào là những tế bào sẽ tham gia vào đáp ứng miễn dịch đặc hiệu [9],[10],[11].

*Bước hoạt hoá:* Các lympho bào có receptor tương ứng với tế bào thực bào trình diện (TCR đối với lympho bào T và BCR đối với lympho bào B) sẽ tiếp nhận kháng nguyên. Khi có sự liên kết giữa hai tế bào như thế sẽ tạo ra quá trình hoạt hoá các lympho bào. Nếu là lympho bào B sẽ hình thành đáp ứng miễn dịch dịch thể, nếu là lympho bào T thì sẽ hình thành đáp ứng miễn dịch tế bào. Tế bào trí nhớ: Một số lympho bào B và T đã được miễn cảm sẽ trở thành các tế bào trí nhớ, nếu tiếp xúc lại với kháng nguyên đã gây miễn cảm sẽ tạo ra đáp ứng miễn dịch với cường độ mạnh hơn và thời gian duy trì đáp ứng nhanh và dài hơn [9],[11].

*Bước hiệu ứng:* Tạo ra các kháng thể hoặc các tế bào T dưới lớp da tiêu diệt kháng nguyên. Khi kháng nguyên được trình diện cho tế bào lympho B thì tế bào B được hoạt hoá (trực tiếp nếu kháng nguyên không phụ thuộc tuyến ức hoặc gián tiếp qua lympho bào Th nếu kháng nguyên phụ thuộc tuyến ức) và sẽ biệt hoá thành tương bào sản xuất ra kháng thể dịch thể gọi là globulin miễn dịch viết tắt là Ig. Các Ig khi đổ vào dịch nội môi có thể lưu

hành trong đó một thời gian, một số có ái tính với tế bào hạt ái kiềm, một số kết hợp với kháng nguyên có khả năng hoạt hoá bổ thể và làm giải phóng các hoá chất trung gian. Những hiện tượng này được thấy trong phản ứng viêm đặc hiệu. Khi đại thực bào trình diện kháng nguyên cho tế bào lympho T (kháng nguyên phụ thuộc tuyến ức) làm cho những tế bào này được miễn cảm trở thành những tế bào T hoạt hoá và một số trở thành tế bào trí nhớ. Tế bào lympho T hoạt hoá sản xuất ra những chất tương tự như globulin miễn dịch, nhưng chỉ có phần hoạt động kết hợp với kháng nguyên là lộ ra khỏi bề mặt của tế bào. Sự kết hợp kháng nguyên ngay trên bề mặt tế bào sẽ kích thích lympho bào tiết ra các lymphokin.

*Sự điều hoà đáp ứng miễn dịch:* Cũng như mọi đáp ứng của cơ thể sống, đáp ứng miễn dịch một khi xảy ra chịu sự điều hoà phức tạp do nhiều loại tế bào tham gia. Đáng chú ý là T helper (Th: hỗ trợ) và T Suppressor (Ts: T ức chế) và các chất lymphokin [9],[10],[11].

### **Phân loại miễn dịch đặc hiệu**

Miễn dịch đặc hiệu được chia làm hai loại là miễn dịch thể dịch (còn gọi là miễn dịch qua trung gian kháng thể) và miễn dịch tế bào (hay miễn dịch qua trung gian tế bào)

\* *Miễn dịch dịch thể* (humoral immunity): do các tế bào lympho B đảm nhiệm với các globulin miễn dịch lưu hành trong các dịch IgG, IgM, IgA, IgE, IgD.

\* *Miễn dịch qua trung gian tế bào:* do các tế bào lympho T đảm nhận với các dưới nhóm chúng:  $T_{CD4}$ ,  $T_c$ ,  $T_s$ ,  $T_h$  và các cytokin do chúng tiết ra.

### **Những đặc điểm cơ bản của đáp ứng miễn dịch đặc hiệu:**

*Tính đặc hiệu:* Kháng thể dù là dịch thể hay tế bào đều đặc hiệu với một epitop kháng nguyên nhất định, ví như chìa khoá với ổ khoá. Tuy vậy nếu có một kháng nguyên có cấu trúc tương tự như kháng nguyên đặc hiệu có thể xảy ra phản ứng chéo.

*Tính đa dạng:* Số lượng epitop kháng nguyên có trong tự nhiên là vô cùng lớn, vậy mà cơ thể gặp phải vẫn có đủ kháng thể đặc hiệu cho từng loại. Đó là do tính đa dạng về mặt cấu trúc phần cảm thụ của kháng thể.

*Trí nhớ miễn dịch:* Khi kháng nguyên vào lần 1 và được trình diện cho lympho bào thì dòng này được phân triển, trong đó có một số giữ lại hình ảnh của cấu trúc kháng nguyên để cho đáp ứng lần hai, lần ba... Vì thế đáp ứng miễn dịch lần sau có thời gian tiềm tàng ngắn hơn, cường độ đáp ứng mạnh hơn, thời gian duy trì đáp ứng dài hơn [9],[10].

*Sự điều hoà:* Hệ thống miễn dịch tự điều hoà thông qua các thông tin do các tế bào tiết ra như phân tử bám dính, cytokin, Ig.

*Khả năng phân biệt bản chất kháng nguyên:* Trong cuộc đấu tranh sinh tồn hệ miễn dịch giúp cho cá thể sinh vật biết phân biệt kháng nguyên là của mình thì dung nạp, còn kháng nguyên lạ thì loại bỏ. Đó là cứu cánh của đáp ứng miễn dịch.

### **Các cơ quan tham gia đáp ứng miễn dịch**

Cơ quan lympho trung ương

#### **Tuyến ức**

Tuyến ức là nơi trưởng thành của tế bào T. Vùng tủy chứa dày đặc tế bào T lympho và vùng vỏ chứa ít tế bào hơn nhưng chủ yếu là tế bào lympho. Tế bào lympho trong tuyến ức còn gọi là tế bào tuyến ức, là tế bào T ở các giai đoạn phát triển khác nhau. Hầu hết các tế bào T non đều đi vào vỏ tuyến ức, khi trưởng thành chúng sẽ đi vào vùng tủy, do đó vùng tủy chứa chủ yếu tế bào T đã trưởng thành. Chỉ có tế bào T trưởng thành mới đi qua khỏi tuyến ức để vào máu và mô lympho ngoại biên [1],[12],[13].

#### **Tủy xương**

Tủy xương là nơi sản xuất tất cả tế bào máu lưu động kể cả tế bào lympho non. Đây là nơi trưởng thành của tế bào B. Tủy đỏ là loại tủy được tìm thấy trong một cấu tạo lưới dạng mô xốp nằm giữa các bè dài. Những tế

bào tiền thân sẽ phát triển đến trưởng thành và đi ra khỏi tủy qua một hệ thống dày đặc các xoang mạch để vào hệ tuần hoàn. Khi tủy xương bị tổn thương, hoặc khi có các nhu cầu tạo ra nhiều tế bào máu mới thì gan và lách cũng bị huy động để làm chức năng tạo máu [1],[12],[13].

Cơ quan lympho ngoại biên

### **Hạch bạch huyết và hệ thống bạch mạch**

Hạch bạch huyết là những mô cơ quan nhỏ dạng nốt của mô lympho được tìm thấy dọc theo hệ thống bạch mạch ở khắp cơ thể. Một hạch bạch huyết có vùng vỏ bên ngoài và vùng tủy bên trong. Chúng chứa các tế bào bạch huyết và có chức năng làm bộ lọc hoặc bẫy giữ lại các phần tử ngoại lai, có thể bị viêm và sưng khi làm nhiệm vụ này [1],[9],[10].

### **Lách**

Lách là vị trí chủ yếu của đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên đến từ máu. Các tiểu động mạch nhỏ được bao bọc bởi các tế bào lympho, đó là vùng tế bào T của lách. Các nang lympho một số có trung tâm mầm được gắn liền với vùng tế bào T giống như trong hạch. Nang lympho là vùng tế bào B. Khi chemokine được sản xuất thì tế bào T được thu hút đến vùng tế bào T nằm bên cạnh các tiểu động mạch, còn tế bào T đi vào các nang. Lách là cơ quan lọc máu quan trọng, do đó khi mất lách cơ thể rất dễ bị nhiễm trùng với các vi khuẩn có vỏ bọc như phế cầu, màng não vì những vi khuẩn này thường được loại bỏ nhờ sự opsonin hóa và thực bào, mất nách chức năng này không thực hiện được [1],[9],[10].

### **Hệ thống miễn dịch da**

Da chứa một hệ thống miễn dịch được chuyên môn hóa cao gồm lympho và tế bào trình diện kháng nguyên. Da là cơ quan rộng nhất của cơ thể nên là hàng rào vật lý quan trọng nhất ngăn cách cơ thể với vi sinh vật và các vật thể lạ của môi trường bên ngoài.

### **Hệ thống miễn dịch niêm mạc**

Trong lớp niêm mạc của hệ tiêu hóa và hô hấp có tụ tập nhiều tế bào lympho và các tế bào trình diện kháng nguyên có vai trò khởi động đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên đường tiêu hóa và hô hấp. Lớp biểu mô niêm mạc là hàng rào quan trọng ngăn cản sự xâm nhập của các vi sinh vật [1],[9],[10].

### **1.1.3. Suy giảm miễn dịch**

Suy giảm miễn dịch là sự thất bại của hệ thống miễn dịch để bảo vệ khỏi bệnh tật hoặc bệnh ác tính. Suy giảm miễn dịch bao gồm

*Suy giảm miễn dịch nguyên phát* là do các khiếm khuyết di truyền hoặc phát triển trong hệ thống miễn dịch. Những dị tật này có khi biểu hiện sinh ra nhưng có thể khi lớn lên mới xuất hiện.

*Suy giảm miễn dịch thứ phát* hoặc mắc phải là sự mất chức năng miễn dịch do tiếp xúc với các tác nhân gây bệnh, các yếu tố môi trường, ức chế miễn dịch hoặc lão hóa [1],[9],[10].

#### **1.1.3.1. Suy giảm miễn dịch tiên phát**

- Giảm gammaglobulin liên kết giới tính X (X-linked agammaglobulinemia).

- SGMD thông thường (common variable immunodeficiency)

- SGMD nặng phức tạp (severe combined immunodeficiency) còn gọi là bệnh không có tế bào lympho hay “trẻ bong bóng” – “boy in a bubble” (trẻ sống trong túi bong bóng vô trùng, cách ly môi trường bên ngoài )

#### **1.1.3.2. Suy giảm miễn dịch thứ phát**

Là hậu quả của một hay nhiều thành phần thiết yếu của hệ miễn dịch bị mất đi hoặc hoạt động không bình thường biểu hiện từ lúc sinh do những khiếm khuyết di truyền. Những khiếm khuyết này có thể gặp trong cơ chế miễn dịch đặc hiệu hoặc không đặc hiệu. Chúng được phân loại dựa theo vị trí tổn thương trên con đường phát triển hoặc biệt hóa của hệ miễn dịch.

Những cá thể suy giảm miễn dịch thường nhạy cảm với nhiều tác nhân nhiễm trùng khác nhau. Loại nhiễm trùng thường gặp tùy thuộc bản chất của suy giảm miễn dịch của từng cá nhân [1],[9],[10].

### **Hệ miễn dịch đặc hiệu**

Có rất nhiều tình trạng suy giảm miễn dịch là hậu quả của những khiếm khuyết trong quá trình biệt hóa của tế bào mầm và có thể ảnh hưởng đến tế bào T, tế bào B và/hoặc các globulin miễn dịch thuộc các lớp và phân lớp khác nhau.

*\* Các rối loạn của tế bào mầm đa chức năng dòng tủy hoặc dòng lympho*

Một chứng bệnh rất hiếm gặp nhưng gây tử vong liên quan đến sự giảm nặng nề hoặc không có tế bào lympho và tế bào hạt trong khi đó hồng cầu và tiểu cầu vẫn bình thường.

*\* Rối loạn của các tế bào mầm dòng lympho*

Suy giảm miễn dịch kết hợp trầm trọng: Khoảng 50% số bệnh nhân này có suy giảm miễn dịch liên kết nhiễm sắc thể giới tính và một nửa còn lại được di truyền trên nhiễm sắc thể thường. Các chứng suy giảm miễn dịch này được đặc trưng bằng một tình trạng mất miễn dịch tế bào T và B cũng như không có (hoặc có rất ít) tế bào lympho T và B lưu hành trong máu. Trên phim X quang chụp ngực thường không thấy bóng của tuyến ức. Bệnh nhân mắc chứng suy giảm miễn dịch kết hợp trầm trọng này thường rất nhạy cảm với rất nhiều tác nhân gây bệnh như vi khuẩn, virus, nấm và động vật nguyên sinh.

Chẩn đoán thường dựa vào đếm số lượng tế bào T và B cũng như định lượng globulin miễn dịch trong máu. Điều trị bằng ghép tủy xương hoặc cấy gene nhờ vector chuyển gene là một loại virus sao chép ngược.

*\* Rối loạn tế bào T*

Hội chứng DiGeorge: Đây là tình trạng suy giảm miễn dịch liên quan đến tế bào T được biết cận kẽ nhất. Hội chứng này còn được biết dưới một số tên gọi khác như: bất sản/thiếu sản tuyến ức bẩm sinh hoặc suy giảm miễn dịch kèm thiếu năng giáp trạng. Nguyên nhân của hội chứng này là đột biến mất đoạn trên nhiễm sắc thể 22. Đoạn mất có kích thước khác nhau ở từng bệnh nhân nhưng kích thước đoạn mất không tương quan với độ nặng của bệnh. Hội chứng này đi kèm với thiếu năng cận giáp, bệnh tim bẩm sinh, tật tai ở vị trí thấp hơn bình thường và miệng như miệng cá. Những khiếm khuyết này là hậu quả của sự phát triển không bình thường của phôi từ tuần thứ 6 đến tuần thứ 10 trong thai kỳ khi mà tuyến cận giáp, tuyến ức, môi, tai và cung động mạch chủ đang được hình thành. Không phải tất cả trẻ mắc hội chứng này đều có bất sản tuyến ức. Ghép tuyến ức vào giai đoạn sớm của thai (khoảng từ tuần 13 đến tuần 14 của thai kỳ) có thể có tác dụng điều trị. Ghép tuyến ức muộn hơn sẽ gây thái ghép. Ở bệnh nhân mắc hội chứng DiGeorge nặng, ngay cả việc chủng ngừa bằng các vaccine sống giảm độc lực cũng gây nên nhiễm trùng [1],[9],[10].

*\* Suy giảm chức năng tế bào T kèm suy giảm chức năng tế bào B*

Chứng thất điều - giãn mạch (Ataxia-telangiectasia): Đây là một khiếm khuyết của tế bào T kèm với mất khả năng phối hợp điều hòa các động tác (thất điều) và giãn các mạch máu nhỏ ở mắt (giãn mạch). Số lượng tế bào T cũng như chức năng của chúng suy biến ở các mức độ khác nhau. Số lượng tế bào B và nồng độ IgM có thể bình thường hoặc thấp. Nồng độ IgG thường giảm và IgA giảm đáng kể (trong 70% trường hợp). Những bệnh nhân này có nguy cơ cao mắc bệnh ác tính nhất là bệnh bạch cầu. Nguyên nhân bệnh là do hiện tượng đứt gãy trên nhiễm sắc thể 14.

Hội chứng Wiskott-Aldrich: Hội chứng này biểu hiện bằng tình trạng suy giảm chức năng tế bào T trong khi số lượng của quần thể tế bào này vẫn ở mức bình thường. Theo thời gian, chức năng của tế bào T càng ngày càng suy



giảm nặng hơn. Nồng độ IgM thường giảm trong khi IgG vẫn giữ ở mức bình thường. Cả IgA lẫn IgE đều tăng. Trẻ trai mắc chứng này thường bị bệnh chàm rất nặng và xuất huyết dạng mảng dưới da (do khiếm khuyết số lượng và chức năng tiểu cầu). Trẻ thường rất dễ mắc các nhiễm trùng sinh mủ [1],[9],[10].

Khiếm khuyết MHC (Hội chứng bạch cầu trần: Bare leukocyte syndrome): Hội chứng này biểu hiện bằng một khiếm khuyết phức hợp hòa hợp mô chính (MHC) lớp II trên tế bào trình diện kháng nguyên. Vì sự chọn lọc các tế bào CD4 tại tuyến ức phụ thuộc sự hiện diện của phân tử MHC này do đó bệnh nhân thường có số lượng CD4 giảm và dễ bị nhiễm trùng.

*\* Rối loạn tế bào lympho B*

Chứng giảm gamma – globulin máu liên kết giới tính ở nữ nhi: còn được gọi là giảm globulin máu Bruton hoặc chứng không có globulin máu, chứng bệnh này là thể nặng nề nhất trong các chứng bệnh gây giảm globulin máu ở người. Lượng tế bào B cũng như nồng độ của tất cả các globulin miễn dịch đều rất thấp. Chẩn đoán dựa trên đếm số lượng tế bào B và định lượng nồng độ các globulin miễn dịch.

Chứng giảm gammaglobulin máu thoáng qua: Trẻ mới sinh có nồng độ IgG tương đương với nồng độ IgG ở mẹ. Thời gian bán hủy của IgG là 30 ngày do đó nồng độ của chúng sau sinh sẽ giảm đi ở trẻ tự nhiên vào lúc 3 tháng tuổi trẻ bắt đầu tổng hợp được IgG của riêng mình. Vì một lý do nào đó mà sự tổng hợp này ở một số trẻ chỉ bắt đầu sau 2 đến 3 năm. Nguyên nhân có thể là do tế bào T kém phát huy chức năng hỗ trợ của chúng. Khoảng trống trong quá trình tổng hợp IgG này được điều trị bằng liệu pháp bổ sung gamma-globulin.

Thiếu hụt IgA: Thiếu hụt IgA là thể suy giảm miễn dịch thường gặp nhất. Khoảng 20% bệnh nhân thiếu hụt IgA cũng có nồng độ IgG thấp. Những bệnh nhân thiếu hụt IgA thường dễ mắc các bệnh nhiễm trùng đường tiêu hóa,

mắt và tai mũi họng. Các đối tượng này cũng có nguy cơ cao mắc bệnh tự miễn, các bệnh ác tính hệ lympho. Khoảng 30 đến 40% bệnh nhân có lưu hành kháng thể kháng IgA và những bệnh nhân này không nên điều trị bằng  $\gamma$ -globulin [1],[9].

Suy giảm miễn dịch tăng IgM: những bệnh nhân mắc chứng bệnh này có nồng độ IgG và IgA thấp nhưng IgM lại cao một cách bất thường. Cơ thể mắc bệnh không thể chuyển sản xuất IgM sang sản xuất các lớp globulin miễn dịch khác nguyên nhân là do khiếm khuyết trên tế bào CD4. Bệnh nhân rất dễ mắc các bệnh nhiễm trùng sinh mủ. Điều trị bằng  $\gamma$ -globulin tĩnh mạch.

Hội chứng tăng sinh lympho liên kết giới tính: mặc dù khoảng 10% bệnh nhân có biểu hiện chứng giảm gamma globulin bẩm sinh nhưng hầu hết bệnh nhân đều bình thường cho đến khi nhiễm virus Epstein – Barr (EBV). Nhiễm EBV dần dần đưa đến bệnh tăng bạch cầu đơn nhân nhiễm trùng (infectious mononucleosis) rất nặng nề kèm với suy gan, hội chứng tăng sinh tế bào B, thiếu máu bất sản và giảm gamma globulin máu. Khoảng 75% trẻ chết trước 10 tuổi. Nguyên nhân là do bất thường trên chuỗi dài của một nhiễm sắc thể X ở mẹ được truyền cho con trai và trẻ trai này biểu hiện bệnh [1],[9],[10].

### **Hệ miễn dịch không đặc hiệu**

Suy giảm miễn dịch không đặc hiệu tiên phát bao gồm các khiếm khuyết của các tế bào thực bào và tế bào diệt tự nhiên cũng như hệ thống bổ thể.

#### *\* Khiếm khuyết hệ thống thực bào*

Khiếm khuyết của các tế bào thực bào về số lượng và/hoặc chức năng có thể làm tăng khả năng nhạy cảm với nhiều nhiễm trùng khác nhau.

Giảm bạch cầu trung tính theo chu kỳ(*cyclic neutropenia*): Cứ sau thời gian khoảng 3 tuần bình thường thì số lượng bạch cầu trung tính lưu hành trong máu lại giảm thấp trong vòng 1 tuần. Trong thời gian 1 tuần này bệnh

nhân dễ mắc nhiễm trùng. Khiếm khuyết này dường như là do rối loạn sự điều hòa trong quá trình tạo bạch cầu trung tính.

Bệnh tạo u hạt mãn tính (*chronic granulomatous disease*): được đặc trưng bằng phì đại các hạch bạch huyết và gan lách to. Khả năng tiêu diệt mầm bệnh nội bào của bạch cầu suy giảm. Ở đa số bệnh nhân, khiếm khuyết này là do bất thường ở NADPH oxidase.

Suy giảm khả năng bám dính bạch cầu: Do bất thường ở các receptor hoặc phân tử integrin nên bạch cầu kém đáp ứng với các tín hiệu hóa ứng động.

\* Hội chứng Chediak-Higashi:

Hội chứng này biểu hiện bằng giảm tốc độ tiêu diệt mầm bệnh nội bào, giảm các hoạt động do hóa ứng động kèm với mất khả năng hòa màng tiêu thể-thực bào. Đôi khi tế bào diệt tự nhiên cũng rối loạn chức năng cũng như bệnh có thể kèm với các bất thường về tiểu cầu và thần kinh.

\* Các rối loạn của hệ thống bổ thể:

Các bất thường hệ thống bổ thể cũng có thể làm tăng nhạy cảm với nhiễm trùng. Có nhiều bất thường di truyền ảnh hưởng đến nhiều thành phần của hệ thống bổ thể làm tăng khả năng mắc bệnh nhiễm trùng. Điển hình nhất và nặng nề nhất là suy giảm C3 do giảm tổng hợp C3 hoặc do suy giảm yếu tố I hoặc yếu tố H

### **1.1.3.3. Suy giảm miễn dịch liên quan đến nhiễm trùng**

Các nhiễm trùng do vi khuẩn, virus, động vật nguyên sinh, giun sán và nấm có thể gây nên những bất thường của tế bào T, tế bào B, bạch cầu trung tính và đại thực bào. Điển hình nhất trong nhóm bệnh này là Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS). Các suy giảm miễn dịch thứ phát cũng thường thấy trong những bệnh lý ác tính [1].

### **Bất thường miễn dịch trong AIDS**

*Bất thường tế bào lympho:* giảm số lượng tế bào T hỗ trợ (CD4) và hậu quả của nó là đảo ngược tỉ suất CD4+/CD8+. Số lượng tế bào diệt tự nhiên (NK) bình thường nhưng chức năng suy giảm.

*Bất thường chức năng:* Bệnh nhân AIDS tăng cao nguy cơ mắc các nhiễm trùng cơ hội như *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptococcus neoformans*, herpes simplex, herpes zoster, cytomegalovirus, *Mycobacterium avium-intracellulare*... Những bệnh nhân này cũng có nguy cơ cao mắc bệnh ác tính như sarcoma Kaposi. Đáp ứng quá muộn (delayed hypersensitivity response) đối với các kháng nguyên thông thường như uốn ván, bạch hầu, kháng nguyên liên cầu khuẩn, tuberculin, kháng nguyên *Candida*, trichophyton... cũng giảm sút ở bệnh nhân AIDS.

#### **1.1.3.4. Suy giảm miễn dịch liên quan đến quá trình lão hóa**

Các rối loạn này bao gồm suy biến dần vỏ tuyến ức, giảm số lượng tế bào và kích thước tuyến ức, giảm chức năng các tế bào ức chế do đó tăng cao nguy cơ tự hoạt hóa, giảm chức năng tế bào CD4. Ngược lại, chức năng tế bào B ở một mức độ nào đó lại tăng lên.

#### **1.1.3.5. Suy giảm miễn dịch liên quan đến các bệnh lý ác tính và các bệnh khác.**

Suy giảm tế bào B thường gặp trong bệnh đa u tủy (multiple myeloma), chứng macroglobin máu Waldenstrom, bệnh bạch cầu kinh dòng lympho và các lymphoma biệt hóa tốt. Bệnh Hodgkin và các khối u đặc tiến triển cũng làm giảm chức năng tế bào T. Tất cả các tác nhân hóa trị liệu dùng trong điều trị ung thư đều có tác dụng phụ ức chế miễn dịch.

Một số bệnh lý khác có thể gây nên suy giảm miễn dịch có thể nêu tên như bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm, đái tháo đường, suy dinh dưỡng protein năng lượng, bông, xơ gan do rượu, viêm khớp dạng thấp, suy giảm chức năng thận.

## 1.2. Tổng quan suy giảm miễn dịch theo Y học cổ truyền

### 1.2.1. Bệnh danh

Y học cổ truyền không có bệnh danh cụ thể cho bệnh về suy giảm miễn dịch. Tuy nhiên, nếu căn cứ vào các chứng trạng lâm sàng thì các biểu hiện suy giảm miễn dịch tương ứng với chứng Chính khí bất túc của y học cổ truyền.

Chính khí bất túc là bao gồm Âm, Dương, Khí, Huyết, Tinh, Tân dịch cùng với các tạng phủ công năng hư nhược dẫn đến cơ thể sức đề kháng kém, ngoại tà xâm nhập vào gây ra bệnh tật.

Thiên ‘Thông Bình Hư Thực Luận’ (Tổ Vấn 28) viết: “Tinh khí đoạt thì tinh bị hư” [14].

Thiên ‘Điều Kinh Luận’ (Tổ Vấn 62) viết: “Dương hư thì ngoại hàn, âm hư thì nội nhiệt” [14].

Nạn thứ 14 (Nạn Kinh) nêu lên triệu chứng và phương pháp điều trị chứng Ngũ tổn, cho thấy mối quan hệ hư tổn của ngũ tạng.

Sách “Kim Quỹ Yếu Lược” có nguyên một chương bàn riêng về chứng hư lao, trong đó bàn đến mạch, chú trọng chứng dương hư, đề ra các phương pháp trị như ôn bổ, phù chính khu tà, trừ ứ sinh tân... là những nguyên tắc cơ bản để trị hư lao [15].

Đời nhà Kim, Nguyên điều trị bệnh hư lao thường dùng phương pháp cam ôn bổ Tỳ, tư âm nhuận Phế, thanh Tâm giáng hỏa và bổ dưỡng Can Thận.

Đời nhà Minh, sách “Lý Hư Nguyên Giám” nêu lên lý luận về chứng lý hư và chú trọng đến ba tạng Phế, Tỳ và Thận.

Đời nhà Thanh, sách “Bất Cư Tập” ngoài các yếu tố nêu trên, còn thêm trường hợp ngoại cảm gây nên hư tổn.

### 1.2.2. Bệnh nguyên

Hư lao là bệnh lý khá phức tạp do nhiều nguyên nhân gây nên sự giảm sút chức năng các tạng phủ sinh ra âm dương khí huyết đều hư nhưng do có sự thiên thắng nên biểu hiện lâm sàng có những thể bệnh khác nhau. Những nguyên nhân chủ yếu có :

- Tiên thiên bất túc: Yếu tố bẩm sinh, suy yếu, dị dạng từ trong bụng mẹ, dễ mắc cảm nhiễm ngoại tà, tạng Phế bị bệnh trước, từ ngoại cảm dần dần vào nội thương, lúc đầu có thể bị ở một tạng dần dần lan sang các tạng khác, chuyển thành hư lao. Ngoài ra cơ thể suy yếu dễ nhiễm một số bệnh do di truyền: ngũ trì, ngũ nhuyễn từ tuổi nhỏ phát triển thành hư lao. Cũng có khi do sự phát dục kém, khi trưởng thành, thể lực yếu, ốm đau liên miên hoặc sau khi bệnh thể lực yếu, lâu hồi phục, dương khí và âm huyết ngày càng suy dần dần dẫn đến tổn thương ngũ tạng [16], [17].

- Mắc bệnh ngoại cảm hay nội thương lâu ngày không được chữa trị tốt dẫn đến chức năng tạng phủ suy yếu mà thành hư lao.

- Sinh hoạt, làm việc quá sức, ăn uống thiếu điều độ, uống rượu, hút thuốc, gây thương tổn tỳ phế, không hóa sinh được tinh chất, không sinh được khí huyết. Nguồn sinh ra khí huyết không đủ, không điều dưỡng được tạng phủ bên trong, không làm đầy phần doanh vệ bên ngoài, lại kèm bị ngoại cảm hoặc phòng dục tùy tiện gây tổn thương Can Thận ... đều dẫn đến hư lao.

- Thất tình: như tức giận nhiều hại can, vui mừng quá độ hại tâm, lo nghĩ nhiều hại Tỳ, buồn phiền hại Phế, kinh sợ hại Thận , đều là nguyên nhân về tâm thần làm âm dương mất cân bằng, khí huyết hư tổn, tinh hư lao [16],[17]

### 1.2.3. Các thể lâm sàng

#### **Khí hư**

*a- Phế khí hư :*

- Chứng trạng: mệt mỏi, hơi thở ngắn, lúc nóng lúc lạnh, dễ ra mồ hôi, dễ mắc bệnh ngoại cảm, ho khan, sắc da trắng nhạt, lưỡi nhạt, mạch Nhuyễn, Nhược.

- Biện chứng: Hơi thở ngắn, ra mồ hôi là dấu hiệu Phế khí yếu, bì phu không kín vững. Lúc nóng lúc lạnh: dinh vệ không điều hòa. Dễ cảm, ho khan, thở yếu: dấu hiệu Phế khí hư không bảo vệ được phần biểu. Sắc mặt nhạt, lưỡi nhạt, mạch Nhược: dấu hiệu hư nhược [16],[17].

- Pháp điều trị : Ích khí cố biểu.

- Phương thuốc: BỔ Phế Thang (Hòa tễ cục phương).

*b- Tỳ Khí hư:*

- Chứng trạng: mệt mỏi, ăn ít, tiêu lỏng, sắc mặt vàng nhạt, lưỡi nhạt, rêu lưỡi trắng nhuận, mạch Nhược.

- Pháp điều trị: Ích khí kiện Tỳ.

- Phương thuốc: Sâm Linh Bạch Truật Tán (Hòa tễ cục phương).

### **Huyết hư**

*a- Tâm huyết hư :*

- Chứng trạng: hồi hộp hay quên, mất ngủ, mộng nhiều, sắc mặt tái nhợt kém tươi nhuận, môi lưỡi nhợt, mạch Trầm Tế [16],[17]

- Pháp điều trị: Dưỡng tâm, an thần.

- Phương thuốc: Quy Tỳ Thang (Tế sinh phương)

*b- Can huyết hư:*

- Chứng trạng: Váng đầu, hoa mắt, ù tai, sườn đau, bút rút, tính nóng nảy, phụ nữ kinh nguyệt không đều, sắc mặt tái sạm, môi lưỡi nhợt, mạch Huyền Tế.

- Pháp điều trị : BỔ dưỡng can huyết, hoạt huyết, hóa ứ.

- Phương thuốc: Tứ Vật Thang (Hòa tễ cục phương).

### **Dương hư**

*a- Tỳ Dương hư:*

- Chứng trạng: sợ lạnh, chân tay lạnh, mệt mỏi, lúc gặp lạnh dễ đau bụng, tiêu chảy, sắc mặt vàng sạm hoặc tái nhợt, lưỡi nhợt, bệu, rêu trắng, mạch Trì, Nhược hoặc Tế Nhược [16],[17].

- Pháp điều trị : Ôn trung, kiện tỳ.

- Phương thuốc: Phụ Tử Lý Trung Thang (Hòa tễ cục phương).

*b- Thận Dương hư :*

- Chứng trạng: sợ lạnh, chân tay lạnh, lưng gối nhức mỏi, trời lạnh nhức nhiều, di tinh, liệt dương, tiểu nhiều, nước tiểu trong hoặc tiểu gập khó cầm, sắc mặt tái nhợt, giọng nói yếu, có thể hơi ngắn, hụt hơi, thân lưỡi bệu, sắc nhợt, rêu trắng, mạch Trầm Trì.

- Pháp điều trị : Ôn bổ thận dương, dưỡng tinh huyết.

- Phương thuốc: Hữu Quy Hoàn (Cảnh nhạc toàn thư)

Tán bột ngày uống 24g.

Ngoài 2 thể bệnh dương hư trên đây, trên lâm sàng nội khoa thường gặp ngoài những triệu chứng dương hư có thêm triệu chứng chức năng của tâm như hồi hộp, khó thở, hay quên, đau ngực... nhưng hay kết hợp với thận dương hư, Phế dương hư hoặc kèm theo phế khí hư, ít khi biện chứng độc lập.

### **Âm hư**

*a- Phế Âm hư:*

- Chứng trạng: ho khan, ho có máu, họng khô, miệng khô, có khi khàn giọng, người gầy, da nóng, hay sốt về chiều hay về đêm, mồ hôi trộm gò máù hồng, lưỡi đỏ, khô, ít rêu, mạch Tế Sác [16],[17].

- Pháp điều trị: Dưỡng âm, thanh nhiệt, nhuận phế, chỉ khái.

- Phương thuốc: Sa Sâm Mạch Đông Thang (Ôn bệnh điều biện)

*b-Tâm Âm hư :*

- Chứng trạng: hồi hộp, khó ngủ , hay quên, bứt rứt, ra mồ hôi trộm, miệng lở, lưỡi loét, gò má đỏ, sốt về chiều, lưỡi đỏ, ít rêu, mạch Tế Sác.

- Pháp điều trị: Tư âm, thanh nhiệt, dưỡng Tâm, an thần.



- Phương thuốc: Thiên Vương Bổ Tâm Đơn (Thế đặc hiệu phương).

*c- Tỳ Vị Âm hư:*

- Chứng trạng: miệng khô, môi khô, chán ăn, thích uống nước mát, táo bón nặng, có thể nôn khan, mặt đỏ, lưỡi thon, khô, đỏ, có điểm loét hoặc hình địa đồ, mạch Tế Sác [16],[17].

- Pháp điều trị : Tư dưỡng Tỳ Vị.

- Phương thuốc: Ích Vị Thang (Ôn bệnh điều biện).

*d- Can Âm hư:*

- Chứng trạng: Đau đầu, chóng mặt, ù tai, mắt khô, sợ ánh sáng, người nóng nảy, dễ giận hoặc gân cơ giật, lưỡi khô, đỏ tía, mạch Huyền Tế Sác.

- Pháp điều trị : Tư âm, tiềm dương.

- Phương thuốc: Bổ Can Thang (Thảm Thị Dao Hàm - Phó Nhân Vu)

*e- Thận Âm hư:*

- Chứng trạng: đau lưng, mỏi gối, chân yếu, má đỏ, ù tai, dễ rụng tóc, lưỡi đỏ thẫm, khô bóng, mạch Trầm Tế.

- Pháp điều trị: Tư bổ thận âm.

- Phương thuốc: Đại Bổ Âm Hoàn (Đan Khê tâm pháp)

#### **1.2.4. Thuốc bổ YHCT và tác dụng tăng cường miễn dịch**

Hoạt động của hệ miễn dịch tạo ra sức đề kháng cho cơ thể nhằm đối phó với nguyên nhân gây bệnh. Sức đề kháng có vai trò quan trọng với sức khỏe, nó chính là “màng chắn” giúp kháng lại các yếu tố gây bệnh. Hoạt động hệ miễn dịch phải mạnh mẽ, mới duy trì tốt sức đề kháng bệnh tật.

YHCT có hai khái niệm là Chính khí và Tà khí. Chính khí là khả năng phản ứng của cơ thể đối với các nguyên nhân gây bệnh. Tà khí là các nguyên nhân gây bệnh. Chính khí đầy đủ thì tà khí khó có khả năng gây bệnh. Vì vậy, hai nguyên tắc điều trị lớn của YHCT là phù chính và trừ tà. Trong đó phù chính là dùng các thuốc bổ dưỡng nâng cao chính khí, nâng cao sức đề kháng của cơ thể [18],[19].

Chính khí của cơ thể gồm có 4 mặt chính là Âm, Dương, Khí, Huyết.

Phương thức tác động của chính khí bao gồm:

- Tự mình điều tiết để thích ứng với sự thay đổi của nội và ngoại hoàn cảnh để duy trì cân bằng âm dương.

- Kháng lại tà khí để phòng bệnh hoặc khi cơ thể mắc bệnh thì khu tà và đưa ra ngoài.

- Khả năng cơ thể tự hồi phục sau khi bị bệnh hoặc khi cơ thể bị hư nhược thì tự mình thay đổi và hồi phục sức khỏe.

Từ đó có thể nói Chính khí của Đông y tương quan gần với sức đề kháng của Tây y. Hay nói một cách khác: Lý luận về Chính khí của YHCT và quan điểm miễn dịch học có nhiều điểm gần nhau. Vì vậy, việc tăng cường, bồi bổ chính khí của YHCT cũng có nghĩa tương đương với tăng cường hoạt động hệ miễn dịch của cơ thể.

Một số nghiên cứu cũng đã chứng minh, thuốc YHCT có tác dụng trên miễn dịch tế bào, miễn dịch dịch thể và điều tiết miễn dịch.

Có nhiều báo cáo tổng kết nghiên cứu: thuốc bổ ích khí huyết âm dương đa phần có tác dụng tăng cường miễn dịch.

YHCT đã nghiên cứu 4 bài thuốc: Tứ quân, Tứ vật, Lục vị, Sâm phụ thang. Kết quả cho thấy các bài thuốc trên có khả năng xúc tiến chuyển hoá limpho bào, kích thích phản ứng miễn dịch tế bào và hình thành kháng thể. Các vị thuốc như Nhân sâm, Hoàng kỳ, Linh chi, Bỏ cốt chỉ, Câu kỷ tử, Mạch môn... có tác dụng rõ rệt lên hệ thống miễn dịch [17].

### **1.3. Những nghiên cứu trên thế giới và trong nước về tăng cường miễn dịch và suy giảm miễn dịch.**

#### **1.3.1. Trên thế giới**

Rao X.Q và cộng sự (2010) nghiên cứu 242 bệnh nhân ung thư có hội chứng tỳ hư thấy rằng một số chỉ số miễn dịch như hoạt tính thực bào của đại thực bào, khả năng chuyển dạng limpho bào, số lượng các tế bào T<sub>h</sub>, NK thấp

hơn so với người cho máu bình thường. Sau khi điều trị bằng “Sinh huyết thang” các chỉ số miễn dịch đều được cải thiện [12].

WHO và cơ quan quản lý dược phẩm Hoa Kỳ công nhận tảo Spirullina có tác dụng hỗ trợ trong phòng chống ung thư, đó là do các hoạt hóa chất tăng cường miễn dịch, chống oxi hóa, bảo vệ tế bào, chống đột biến gen trong tảo. Khi uống tảo Spirullina lượng chất phóng xạ đã được đào thải khỏi đường niệu ở người bị nhiễm xạ rất cao [20].

Yao – Haur KouLi – Ming Yang Kuo (1997) đã nghiên cứu chứng minh hợp chất triterpene trong cây xạ đen có đánh giá sinh học chống lại ung thư gan và ung thư biểu mô vòm họng và chống sao chép HIV trong tế bào lympho [21].

Toh, Ding – Fung (2011) đã có nghiên cứu chứng minh hấp làm thay đổi thành phần hóa học cũng như các hoạt động sinh học chống tăng sinh của Tam thất. Tam thất có chứa các hợp chất tiềm năng đặc biệt làm tăng thành phần saponin trong điều trị ung thư gan [22].

Hứa Kế Bình (1988) dùng bài Phù phi (Nguyên sâm, Hoàng kỳ, Sa sâm, Tam thất, Bách hợp, Mạch môn, Lô căn, Nga truật, Ngô công, Cát cánh, Trần bì...) điều trị 2 - 10 tháng trên 63 bệnh nhân UTP, theo dõi trong 5 năm thấy thuốc có tác dụng cải thiện miễn dịch, giảm nhẹ triệu chứng và kéo dài thời gian sống [23]

Phan Mẫn Cầu (1990) dùng Phế phụ phương (Bách hợp, Thục địa, Sinh địa, Nguyên sâm, Mạch môn, Đương quy, Bạch thược, Sa sâm, Tang bạch bì, Hoàng cầm, Mẫu đơn, Tầm sa, Bạch hoa xà thiệt thảo) điều trị 40 bệnh nhân UTP tế bào vảy giai đoạn III - IV có so sánh với nhóm chứng dùng hóa trị liệu. Kết quả, thời gian sống thêm của nhóm dùng thuốc YHCT tăng có ý nghĩa thống kê so với nhóm dùng hóa trị liệu [24].

Lưu Nguyên, Lưu Kim Báo, Bàn Vĩ (2020) dùng các thuật toán để nghiên cứu Nhân sâm bại độc tán trong điều trị COVID-19 bằng cách thông

qua cơ sở dữ liệu TCMSP và cơ sở dữ liệu Batman-TCM. Kết quả Nhân sâm bại độc tán có 209 thành phần và 145 đích tiếp nhận ứng dụng trong việc điều trị COVID-19. Các đích tiếp nhận chính là AR, ESR1, PTGS2, NOS2 và GSK3B, v.v. Trong số đó, 40 đích tiếp được biểu hiện tương thích với thụ thể men chuyển 2 (ACE2) của coronavirus mới (SARS-CoV-2). [25].

### **1.3.2. Tại Việt Nam**

Nghiên cứu trên cây nhàu, Phan Thị Phi Phi, Phan Thị Thu Anh, Phạm Huy Quyến và cộng sự đã chứng minh tác dụng kích thích miễn dịch của dịch chiết rễ cây nhàu toàn phần trên chuột nhắt và trên invitro [26].

Nguyễn Phương Thanh, Nguyễn Chí Dũng, Nguyễn Trọng Thông (2020) nghiên cứu Tác dụng kích thích miễn dịch của viên nén Livganic – viên nén Giải độc gan Tuệ Linh trên mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính bằng cyclophosphamid ở chuột nhắt trắng cho kết quả Livganic liều 0,6g/kg đường uống trong 10 ngày liên tục làm tăng nồng độ IgG máu ngoại vi, làm tăng phản ứng bì với kháng nguyên OA, tăng đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào trên mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính [27].

Nguyễn Gia Chấn, Phan Thị Phi Phi (1998) nghiên cứu về tác dụng kích thích miễn dịch polysaccarid chiết từ đương quy cho thấy tác dụng hồi phục đáp ứng miễn dịch tế bào và miễn dịch dịch thể [28].

Đinh Thị Thu Hằng và cộng sự (2020) nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của đông trùng hạ thảo Banikha trên động vật thực nghiệm gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid cho kết quả: Đông trùng hạ thảo Banikha liều 0,77mg/kg/ngày (tương đương với liều dự kiến điều trị trên lâm sàng) và liều 2,31mg/kg/ngày (tương đương với liều gấp 3 lần liều dự kiến điều trị trên lâm sàng) uống trong 7 ngày có tác dụng kích thích miễn dịch thông qua tăng cường rõ rệt đáp ứng miễn dịch tế bào, xu hướng tăng cường miễn dịch dịch thể và xu hướng cải thiện chỉ số chung của hệ miễn dịch [29].

Trần Thị Minh Tâm, Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Minh Đức (2014) nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch của cao xương cá sấu hoa cà cho thấy cao xương CSHC liều 3,77 g/kg có khả năng làm tăng khả năng thực bào, tăng trọng lượng tương đối cơ quan miễn dịch và tăng số lượng bạch cầu tổng, bạch cầu lympho, bạch cầu đơn nhân; trong khi liều 1,89 g/kg chỉ làm tăng khả năng thực bào đạt ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh lý. Các kết quả này cho thấy cao xương CSHC thể hiện tác dụng tăng cường miễn dịch trong suy giảm miễn dịch do cyclophosphamid gây ra. Tuy nhiên, cao xương CSHC chưa cho thấy hiệu quả điển hình trong thử nghiệm gây suy miễn dịch trung gian tế bào (đáp ứng quá mẫn muộn) [30].

Nguyễn Thị Mỹ Nương và cộng sự (2017), Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của Bài thuốc Nam Địa Long trên chuột gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphomide cho kết quả: trên chuột nhất trắng bị suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamide (CY), Nam Địa Long liều uống 1,2 g/kg và 2,4 g/kg giúp hạn chế tình trạng giảm khối lượng cơ thể chuột, tăng khối lượng tương đối của lách, tuyền ức và làm tăng 42 – 44 % số lượng bạch cầu, tăng 48 – 53 % lượng bạch cầu lympho, đặc biệt tăng tỷ lệ phần trăm bạch cầu lympho TCD4 (34–43 %) và lympho TCD8 (35–46 %) so với lô chứng bệnh. Như vậy, bài thuốc Nam Địa Long thể hiện tác dụng kích thích miễn dịch, có tiềm năng phát triển thành sản phẩm hỗ trợ trong hóa trị ung thư [31].

#### **1.4. Tổng quan về bài thuốc nghiên cứu.**

##### **1.4.1. Cơ sở khoa học xây dựng bài thuốc.**

TD0070 có công thức chứa bài thuốc cổ phương Nhân sâm bại độc tán. Gồm 15 vị với các vị giữ nguyên với phương gốc là Sài hồ, Tiền hồ, Xuyên khung, Chi xác, Khương hoạt, Độc hoạt, Phục linh, Cát cánh, Cam thảo, Sinh khương, Bạc hà, thay Nhân sâm bằng Đảng sâm và gia thêm các vị là Quế chi, Đại diệp đẳng, Cách lông vàng. Đảng sâm, Phục linh, Cam thảo có tác dụng bổ trung ích khí, kiện tỳ, tăng cường chính khí; Sài hồ: thăng dương khí;

Tiền hò, Cát cánh, Chỉ xác lý khí; Bạc hà, Sinh khương giải biểu; Độc hoạt, Xuyên khung, Khương hoạt, Đại diệp đằng, Quế chi, Cách lông vàng tán phong hàn thấp, hoạt huyết, thông kinh, chỉ thống. Toàn bài có tác dụng ích khí giải biểu, tán phong hàn, trừ thấp.

#### **1.4.2. Tổng quan về các vị thuốc trong bài thuốc nghiên cứu**

(Danh mục các vị thuốc có trong viên nang cứng TD0070 được thể hiện trong phụ lục kèm theo) [6] [18] [20].

### **1.5. Tổng quan về các phương pháp nghiên cứu độc tính và ý nghĩa về việc nghiên cứu tính an toàn của thuốc y học cổ truyền**

#### **1.5.1. Thuốc y học cổ truyền và nguyên nhân tiến hành thử độc tính**

Thuốc y học cổ truyền Việt Nam đã có lịch sử tồn tại và phát triển từ hàng ngàn năm nay. Lịch sử phát triển của thuốc cổ truyền gắn liền với lịch sử tồn tại, phát triển của dân tộc Việt Nam. Thuốc đông y, thuốc từ dược liệu dễ dàng được đón nhận nhờ vào bề dày lịch sử cũng như người dân tin rằng thuốc YHCT bào chế từ thảo dược sẽ ít có tác dụng phụ hơn so với thuốc tây.

Đáp ứng thị hiếu người tiêu dùng, các nhà sản xuất thuốc cổ truyền của Việt Nam đã “tự do” cho ra đời hàng loạt các chế phẩm không qua thử nghiệm hoặc thử nghiệm không đầy đủ theo chuẩn từ nhiều dược liệu khác nhau, đa dạng phong phú về tên gọi, chủng loại, thành phần, tác dụng cũng như cách bào chế, giá cả tạo nên một thị trường thuốc từ dược liệu, thuốc đông y khó kiểm soát [35].

Vì vậy, việc nghiên cứu độc tính của các thuốc y học cổ truyền nhằm:

- Đánh giá hiệu quả của qui trình bào chế cổ truyền.
- Đánh giá tính an toàn của thuốc.
- Đánh giá tác dụng điều trị.
- Đánh giá tác dụng hỗ trợ điều trị.
- Đánh giá tác dụng có lợi đối với sức khỏe con người.
- Các đánh giá khác tùy theo mục tiêu nghiên cứu.

## **1.5.2. Các phương pháp thử nghiệm độc tính cấp**

### **1.5.2.1. Mục tiêu:**

Thử độc tính cấp nhằm cung cấp thông tin cho việc xếp loại mức độ độc của thuốc; điều trị ngộ độc cấp; thiết lập mức liều cho những thử nghiệm độc tính tiếp theo. Do vậy, các phép thử độc tính cấp cần xác định. [35]

- Liều an toàn;
- Liều dung nạp tối đa;
- Liều gây ra độc tính có thể quan sát được;
- Liều thấp nhất có thể gây chết động vật thí nghiệm (nếu có);
- Liều LD50 gần đúng (nếu có thể xác định được);
- Những triệu chứng ngộ độc điển hình có thể quan sát được trên động vật và khả năng hồi phục (nếu có).

### **1.5.2.2. Mô hình thử**

#### **a) Nguyên tắc lựa chọn:**

Tùy theo mục đích của mỗi nghiên cứu và loại mẫu thử và những thông tin sẵn có để lựa chọn mô hình thử thích hợp. Loài động vật gặm nhấm thường được sử dụng là chuột nhắt, chuột cống; loài không gặm nhấm có thể dùng là chó hoặc khỉ. Số nhóm và số lượng cho mỗi nhóm tùy theo mô hình áp dụng.

Thử sơ bộ: thường được thực hiện trong hầu hết các mô hình thử. Dựa vào kết quả trong thử nghiệm sơ bộ để lựa chọn, bố trí thử nghiệm chính thức. Với những trường hợp thông tin cho thấy mẫu thử hoặc các chất liên quan có thể không độc hoặc ít độc, có thể thử trên một loài động vật (gặm nhấm). Đối với các chế phẩm có độc cao hoặc có yêu cầu đặc biệt về khoa học, cần thiết thử trên hai loài ĐVTN (gặm nhấm và không gặm nhấm).

Khuyến cáo: Để bảo vệ động vật, các mô hình sử dụng số ít động vật thí nghiệm được ưu tiên lựa chọn [35].

#### **Mô hình liều cố định:**

Nguyên tắc: Mô hình thử liều cố định được các nước thuộc OECD áp dụng và ban hành chính thức năm 2001 (OECD 420). Thử nghiệm được thực hiện với các mức liều xác định 5,50,300,2000,5000mg/kg hay 1,0/kg ĐVTN. Lựa chọn liều thử đầu tiên liều thử trên một nhóm 5 ĐVTN. Thử nghiệm tiếp tục cho đến khi xác định mức độ độc dựa trên đáp ứng ĐVTN chết hoặc không và các triệu chứng ngộ độc, khả năng hồi phục quan sát được. Xác định giá trị LD50 gần đúng (nếu có). Phép thử phù hợp với tất cả trường hợp cần xác định độc tính cấp.

### **Mô hình Tăng- Giảm:**

Nguyên tắc: Mô hình thử Tăng- Giảm được các nước thuộc OECD áp dụng và ban hành chính thức năm 2001 (OECD 425). Thử nghiệm được tiến hành trên các mức liều được tính theo hệ số bước nhảy liều, thực hiện lần lượt trên từng ĐVTN theo tiến trình tăng hoặc giảm liều và tiếp tục cho đến khi đạt điều kiện dừng lại. Đánh giá kết quả bằng quan sát các biểu hiện và triệu chứng ngộ độc theo qui định chung và tính giá trị LD50 gần đúng (nếu có) theo qui định riêng của phương pháp.

Phương pháp này áp dụng phù hợp cho các chất có thể gây chết nhanh trong 1-2 ngày không phù hợp cho các chất gây chết từ từ trong 5 ngày hoặc hơn. Ngoài ra, có thể áp dụng phương pháp này trong trường hợp cần thử trên loài động vật không gặm nhấm.

### **Mô hình thử theo Behrens:**

Nguyên tắc: Mô hình được Behrens đề xuất từ năm 1929 với lập luận “Những con vật đã sống ở một mức liều thử nào đó thì sẽ sống với tất cả những mức liều thấp hơn và những con vật đã chết ở một mức liều sẽ chết ở tất cả các mức liều cao hơn”.

### **Mô hình theo Litchfield – wilcoxon:**

Nguyên tắc: Mô hình được Litchfield- Wilcoxon đề xuất năm 1949 sau khi xem xét, cải tiến và cố gắng khắc phục những hạn chế của một số phương



pháp trước đó. Kết quả được ghi đồ thị trên giấy log- probit và được tính theo phương pháp toán đồ có hiệu chỉnh, do vậy cho kết quả chính xác hơn. Trước đây, phương pháp thường được áp dụng trong tính giá trị LD50 cho những chất có độc tính cao.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp Litchfield – Wilcoxon do có tính chính xác cao nhất.

### **1.5. Tổng quan về các mô hình gây suy giảm miễn dịch trên thực nghiệm**

Các chất có tác dụng điều biến, tăng cường hoặc điều hòa miễn dịch thường được nghiên cứu trên các mô hình làm suy giảm miễn dịch do những chất này thường ít có tác dụng trên động vật bình thường không suy giảm miễn dịch [6]. Mô hình suy giảm miễn dịch được gây ra bởi các tác nhân gây suy giảm miễn dịch bao gồm: Thuốc hoặc hóa chất; yếu tố vật lý như phóng xạ, bức xạ ion; các tác nhân vi sinh vật như nấm, vi khuẩn, virus.

Hóa chất thường được sử dụng để gây suy giảm miễn dịch gồm corticoid, cyclophosphamid (CY), kháng purin, methotrexat..., trong đó mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY được sử dụng nhiều, chủ yếu trên chuột nhắt trắng hoặc chuột cống trắng [7], [36], [37], [38],[39]. Cyclophosphamid là chất gây độc tế bào được sử dụng nhiều nhất trong nhóm alkyl hóa để điều trị ung thư [40] bằng cách alkyl hóa sợi DNA dẫn tới ức chế phân bào. Do vậy, tác dụng CY mạnh nhất lên các mô có tốc độ phân chia nhanh như tủy xương. Tuy nhiên, CY cũng có tác dụng lên các mô khác có tốc độ phân chia chậm hơn (ví dụ gan, thận, tổ chức lympho trưởng thành như lách, tuyến ức) [40].

Có nhiều cách sử dụng cyclophosphamid trong việc gây mô hình suy giảm miễn dịch. CY có thể được sử dụng ở một liều cao hoặc nhiều liều nhỏ để gây suy giảm miễn dịch. Phan Thị Phi Phi và cộng sự nghiên cứu mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY đã kết luận: dùng CY liều duy nhất 200 mg/kg là tối ưu nhất [36].

Một số nhà nghiên cứu trên thế giới sử dụng CY nhiều liều nhỏ để gây tình trạng suy giảm miễn dịch kéo dài trên động vật. Vigila và cộng sự (2008) sử dụng CY liều 20 mg/kg trong 10 ngày liên tục để gây suy giảm miễn dịch trên chuột nhắt trắng, kết quả cho thấy có sự suy giảm tỷ lệ lympho bào T và B trong máu ngoại vi [41]. Chen và cộng sự (2012) sử dụng CY liều 80 mg/kg trong 3 ngày liên tục để gây suy giảm miễn dịch trên chuột nhắt trắng, đánh giá sau 10 ngày, kết quả cho thấy sự giảm trọng lượng tương đối lách, làm giảm IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  [42]. Kyakulaga và cộng sự (2013) sử dụng CY liều 10 mg/kg đường uống trong 30 ngày để gây suy giảm miễn dịch kéo dài trên chuột cống trắng [43].

Một phương pháp khác để gây suy giảm miễn dịch cũng được áp dụng là tia xạ. Tia xạ tác động lên các bộ phận của cơ thể thông qua năng lượng bức xạ, dẫn tới biến đổi các cấu trúc sinh học, phân hủy tạo ra các gốc tự do trong mô và tế bào. Các gốc tự do sinh ra có thể tạo ra các gốc tự do thứ cấp và tiếp tục tấn công các tổ chức, gây chết tế bào. Tác dụng của tia xạ tác động lên hầu hết các cơ quan trong cơ thể, tuy nhiên máu và cơ quan tạo máu là tổ chức đầu tiên bị ảnh hưởng bởi tia xạ, gây ra tình trạng suy giảm miễn dịch [6].

Tia  $\gamma$  (gamma) là tia bức xạ có khả năng đâm xuyên lớn nhất, do vậy thường được sử dụng trong các mô hình suy giảm miễn dịch. Có thể sử dụng tia  $\gamma$  để gây suy giảm miễn dịch chọn lọc trên hệ lympho hoặc không chọn lọc bằng đường chiếu toàn thân. Phạm Thị Vân Anh (2011) sử dụng thành công tia  $\gamma$  liều 1Gy trong 6 ngày liên tục (tổng liều là 6Gy) trên chuột nhắt trắng để gây suy giảm miễn dịch [7].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng phương pháp tiêm CY liều duy nhất 200 mg/kg, do sự phù hợp về đặc điểm bệnh học, và đã được nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng như Việt Nam áp dụng đạt tỷ lệ thành công cao.

## CHƯƠNG 2: CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Chất liệu nghiên cứu

#### 2.1.1. Thuốc nghiên cứu

- Mẫu nghiên cứu: TD0070
- Dạng bào chế: Viên nang cứng, đạt tiêu chuẩn cơ sở.

**Bảng 2.1 Thành phần viên nang cứng TD0070**

Thành phần		Hàm lượng	Tiêu chuẩn
<b>Bột mịn cao hỗn hợp dược liệu, gồm :</b>		800 mg	
1	Sài hồ ( <i>Radix Bupleuri chinensis</i> )	160 mg	DĐVN V
2	Tiền hồ ( <i>Radix Peucedani</i> )	160 mg	DĐVN V
3	Xuyên khung ( <i>Rhizoma Ligustici wallichii</i> )	160 mg	DĐVN V
4	Chỉ xác ( <i>Fructus Aurantii</i> )	160 mg	DĐVN V
5	Khuông hoạt ( <i>Rhizoma et Radix Notopterygii</i> )	160 mg	DĐVN V
6	Độc hoạt ( <i>Radix Angelicae pubescentis</i> )	160 mg	DĐVN V
7	Phục linh ( <i>Poria</i> )	160 mg	DĐVN V
8	Cát cánh ( <i>Radix Platycodi grandiflori</i> )	160 mg	DĐVN V
9	Đảng sâm ( <i>Radix Codonopsis pilosulae</i> )	160 mg	DĐVN V
10	Cam thảo ( <i>Radix Glycyrrhizae</i> )	160 mg	DĐVN V
11	Sinh Khương ( <i>Rhizoma Zingiberis</i> )	80 mg	DĐVN V
12	Bạc Hà ( <i>Herba Menthae</i> )	80 mg	DĐVN V
13	Quế chi ( <i>Ramulus Cinnamomi</i> )	480 mg	DĐVN V
14	Đại diệp đẳng ( <i>Tinomiscium tonkinense</i> )	480 mg	TCCS
15	Cách lông vàng ( <i>Caulis Premnae</i> )	480 mg	

<b>Tá dược</b>			
1	Talc	4 mg	TCCS
2	Magnesi stearat	5 mg	
3	Calci carbonat	4 mg	

Viên nang cứng TD0070 hàm lượng 800mg (tương đương 3,2g cao khô dược liệu). Liều dùng dự kiến trên lâm sàng ở người: Liều dùng dự kiến trên lâm sàng là 7,2g/ngày tương ứng 9 viên/người/ngày. Theo quy ước tính liều lấy cân nặng của người trưởng thành là 50kg, liều dùng trên lâm sàng là 7,2g/50kg/ngày, tương ứng với 0,144g/kg/ngày. Quy đổi ra liều tương đương trên chuột nhắt trắng với hệ số ngoại suy 12 (theo phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm của Đỗ Trung Đàm) [44] thì liều dự kiến có tác dụng trên chuột là  $0,144 \times 12 = 1,728\text{g/kg/ngày}$  và liều cao gấp 2 lần là  $3,456\text{ g/kg/ngày}$ .

### **2.1.2. Dụng cụ, hoá chất và máy móc nghiên cứu**

- Cyclophosphamid: dạng bột, biệt dược Endoxan lọ 200 mg của hãng Baxter, Đức.

- Levamisol dạng bột, biệt dược Tetramisole hydrochloride lọ 5 g của hãng Sigma, Mỹ. Thuốc được dùng làm đối chứng dương trong nghiên cứu miễn dịch.

- Nhũ dịch OA (Ovalbumin +  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ): dùng làm kháng nguyên gây miễn cảm cho chuột.

- Hồng cầu cừu (HCC): máu tĩnh mạch cừu được lấy trong điều kiện vô trùng, bảo quản trong dung dịch alsever (glucose 24,6g, natricitrat 9,6g, natriclorid 5,05g, nước cất vừa đủ 1200 ml, pH 6,1), ở nhiệt độ  $4^{\circ}\text{C}$ , sử dụng trong thời hạn 2 tuần. Sản phẩm của công ty Dược phẩm Nam Khoa.

- Hoá chất và máy huyết học tự động Exigo - VET của hãng Exigo, Thụy Điển.

- Kit định lượng IL-2, TNF- $\alpha$ , IgG, IFN- $\alpha$  và IFN- $\gamma$  của Hãng Cloud-Clone Corp, Mỹ.

## **2.2. Đối tượng nghiên cứu**

- Chuột nhắt trắng chủng *Swiss*, thuần chủng, cả hai giống, nặng  $20 \pm 2$  gam do Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp.

- Động vật được nuôi trong điều kiện đầy đủ thức ăn chuyên dụng và nước uống tại phòng thí nghiệm Bộ môn Dược lý, Đại học Y Hà Nội từ 7 -10 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu.

## **2.3. Phương pháp nghiên cứu**

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm, có đối chiếu với nhóm chứng.

### **2.3.1. Nghiên cứu độc tính cấp của TD0070 trên chuột nhắt trắng**

#### **Nghiên cứu độc tính cấp**

Nghiên cứu độc tính cấp và xác định LD<sub>50</sub> của viên nang cứng TD0070 trên chuột nhắt trắng theo phương pháp Litchfield- Wilcoxon. [44], [45], [46]

Trước khi tiến hành thí nghiệm, cho chuột nhịn ăn qua đêm.

Chuột nhắt trắng được chia thành các lô khác nhau, mỗi lô 10 con. Cho chuột uống TD0070 với liều tăng dần trong cùng một thể tích để xác định liều thấp nhất gây chết 100% chuột và liều cao nhất không gây chết chuột (gây chết 0% chuột). Theo dõi tình trạng chung của chuột, quá trình diễn biến bắt đầu có dấu hiệu nhiễm độc (như nôn, co giật, kích động, bài tiết...) và số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc. Tất cả chuột chết được mổ để đánh giá tổn thương đại thể. Từ đó xây dựng đồ thị để xác định LD<sub>50</sub> của thuốc thử. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống TD0070.

Chuẩn bị mẫu làm nghiên cứu:

Lấy 30 viên, nghiền trong cối sứ, thêm 20 ml nước cất thu được 60 ml vừa đủ. Đây là dung dịch đậm đặc có thể cho chuột nhắt trắng uống bằng kim chuyên dụng. Dung dịch đậm đặc này dùng để nghiên cứu độc tính cấp và xác định LD<sub>50</sub> của Viên nang TD0070.

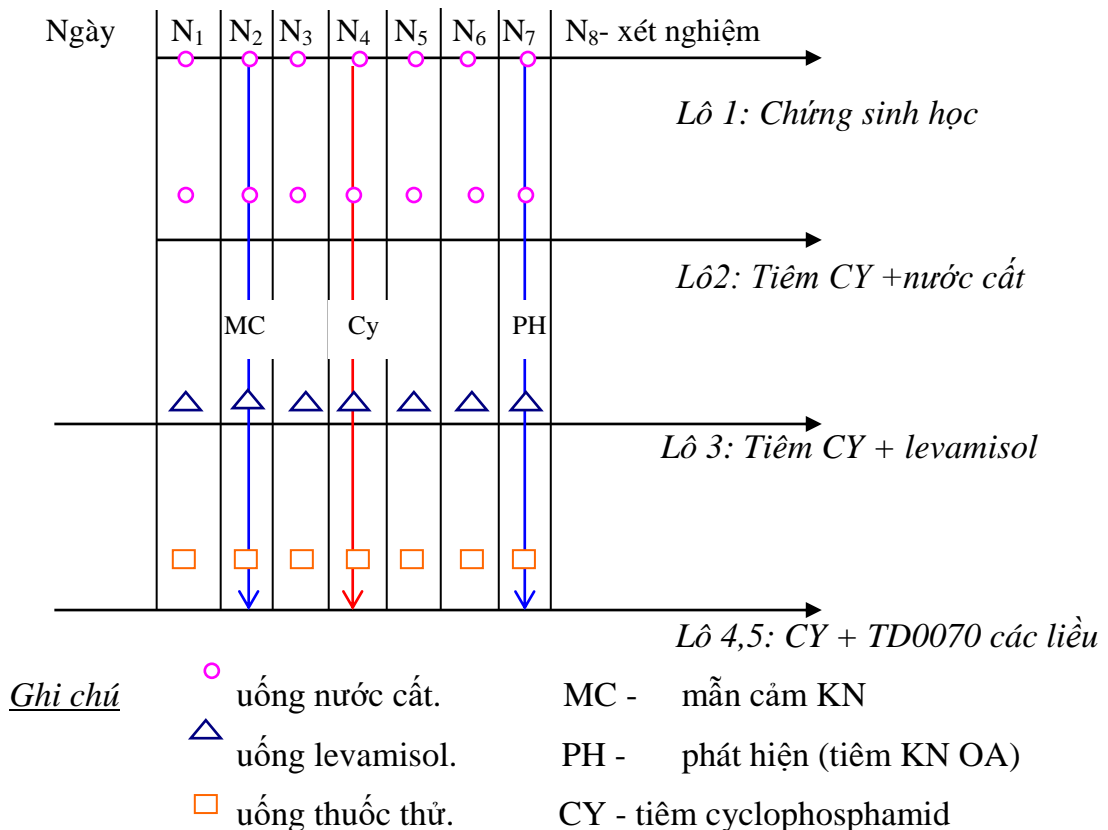
### 2.3.2. Đánh giá tác dụng điều biến miễn dịch của viên nang cứng TD0070

Tiêm màng bụng cyclophosphamid (CY), liều duy nhất 200 mg/kg thể trọng để gây suy giảm miễn dịch [48]

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 5 lô nghiên cứu:

- Lô 1 (n=10) Chứng sinh học: uống nước cất.
- Lô 2 (n=10) Mô hình: Chuột được tiêm CY + uống nước cất.
- Lô 3 (n=10) Chứng dương: Chuột được tiêm CY + uống levamisol liều 10 mg/kg
- Lô 4 (n=10) TD0070 liều 1,728g/kg/ngày: Chuột được tiêm CY + uống TD0070 liều 1,728g/kg/ngày (tương đương với liều điều trị dự kiến trên người là 9 viên/ngày, hệ số quy đổi trên chuột nhắt là 12).
- Lô 5 (n=10) TD0070 liều 3,456 g/kg/ngày: Chuột được tiêm CY + uống TD0070 liều 3,456 g/kg/ngày (gấp 2 lần liều tương đương với liều điều trị dự kiến trên người).

#### Sơ đồ 2.3.1 Nghiên cứu trên mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng CY



Mô hình nghiên cứu được tiến hành trong 8 ngày. Chuột bắt đầu được uống nước cất và các thuốc liên tục từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7 của nghiên cứu. Trong thời gian uống thuốc:

- Ngày thứ 2: chuột ở tất cả các lô được gây mẫn cảm bằng tiêm màng bụng hồng cầu cừu 5% (0,5 mL/chuột) và tiêm dưới da gáy kháng nguyên OA ( $\text{Al}(\text{OH})_3$  + ovalbumin) (0,1 mL/chuột).
- Ngày thứ 4: tiêm màng bụng CY liều 200 mg/kg cho các lô 2 đến lô 5.
- Ngày thứ 7: tiêm phát hiện bằng 50  $\mu\text{l}$  kháng nguyên OA vào một bên gan bàn chân chuột, bên còn lại tiêm thể tích tương tự dung dịch NaCl 0,9%.

Sau 24 giờ tiêm phát hiện vào gan bàn chân chuột, tiến hành xác định các chỉ số nghiên cứu bao gồm:

» **Các chỉ số chung**

- Trọng lượng lách, tuyến ức tương đối: được tính là trọng lượng lách, tuyến ức tương ứng với thể trọng chuột.

$$\text{Trọng lượng lách hoặc tuyến ức tương đối (\%)} = \frac{\text{Trọng lượng lách hoặc tuyến ức (mg)}}{\text{Thể trọng chuột (g)}}$$

Chuột được giết bằng cách kéo đứt đốt sống cổ, mổ bụng để bộc lộ lách, tuyến ức. Bóc tách lấy toàn bộ lách và tuyến ức và ngâm ngay vào dung dịch nuôi tế bào. Lọc sạch các tổ chức xung quanh, dùng gạc thấm khô rồi đem cân. Ghi lại trọng lượng lách, tuyến ức của từng chuột. Trọng lượng lách, tuyến ức tương đối bằng tỷ lệ trọng lượng các cơ quan này so với trọng lượng của từng chuột tương ứng.

- Số lượng bạch cầu chung, bạch cầu hạt trung tính, bạch cầu lympho, bạch cầu mono ở máu ngoại vi.

- Làm giải phẫu vi thể lách và tuyến ức của 30% số chuột mỗi lô.

» **Các thông số đánh giá miễn dịch dịch thể và qua trung gian tế bào**

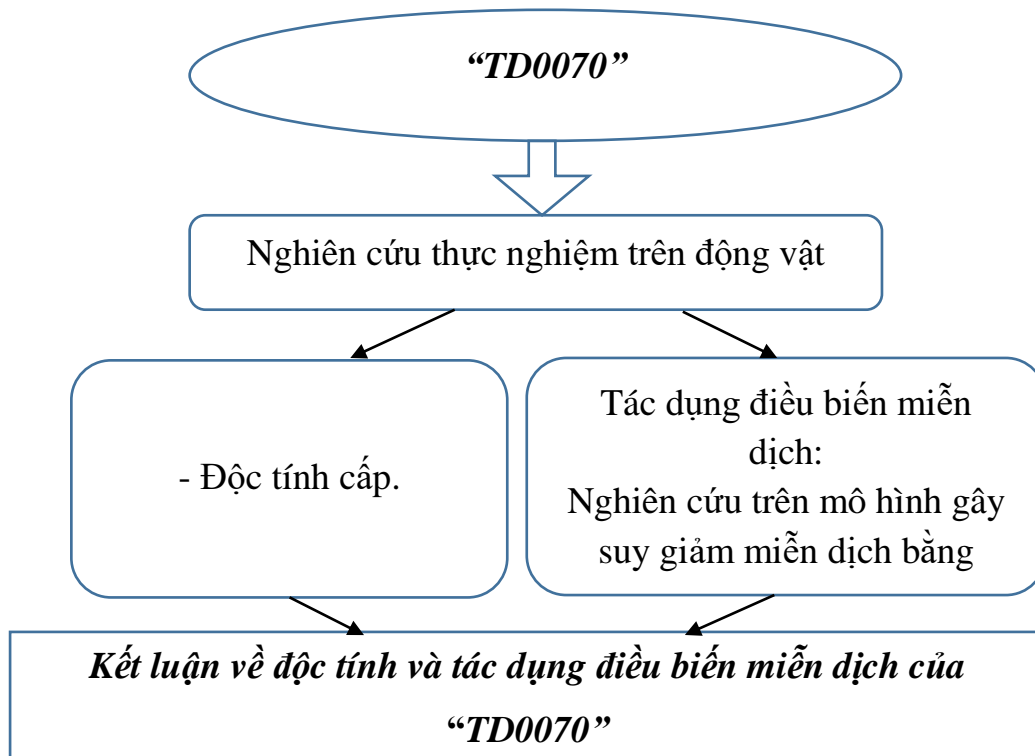
- Đánh giá miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua phản ứng quá mẫn chậm ở gan bàn chân chuột với kháng nguyên OA. Trước khi đo kết quả phản ứng quá mẫn chậm với kháng nguyên OA, tiêm 50  $\mu$ l kháng nguyên OA (liều phát hiện) vào một bên gan bàn chân chuột, bên còn lại tiêm thể tích tương tự NaCl 0,9%. Sau 24 giờ tiêm kháng nguyên phát hiện, đo bề dày hai gan bàn chân chuột bằng thước palmer. Phản ứng bì được tính bằng hiệu số chênh lệch bề dày gan bàn chân chuột 2 bên sau khi tiêm phát hiện.

Định lượng IL-2, TNF- $\alpha$ , IgG, IFN- $\alpha$  và IFN- $\gamma$  ở máu ngoại vi bằng phương pháp ELISA.

#### 2.4. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.

- Địa điểm: Bộ môn Dược lý, Đại học Y Hà Nội
- Thời gian: Tháng 5 năm 2023 đến tháng 10 năm 2023

#### 2.5. Sơ đồ nghiên cứu.



**Sơ đồ 2.1** Mô hình nghiên cứu độc tính và tác dụng điều biến miễn dịch trên mô hình thực nghiệm của viên nang cứng TD0070.



## 2.6. Biến số, chỉ số trong nghiên cứu

- Trọng lượng lách tương đối.
- Trọng lượng ức tương đối.
- Vi thể lách và tuyến ức
- Số lượng bạch cầu
- Phản ứng bì với kháng nguyên OA.
- Nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi.
- Nồng độ TNF- $\alpha$  trong máu ngoại vi.
- Nồng độ IFN- $\alpha$  trong máu ngoại vi.
- Nồng độ IFN-  $\gamma$  trong máu ngoại vi.
- Nồng độ IgG trong máu ngoại vi.

## 2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được biểu diễn dưới dạng  $\bar{X} \pm SD$ , xử lý thống kê theo thuật toán thống kê T-test Student bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

- Khác biệt so với lô chứng sinh học: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$
- Khác biệt so với lô mô hình:  $\Delta$   $p < 0,05$ ;  $\Delta\Delta$   $p < 0,01$ ;  $\Delta\Delta\Delta$   $p < 0,001$

## 2.8. Sai số và biện pháp khống chế sai số

- Các phương pháp được xây dựng qui trình chuẩn SOP để hạn chế tối đa các sai số có thể xảy ra trong quá trình xét nghiệm.
- Động vật khỏe mạnh, cả 2 giống, được chia ngẫu nhiên vào các lô.
- Quy trình thực hiện các bước thí nghiệm giữa các lô chuột là thống nhất cùng theo SOP.
- Nhật ký nghiên cứu đầy đủ, lưu trữ số liệu, thông tin bằng sổ ghi chép, chụp ảnh.
- Xử lý số liệu bằng phần mềm chuyên dụng trên máy tính.

## **2.9. Đạo đức trong nghiên cứu**

Nghiên cứu được thực hiện trên chuột cống trắng, số lượng động vật sử dụng trong các mô hình thí nghiệm được hạn chế ở mức tối thiểu, đủ để thu được kết quả đảm bảo độ tin cậy và đủ xử lý thống kê.

Những chuột chết trong quá trình làm thí nghiệm (nếu có) và số chuột sau khi thí nghiệm hoàn thành đều được xử lý theo đúng quy định rác thải y tế.

Việc lựa chọn động vật thí nghiệm, điều kiện nuôi, chăm sóc và sử dụng động vật đều tuân thủ chặt chẽ theo “Hướng dẫn nội dung cơ bản thẩm định kết quả nghiên cứu tiền lâm sàng thuốc tân dược, thuốc cổ truyền, vắc xin và sinh phẩm y tế” của Bộ y tế.

### CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của viên nang cứng TD0070 trên chuột nhắt trắng.

Chuột nhắt trắng được uống TD0070 từ liều thấp nhất đến liều cao nhất. Lô chuột đã uống đến liều 0,25 ml/10 g, 3 lần trong 24 giờ dung dịch đậm đặc, theo dõi thấy không có biểu hiện gì, không xuất hiện triệu chứng bất thường nào trong 72 giờ sau uống thuốc thử. Kết quả được trình bày ở bảng 3.1.

**Bảng 3.1 Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của TD0070**

Lô chuột	n	Liều (ml/kg)	Liều (Viên/kg)	Tỷ lệ chết (%)	Tình trạng chuột trong thời gian 7 ngày sau uống thuốc
Lô 1	10	30	15,0	0	Các chuột hoạt động, vận động bình thường, đi ngoài phân bình thường, không có chuột nào chết cũng như có biểu hiện độc tính
Lô 2	10	45	22,5	0	
Lô 3	10	60	30,0	0	
Lô 4	10	75	37,5	0	

#### **Nhận xét:**

Kết quả bảng 3.1 cho thấy: các lô chuột uống Viên nang TD0070 liều từ 30 ml/kg tương đương 15,0 viên/kg đến liều tối đa 75 ml/kg tương đương 37,5 viên/kg không có biểu hiện độc tính cấp.

Từ bảng 3.1 tính được liều dung nạp tối đa (Luôn nhỏ hơn liều chết 50%) của Viên nang TD0070 là: 37,5 viên/kg.

### 3.2. Kết quả về tác dụng của viên nang cứng TD0070 trên các chỉ số miễn dịch chung:

#### » Trọng lượng lách tương đối

**Bảng 3.2 Ảnh hưởng của TD0070 lên trọng lượng lách tương đối**

Lô	n	Trọng lượng lách tương đối (‰)
Lô 1: Chứng sinh học	10	6,21 ± 1,09
Lô 2: Mô hình CY	10	2,86 ± 0,65***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	4,38 ± 1,84* <sup>Δ</sup>
Lô 4: TD0070 liều 1,728 g/kg	10	3,09 ± 0,92***
Lô 5: TD0070 liều 3,456 g/kg	10	3,46 ± 1,12***

*Chú thích:*

\*, \*\*, \*\*\*: Khác biệt so với Chứng sinh học với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$

<sup>Δ</sup>, <sup>ΔΔ</sup>, <sup>ΔΔΔ</sup>: Khác biệt so với Mô hình với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$

#### **Nhận xét:**

Kết quả trình bày ở bảng 3.2 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Trọng lượng lách tương đối giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ( $p < 0,001$ ).
- Lô uống levamisol (lô 3): Trọng lượng lách tương đối tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ .
- Lô uống TD0070 liều 1,728g/kg và liều 3,456 g/kg: Trọng lượng lách tương đối có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

» **Trọng lượng tuyến ức tương đối****Bảng 3.3 Ảnh hưởng của TD0070 lên trọng lượng tuyến ức tương đối**

Lô	n	Trọng lượng ức tương đối (%)
Lô 1: Chứng sinh học	10	3,82 ± 0,81
Lô 2: Mô hình CY	10	1,46 ± 0,42***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	1,42 ± 0,69***
Lô 4: TD0070 liều 1,728 g/kg	10	1,53 ± 0,49***
Lô 5: TD0070 liều 3,456 g/kg	10	1,69 ± 0,44***

*Chú thích:*

\*, \*\*, \*\*\*: Khác biệt so với Chứng sinh học với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$

$\Delta$ ,  $\Delta\Delta$ ,  $\Delta\Delta\Delta$ : Khác biệt so với Mô hình với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$

**Nhận xét:**

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Trọng lượng tuyến ức tương đối giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ( $p < 0,01$ ).
- Lô uống levamisol (lô 3): Trọng lượng tuyến ức tương đối không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ( $p > 0,05$ ).
- Lô uống TD0070 liều 1,728g/kg và liều 3,456 g/kg: Trọng lượng tuyến ức tương đối có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

## » Giải phẫu vi thể lách và tuyến ức

**Bảng 3.4 Kết quả giải phẫu vi thể lách và tuyến ức**

<b>Lô nghiên cứu</b>	<b>Lách</b>	<b>Tuyến ức</b>
Lô 1 Chứng sinh học	3/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh lách bình thường.	3/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh tuyến ức bình thường.
Lô 2 Mô hình	2/3 mẫu bệnh phẩm giảm nặng số lượng lympho bào của tủy trắng, 1/3 mẫu bệnh phẩm giảm nhẹ số lượng lympho bào của tủy trắng.	3/3 mẫu bệnh phẩm giảm nặng số lượng lympho bào.
Lô 3 Levamisol	3/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ số lượng lympho bào của tủy trắng so với mô hình.	1/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ số lượng lympho bào so với mô hình. 2/3 mẫu bệnh phẩm có số lượng lympho bào không tăng, gần như mô hình.
Lô 4: TD0070 liều 1,728g/kg	1/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhiều số lượng lympho bào của tủy trắng. 2/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ số lượng lympho bào của tủy trắng	3/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ số lượng lympho bào.
Lô 5: TD0070 liều 3,456 g/kg	2/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhiều số lượng lympho bào của tủy trắng. 1/3 mẫu bệnh phẩm tăng vừa số lượng lympho bào của tủy trắng.	1/3 mẫu bệnh phẩm tăng vừa số lượng lympho bào ở vùng tủy so với mô hình. 2/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ số lượng lympho bào ở vùng tủy so với mô hình.

**Hình ảnh giải phẫu vi thể tuyến lách và tuyến ức được thể hiện trong Phụ lục 3**

**Nhận xét:**

Kết luận về giải phẫu bệnh: CY gây tổn thương rõ rệt cơ quan lympho trung ương là tuyến ức và lách. Levamisol có tác dụng cải thiện rõ rệt tổn thương gây ra do CY so với lô mô hình. TD0070 cả 2 liều đều giúp cải thiện tổn thương của lách và tuyến ức gây ra do CY so với lô mô hình.

**» Số lượng bạch cầu****Bảng 3.5 Ảnh hưởng của TD0070 lên số lượng bạch cầu**

Lô	n	Số lượng bạch cầu (G/l)
Lô 1: Chứng sinh học	10	5,89 ± 1,84
Lô 2: Mô hình CY	10	1,03 ± 0,55***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	0,96 ± 0,39***
Lô 4: TD0070 liều 1,728 g/kg	10	1,28 ± 0,48***
Lô 5: TD0070 liều 3,456 g/kg	10	1,38 ± 0,80***

*Chú thích:*

\*, \*\*, \*\*\*: Khác biệt so với Chứng sinh học với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$

$\Delta$ ,  $\Delta\Delta$ ,  $\Delta\Delta\Delta$ : Khác biệt so với Mô hình với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$

**Nhận xét:**

Kết quả trình bày ở bảng 3.5 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Số lượng bạch cầu giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ( $p < 0,001$ ).
- Lô uống levamisol (lô 3): Số lượng bạch cầu không khác biệt so với lô mô hình ( $p > 0,05$ ).
- Lô uống TD0070 liều 1,728g/kg và liều 3,456 g/kg: Số lượng bạch cầu có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

## » Công thức bạch cầu

**Bảng 3.6 Ảnh hưởng của TD0070 lên công thức bạch cầu ở máu ngoại vi**

Lô	Công thức bạch cầu (G/l)		
	BC lympho (G/l)	BCTT (G/l)	BC mono (G/l)
Lô 1: Chứng sinh học	3,73 ± 1,40	0,97 ± 0,46	1,19 ± 0,37
Lô 2: Mô hình CY	0,78 ± 0,46***	0,21 ± 0,07***	0,04 ± 0,05***
Lô 3: Chứng dương levamisol	0,66 ± 0,35***	0,24 ± 0,08***	0,06 ± 0,07***
Lô 4: TD0070 liều 1,728 g/kg	0,78 ± 0,36***	0,35 ± 0,16*** <sup>Δ</sup>	0,15 ± 0,16***
Lô 5: TD0070 liều 3,456 g/kg	0,68 ± 0,30***	0,43 ± 0,36**	0,27 ± 0,28*** <sup>Δ</sup>

*Chú thích:*

\*, \*\*, \*\*\*: Khác biệt so với Chứng sinh học với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$

<sup>Δ</sup>, <sup>ΔΔ</sup>, <sup>ΔΔΔ</sup>: Khác biệt so với Mô hình với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$

**Nhận xét:**

Kết quả ở bảng 3.6 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Số lượng bạch cầu lympho, bạch cầu trung tính và bạch cầu mono giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với  $p < 0,001$ .
- Lô uống levamisol (lô 3): Số lượng bạch cầu trung tính và bạch cầu mono có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Số lượng bạch cầu lympho giảm so với lô mô hình.
- Lô uống TD0070 liều 1,728g/kg: Số lượng bạch cầu trung tính tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Số lượng bạch cầu mono có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Số lượng bạch cầu lympho không khác biệt so với lô mô hình.
- Lô uống TD0070 liều 3,456 g/kg: Số lượng bạch cầu mono tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Số lượng bạch cầu trung



tính có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Số lượng bạch cầu lympho không khác biệt so với lô mô hình.

### 3.3. Kết quả về tác dụng của viên nang cứng TD0070 trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu:

#### 3.3.1. Kết quả đánh giá miễn dịch tế bào.

» *Phản ứng bì với kháng nguyên OA*

**Bảng 3.7 Ảnh hưởng của TD0070 đến phản ứng bì với kháng nguyên OA**

Lô	n	Phản ứng bì (% tăng chiều dày bàn chân chuột)
Lô 1: Chứng sinh học	10	100,09 ± 40,27
Lô 2: Mô hình CY	10	60,04 ± 24,00*
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	101,83 ± 39,40 <sup>Δ</sup>
Lô 4: TD0070 liều 1,728 g/kg	10	80,29 ± 31,32
Lô 5: TD0070 liều 3,456 g/kg	10	85,36 ± 34,39

*Chú thích:*

\*, \*\*, \*\*\*: Khác biệt so với Chứng sinh học với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$

<sup>Δ</sup>, <sup>ΔΔ</sup>, <sup>ΔΔΔ</sup>: Khác biệt so với Mô hình với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$

#### Nhận xét:

Kết quả trình bày ở bảng 63.7 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Phản ứng bì giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học với  $p < 0,05$ .
- Lô uống levamisol (lô 3): Phản ứng bì tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ .
- Các lô uống TD0070 liều 1,728g/kg (lô 4) và liều 3,456 g/kg (lô 5): Phản ứng bì có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Định lượng các cytokin trong máu

**Bảng 3.8 Ảnh hưởng của TD0070 lên nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi**

Lô	n	Nồng độ IL-2 (pg/mL)
Lô 1: Chứng sinh học	10	43,84 ± 26,00
Lô 2: Mô hình CY	10	4,16 ± 2,63***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	8,21 ± 3,70*** <sup>Δ</sup>
Lô 4: TD0070 liều 1,728 g/kg	10	7,97 ± 3,62*** <sup>Δ</sup>
Lô 5: TD0070 liều 3,456 g/kg	10	6,91 ± 3,42***

*Chú thích:*

\*, \*\*, \*\*\*: Khác biệt so với Chứng sinh học với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$

<sup>Δ</sup>, <sup>ΔΔ</sup>, <sup>ΔΔΔ</sup>: Khác biệt so với Mô hình với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$

**Nhận xét:**

Kết quả trình bày ở bảng 3.8 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với  $p < 0,001$ .
- Lô uống levamisol (lô 3): Nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ .
- Lô uống TD0070 liều 1,728g/kg: Nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ .
- Lô uống TD0070 liều 3,456 g/kg: Nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.9 Ảnh hưởng của TD0070 lên nồng độ TNF- $\alpha$  trong máu ngoại vi**

Lô	n	Nồng độ TNF- $\alpha$ (pg/mL)
Lô 1: Chứng sinh học	10	25,85 $\pm$ 8,85
Lô 2: Mô hình CY	10	10,80 $\pm$ 4,75***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	19,41 $\pm$ 3,03* $\Delta\Delta\Delta$
Lô 4: TD0070 liều 1,728 g/kg	10	15,28 $\pm$ 6,61*
Lô 5: TD0070 liều 3,456 g/kg	10	19,37 $\pm$ 6,05 $\Delta\Delta$

*Chú thích:*

\*, \*\*, \*\*\*: Khác biệt so với Chứng sinh học với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$

$\Delta$ ,  $\Delta\Delta$ ,  $\Delta\Delta\Delta$ : Khác biệt so với Mô hình với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$

**Nhận xét:**

Kết quả trình bày ở bảng 3.9 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Nồng độ TNF- $\alpha$  trong máu ngoại vi giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với  $p < 0,001$ .
- Lô uống levamisol (lô 3): Nồng độ TNF- $\alpha$  trong máu ngoại vi tăng rõ rệt so với lô mô hình với  $p < 0,001$ .
- Lô uống TD0070 liều 1,728g/kg: Nồng độ TNF- $\alpha$  trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).
- Các lô uống TD0070 liều 3,456 g/kg: Nồng độ TNF- $\alpha$  trong máu ngoại vi tăng rõ rệt so với lô mô hình với  $p < 0,01$ .

**Bảng 3.10 Ảnh hưởng của TD0070 lên nồng độ IFN- $\alpha$  trong máu ngoại vi**

Lô	n	Nồng độ IFN- $\alpha$ (pg/mL)
Lô 1: Chứng sinh học	10	33,65 $\pm$ 14,00
Lô 2: Mô hình CY	10	20,26 $\pm$ 9,29*
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	31,11 $\pm$ 13,18 $^{\Delta}$
Lô 4: TD0070 liều 1,728 g/kg	10	34,26 $\pm$ 15,76 $^{\Delta}$
Lô 5: TD0070 liều 3,456 g/kg	10	26,22 $\pm$ 9,36

*Chú thích:*

\*, \*\*, \*\*\*: Khác biệt so với Chứng sinh học với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$

$^{\Delta}$ ,  $^{\Delta\Delta}$ ,  $^{\Delta\Delta\Delta}$ : Khác biệt so với Mô hình với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$

**Nhận xét:**

Kết quả trình bày ở bảng 3.10 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Nồng độ IFN- $\alpha$  trong máu ngoại vi giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học với  $p < 0,05$ .
- Lô uống levamisol (lô 3): Nồng độ IFN- $\alpha$  trong máu ngoại vi tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ .
- Lô uống TD0070 liều 1,728g/kg: Nồng độ IFN- $\alpha$  trong máu ngoại vi tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ .
- Lô uống TD0070 liều 3,456 g/kg: Nồng độ IFN- $\alpha$  trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.11 Ảnh hưởng của TD0070 lên nồng độ IFN- $\gamma$  trong máu ngoại vi**

Lô	n	Nồng độ IFN- $\gamma$ (pg/mL)
Lô 1: Chứng sinh học	10	448,67 $\pm$ 199,61
Lô 2: Mô hình CY	10	366,52 $\pm$ 142,65
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	434,50 $\pm$ 196,66
Lô 4: TD0070 liều 1,728 g/kg	10	440,44 $\pm$ 161,89
Lô 5: TD0070 liều 3,456 g/kg	10	390,67 $\pm$ 165,45

*Chú thích:*

*\*, \*\*, \*\*\*: Khác biệt so với Chứng sinh học với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$*

*$\Delta$ ,  $\Delta\Delta$ ,  $\Delta\Delta\Delta$ : Khác biệt so với Mô hình với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$*

**Nhận xét:**

Kết quả trình bày ở bảng 3.11 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Nồng độ IFN- $\gamma$  trong máu ngoại vi có xu hướng giảm so với lô chứng sinh học, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).
- Lô uống levamisol (lô 3): Nồng độ IFN- $\gamma$  trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).
- Các lô uống TD0070 liều 1,728g/kg và 3,456 g/kg: Nồng độ IFN- $\gamma$  trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

### 3.3.2. Kết quả đánh giá miễn dịch dịch thể.

**Bảng 3.12 Ảnh hưởng của TD0070 lên nồng độ IgG trong máu ngoại vi**

Lô	n	Nồng độ IgG ( $\mu\text{g/mL}$ )
Lô 1: Chứng sinh học	10	70,01 $\pm$ 26,39
Lô 2: Mô hình CY	10	11,56 $\pm$ 4,43***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	27,38 $\pm$ 8,64*** $\Delta\Delta\Delta$
Lô 4: TD0070 liều 1,728 g/kg	10	24,29 $\pm$ 9,79*** $\Delta\Delta$
Lô 5: TD0070 liều 3,456 g/kg	10	44,00 $\pm$ 16,06 * $\Delta\Delta\Delta$

*Chú thích:*

\*, \*\*, \*\*\*: Khác biệt so với Chứng sinh học với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$

$\Delta$ ,  $\Delta\Delta$ ,  $\Delta\Delta\Delta$ : Khác biệt so với Mô hình với  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$

#### **Nhận xét:**

Kết quả trình bày ở bảng 3.12 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Nồng độ IgG trong máu ngoại vi giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với  $p < 0,001$ .
- Lô uống levamisol (lô 3): Nồng độ IgG trong máu ngoại vi tăng rõ rệt so với lô mô hình với  $p < 0,001$ .
- Các lô uống TD0070 liều 1,728g/kg và liều 3,456 g/kg: Nồng độ IgG trong máu ngoại vi tăng rõ rệt so với lô mô hình với lần lượt  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$ .

## CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

### 4.1. Bàn luận về độc tính cấp của viên nang cứng TD0070.

Theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới, tất cả các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu đều phải đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn trên động vật thực nghiệm trước khi đưa vào thử nghiệm trên người [47]

TD0070 là dạng viên nang cứng thay đổi so với các dạng thuốc sắc truyền thống thông thường của Y học cổ truyền. Đây là một bài thuốc gồm 15 vị, khi kết hợp các vị thuốc và thay đổi dạng bào chế mới, nghiên cứu tính an toàn trong đó gồm nghiên cứu độc tính cấp trên thực nghiệm là cần thiết và bắt buộc.

Độc tính cấp là độc tính xảy ra sau khi dùng thuốc một lần hoặc vài ba lần trong ngày. Nghiên cứu độc tính cấp của TD0070 được tiến hành bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon [46].

Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của thuốc cho thấy chuột nhắt trắng đã uống viên nang TD0070 liều từ 30 ml/kg tương đương 15,0 viên/kg đến liều tối đa 75 ml/kg tương đương 37,5 viên/kg không có biểu hiện độc tính cấp, không có chuột chết. Đồng thời, tính được liều dung nạp tối đa (Luôn nhỏ hơn liều chết 50%) của Viên nang TD0070 là: 37,5 viên/kg. Như vậy, chuột nhắt trắng đã được uống đến liều gấp 17,36 lần liều dùng dự kiến trên người nhưng không có biểu hiện độc tính cấp.

Trong nghiên cứu này chưa xác định được LD<sub>50</sub> của viên nang cứng TD0070 theo đường uống trên chuột nhắt trắng và không thấy xuất hiện triệu chứng bất thường nào trong 72 giờ sau uống thuốc lần đầu và trong suốt 7 ngày sau uống thuốc. Điều này chứng tỏ thuốc có tính an toàn cao khi sử dụng. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp vì TD0070 chứa bài thuốc cổ phương “Nhân sâm bại độc tán” có tính ổn định và an toàn cao và các vị thuốc trong

bài thuốc này đều có nguồn gốc từ thảo mộc và đã được nhân dân ta cũng như một số nước khác sử dụng từ lâu đời để làm thuốc uống và không thấy gây độc đối với người sử dụng hoặc do tương tác giữa các vị thuốc trong bài đã làm giảm độc tính của mỗi vị. Tuy vậy, cần làm thêm nghiên cứu sâu hơn về độc tính của bài thuốc, cũng như các vị thuốc có trong bài.

## **4.2. Bàn luận về tác dụng điều biến miễn dịch của viên nang cứng TD0070.**

### **4.2.1 Tác dụng của viên nang cứng TD0070 trên các chỉ số miễn dịch chung.**

#### *4.2.1.1. Mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid*

Đa số các chất kích thích miễn dịch thể hiện rõ tác dụng trên hệ thống miễn dịch bị tổn thương hơn là hệ miễn dịch bình thường. Vì vậy, để nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của một chất, người ta thường tiến hành nghiên cứu trên hệ miễn dịch đã bị suy yếu.

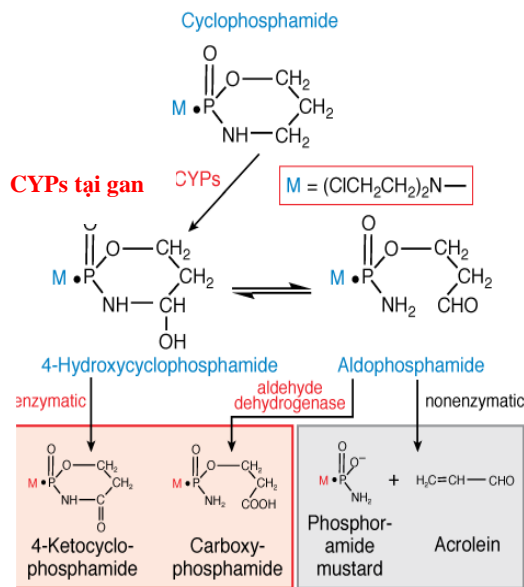
Hoạt động của hệ miễn dịch chống lại tác nhân gây bệnh bao gồm vai trò của 2 hàng rào: đáp ứng miễn dịch tự nhiên và miễn dịch đặc hiệu (miễn dịch dịch thể và miễn dịch qua trung gian tế bào). Sự suy giảm miễn dịch xảy ra khi 2 hàng rào bảo vệ này bị tổn thương [49],[50].

Cho đến nay, để gây suy giảm miễn dịch trên thực nghiệm, các nhà khoa học đã sử dụng nhiều tác nhân và phương pháp khác nhau tùy vào mục đích nghiên cứu như dùng hóa chất, tác nhân vật lý, vi sinh vật, mô ung thư hay động vật biến đổi gen. Trong đó, mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng hóa chất (cyclophosphamid) là một trong những mô hình được sử dụng phổ biến nhất trên thế giới cũng như ở Việt Nam.

Cyclophosphamid (CY) là một tác nhân alkyl hóa kìm tế bào. Bản thân CY không có hoạt tính, tuy nhiên, trong gan (và trong các mô khác), nhờ enzym CYP2B, CY bị biến đổi sinh học thành các sản phẩm chuyển hóa có hoạt tính alkyl hóa như phospho-amid mustard, acrolein. Các chất này phản

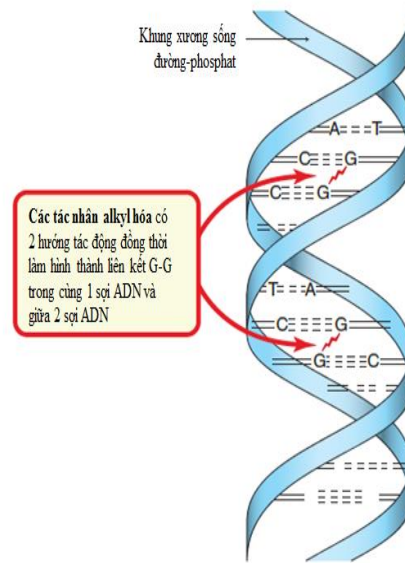


ứng và liên kết đồng hóa trị với những gốc guanin (G) trên ADN hình thành liên kết G-G trên cùng sợi ADN và liên kết G-G giữa hai dải ADN, ngăn chặn sự sao chép và phiên mã ADN. CY ức chế sự phân chia của tất cả các tế bào đang tăng sinh (đặc biệt là các tế bào của tủy xương), do đó, trên miễn dịch, CY gây suy giảm cả đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch qua trung gian tế bào (hình 4.1 và 4.2) [51], [52], [53].



**Chất chuyển hóa không có hoạt tính**      **Chất chuyển hóa gây độc**

**Hình 4.1. Chuyển hóa của cyclophosphamid**



G: guanin, A: adenin, C: cytosin, T: thymin.

**Hình 4.2. Ảnh hưởng của các tác nhân alkyl hóa lên ADN**

Vì những lý do trên, chúng tôi sử dụng CY làm chất gây suy giảm miễn dịch trên chuột nhắt trắng.

Theo Hussain A (2013), LD<sub>50</sub> của CY khi tiêm màng bụng chuột nhắt trắng là 360 mg/kg và sau khi tiêm, CY được chuyển hóa và thải trừ nhanh trong vòng 20 – 30 phút [54]. Trên thế giới, nhiều nghiên cứu dùng liều nhỏ CY và lặp lại trong nhiều ngày như tiêm màng bụng CY liều 80 mg/kg liên tục trong 5 ngày hay CY liều 70 mg/kg trong 3 ngày liên tiếp để gây suy giảm miễn dịch [55], [56]. Tại Việt Nam, Phan Thị Phi Phi và cộng sự đã tiến hành

tiêm CY cho chuột nhắt trắng với các mức liều khác nhau (từ liều thấp đến liều cao), từ dùng cách quãng đến dùng một lần duy nhất. Kết quả nghiên cứu cho thấy liệu trình tiêm màng bụng CY với liều 200 mg/kg một lần duy nhất và xét nghiệm sau 5 ngày là phù hợp nhất. Nếu dùng liều thấp cách quãng, các tổn thương không rõ, khó đánh giá mức độ hồi phục, còn dùng liều cao, súc vật sẽ chết sau vài giờ do tổn thương nặng các cơ quan [35]. Ngoài ra, liều CY 200 mg/kg tiêm màng bụng cũng được các tác giả trong nước sử dụng để xây dựng mô hình suy giảm miễn dịch [57], [58], [59]. Trên lâm sàng, CY gây ra ức chế tủy xương cấp tính, số lượng các tế bào máu ngoại vi giảm mạnh nhất từ 6 – 10 ngày và hồi phục trong 14 – 21 ngày [51]. Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành các nghiên cứu thăm dò về liều CY và xác định thời điểm phù hợp nhất để tiến hành xét nghiệm đánh giá tác dụng của thuốc thử là 4 ngày sau tiêm CY.

Như vậy, mô hình gây tổn thương hệ miễn dịch bằng tiêm màng bụng CY liều 200 mg/kg một mũi duy nhất và tiến hành xét nghiệm sau 4 ngày tiêm CY là phù hợp nhất và đã được áp dụng trong nghiên cứu này.

#### *4.2.1.2. Lựa chọn chứng dương*

Levamisol là thuốc kích thích miễn dịch tác động trên cả miễn dịch dịch thể và miễn dịch qua trung gian tế bào, trong đó đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào là mục tiêu chủ yếu của levamisol [3].

Levamisol làm tăng cường chức năng của các tế bào lympho Th1 trong phản ứng quá mẫn chậm, làm tăng tiết IL-2, IL-12 và IFN- $\gamma$  [60], [61]. Theo kết quả nghiên cứu của L-Y Chen và cộng sự (2007), levamisol có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch thông qua hoạt hóa tế bào đuôi gai (một trong những tế bào trình diện kháng nguyên hoạt động mạnh nhất), kích thích sự phát triển của tế bào Th1 và tăng sản xuất IL-10 và IL-12 [62]. Ngoài ra, liều levamisol là 100 mg/kg được nhiều tác giả nghiên cứu và chứng minh hiệu quả kích thích miễn dịch rõ rệt [57], [58].

Do vậy, levamisol liều 100 mg/kg được sử dụng làm chứng chuẩn (chứng dương) để so sánh hiệu quả với thuốc thử trên mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng CY.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, levamisol liều 100 mg/kg có tác dụng cải thiện các chỉ số miễn dịch chung, tăng cường đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào so với lô mô hình thông qua các chỉ số sau: (a) Trên chỉ số miễn dịch chung, levamisol làm tăng số lượng bạch cầu chung, số lượng BC lympho và BC trung tính trong máu ngoại vi; ở cấu trúc vi thể, số lượng lympho bào, kích thước của lách và tuyến ức được cải thiện rõ rệt; (b) Trên đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào, levamisol làm tăng phản ứng bì với kháng nguyên OA, tăng nồng độ IL-2 và làm giảm TNF- $\alpha$  trong máu ngoại vi. Trên đáp ứng miễn dịch dịch thể, levamisol không làm cải thiện nồng độ IgG so với lô mô hình. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của một số tác giả cũng sử dụng levamisol liều 100 mg/kg làm chứng dương trong mô hình gây suy giảm miễn dịch cho chuột nhắt trắng bằng CY (liều 200 mg/kg) [57], [58], [59].

#### *4.2.1.3. Ảnh hưởng của viên nang TD0070 lên các chỉ số chung của hệ miễn dịch*

##### **Trọng lượng lách, tuyến ức tương đối và vi giải phẫu lách, tuyến ức**

Các cơ quan chịu trách nhiệm miễn dịch đều thuộc mô lympho, được chia thành cơ quan trung ương và cơ quan ngoại vi. Các cơ quan lympho trung ương là nơi sinh sản và biệt hóa tế bào lympho đến trưởng thành, đủ tư cách xử lý kháng nguyên. Sau đó, các tế bào lympho chuyển tới cơ quan ngoại vi, trú ngụ lâu dài và biệt hóa dưới tác dụng của kháng nguyên [49].

Lách là một tổ chức lympho ngoại vi lớn, là nơi trú ngụ của các lympho bào (chủ yếu là lympho bào B) và đại thực bào. Đây cũng là nơi tập trung kháng nguyên, nhất là các kháng nguyên vào cơ thể bằng đường máu. Sau khi xâm nhập và được đại thực bào xử lý, kháng nguyên sẽ kích thích các tế bào

lympho B tại lách phân chia, biệt hóa thành tương bào và sản xuất kháng thể để loại trừ kháng nguyên đó. Theo dõi trọng lượng lách đánh giá được một phần tổn thương tế bào lympho đã mắc cảm. Từ đó đối chiếu với các chỉ tiêu về cấu trúc vi thể của lách và chức năng của các lympho bào B để đánh giá đầy đủ hơn về khả năng đáp ứng miễn dịch dịch thể.

Tuyến ức là cơ quan lympho trung ương, đảm nhiệm chức năng huấn luyện, phân chia và biệt hóa các tế bào lympho T. Tế bào lympho trong tuyến ức là từ tủy xương di cư tới. Tuyến ức đã tạo một vi môi trường thuận lợi để các tế bào lympho này biệt hóa thành dòng tế bào lympho T [49]. Do đó, trọng lượng tuyến ức là chỉ số quan trọng cùng với cấu trúc vi thể, chức năng của các lympho bào T để đánh giá đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào.

Khi tính trọng lượng lách và tuyến ức, chỉ số trọng lượng tương đối được sử dụng để loại trừ sự thay đổi trọng lượng lách và tuyến ức là do sự thay đổi của trọng lượng chung của cơ thể.

Kết quả nghiên cứu cho thấy ở lô mô hình trọng lượng lách tương đối và trọng lượng tuyến ức tương đối giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ( $p < 0,001$ ). Như vậy mô hình đã thành công trong việc làm giảm miễn dịch của chuột. Lô uống levamisol trọng lượng lách tương đối tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Trọng lượng tuyến ức tương đối không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ( $p > 0,05$ ), thậm chí còn thấp hơn lô mô hình. Như vậy, levamisol chỉ có tác dụng trên lách trong nghiên cứu này. Lô uống TD0070 liều 1,728 g/kg và liều 3,456 g/kg trọng lượng lách tương đối và trọng lượng tuyến ức tương đối có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Viên nang cứng TD0070 các liều làm tăng trọng lượng lách và tuyến ức so với lô mô hình, mức tăng phụ thuộc vào liều: viên nang cứng liều 3,456 g/kg làm tăng trọng lượng cơ quan lympho nhiều hơn so với lô viên nang cứng TD0070 liều 1,728 g/kg.

Sự tăng trọng lượng tương đối lách và tủy ức ở lô dùng viên nang cứng TD0070 các liều so với lô mô hình là do tăng số lượng của các lympho bào của 2 cơ quan này, điều này cũng phù hợp với quan sát trên giải phẫu vi thể lách và tủy ức.

### **Số lượng bạch cầu**

Tủy xương là nơi diễn ra sự tăng sinh mạnh mẽ các tế bào và là đích tác dụng quan trọng của thuốc gây độc tế bào (trong đó có CY). Sự phá hủy hoặc mất các tế bào dòng tủy trong tủy xương làm mất khả năng tái tạo các tế bào máu mới dẫn đến tình trạng giảm bạch cầu. CY gây ra ức chế tủy xương cấp tính, làm số lượng các tế bào máu ngoại vi giảm mạnh nhất từ 6 – 10 ngày và hồi phục trong 14 – 21 ngày [54].

Số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi là một chỉ số mang tính định lượng, phản ánh cả đáp ứng miễn dịch tự nhiên và miễn dịch đặc hiệu, là chỉ số huyết học phải được theo dõi chặt chẽ trên lâm sàng khi dùng CY [51],[53]. Sự thay đổi số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi phản ánh tác động của thuốc lên tế bào gốc tạo máu trong tủy xương.

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.5 cho thấy ở lô mô hình số lượng bạch cầu giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ( $p < 0,001$ ). Lô uống levamisol số lượng bạch cầu không khác biệt so với lô mô hình ( $p > 0,05$ ). Lô uống TD0070 liều 1,728 g/kg và liều 3,456 g/kg số lượng bạch cầu có xu hướng tăng so với lô mô hình và lô chứng dương, lô 3,456 g/kg tăng cao hơn so với lô liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Kết quả này chỉ ra tác dụng kích thích miễn dịch của levamisol và viên nang cứng TD0070 trên tế bào gốc tạo máu trong tủy xương, từ đó làm cải thiện số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi, đặc biệt viên nang cứng TD0070 liều 3,456 g/kg có tác dụng cải thiện rõ rệt hơn so với viên nang cứng TD0070 liều 1,728g/kg.

### **Công thức bạch cầu**

Công thức bạch cầu cho biết số lượng các loại bạch cầu trong máu ngoại vi, mỗi loại bạch cầu có chức năng riêng khi tham gia vào đáp ứng của cơ thể chống lại kháng nguyên. Trong đó, lympho bào là một trong những tế bào quan trọng nhất trong đáp ứng miễn dịch đặc hiệu [49],[51].

Tế bào lympho chiếm khoảng 20-30% tổng số bạch cầu trong máu. Dựa vào giai đoạn biệt hóa, khác biệt hình thái, chức năng, đặc biệt là nhờ dấu ấn bề mặt (CD), tế bào lympho được chia thành 2 quần thể chính là quần thể tế bào lympho T và tế bào lympho B có vai trò trong đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.

Bạch cầu hạt trung tính chiếm khoảng 60% tổng số bạch cầu trong máu ngoại vi, có vai trò chủ yếu trong đáp ứng miễn dịch tự nhiên. Chức năng chính của bạch cầu hạt trung tính là thực bào các phân tử nhỏ, vì vậy còn được gọi là tiểu thực bào. Trên bề mặt các tiểu thực bào có thụ thể với Ig, thành phần C3 của bổ thể, do đó những kháng nguyên đã kết hợp với kháng thể dễ dàng bị chúng tiêu diệt.

Ngoài các tế bào lympho, bạch cầu hạt trung tính, một số bạch cầu khác cũng tham gia vào đáp ứng miễn dịch của cơ thể như: bạch cầu mono có vai trò tiêu diệt các phần tử bé hơn bằng ẩm bào và thực bào; tế bào diệt tự nhiên có khả năng diệt tế bào u và tế bào vật chủ nhiễm virus; bạch cầu ái kiềm có thụ thể với IgE, khi kháng nguyên xâm nhập sẽ kết hợp với IgE làm bạch cầu ái kiềm giải phóng ra các hoạt chất,...[49].

Do vậy, theo dõi sự thay đổi về số lượng các loại bạch cầu giúp đánh giá một phần tình trạng hệ miễn dịch cơ thể.

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.6 cho thấy ở lô mô hình số lượng bạch cầu lympho, bạch cầu trung tính và bạch cầu mono giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với  $p < 0,001$ . Lô uống levamisol số lượng bạch cầu trung tính và bạch cầu mono có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Số lượng bạch cầu lympho giảm so với lô mô

hình. Lô uống TD0070 liều 1,728 g/kg/ngày số lượng bạch cầu trung tính tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Số lượng bạch cầu mono có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Số lượng bạch cầu lympho không khác biệt so với lô mô hình. Lô uống TD0070 liều 3,456 g/kg/ngày số lượng bạch cầu mono tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Số lượng bạch cầu trung tính có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Số lượng bạch cầu lympho không khác biệt so với lô mô hình.

Như vậy, viên nang cứng TD0070 làm tăng trọng lượng các cơ quan lympho (lách và tuyến ức) ở chuột nhất trắng bị gây suy giảm miễn dịch bằng CY do làm tăng số lượng lympho bào của các tổ chức này, tuy chưa làm thay đổi có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình tuy nhưng trên hình ảnh giải phẫu bệnh cho thấy sự hồi phục.

Kết quả nghiên cứu tương đương với Nguyễn Thị Mỹ Nương và cộng sự (2017). Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của Bài thuốc Nam Địa Long trên chuột gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphomide cho kết quả liều cho uống 1,2 g/kg và 2,4 g/kg thể hiện tác động kích thích miễn dịch, giúp hạn chế sự giảm trọng lượng cơ thể chuột, tăng trọng lượng tương đối của lách và tuyến ức, tăng số lượng bạch cầu. Đặc biệt, liều 2,4 g/kg của bột cao NDL còn giúp tăng bạch cầu lympho [31].

#### **4.2.2. Tác dụng của viên nang cứng TD0070 trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu.**

##### *4.2.2.1. Ảnh hưởng của TD0070 trên miễn dịch dịch thể*

Đáp ứng miễn dịch dịch thể là đáp ứng do các lympho bào B đảm nhiệm. Sau khi nhận biết kháng nguyên, tế bào lympho B sẽ tăng sinh và biệt hóa thành tương bào, bắt đầu sản xuất ra kháng thể. Các kháng thể này là kháng thể hòa tan, gọi một cách tổng quát hơn là các globulin miễn dịch

(immunoglobulin, viết tắt là Ig), đảm đương chức năng nhận biết, kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên để gây hiện tượng tua, ngưng kết và hoạt hóa hệ miễn dịch không đặc hiệu [49],[51].

Các globulin miễn dịch chính lưu hành trong máu gồm có 5 loại chính IgG, IgM, IgE, IgA và IgD. Các mảnh cấu phần của các Ig đều gồm có 2 mảnh Fab (vị trí kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên) và 1 mảnh Fc (có khả năng gắn lên bề mặt một số tế bào).

Trong số các Ig, IgG và IgM đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng loại trừ kháng nguyên. IgG là một globulin miễn dịch quan trọng, chiếm khoảng 70 – 75% tổng số Ig trong huyết thanh, có khả năng “cắm” phần Fc lên thụ thể trên màng của nhiều loại bạch cầu: đại thực bào, bạch cầu trung tính, tế bào mast,...giúp hoạt hóa hệ miễn dịch không đặc hiệu. IgM chiếm khoảng 10% tổng lượng Ig trong huyết thanh. Do có 5 F(ab)<sub>2</sub> (tức là 10 mảnh Fab) chia ra 5 phía nên IgM dễ dàng kết hợp với kháng nguyên, tạo phức hợp kháng nguyên – kháng thể.

Các globulin miễn dịch khác chiếm thành phần ít hơn trong máu và đảm nhận chức năng khác nhau: IgE (tế bào mast và bạch cầu ái kiềm có thụ thể ái tính rất cao với Fc của IgE khiến IgE bị cố định nhanh chóng, sự kết hợp IgE với KN đặc hiệu chủ yếu thực hiện trên bề mặt tế bào mà nó “cắm” vào); IgA (gồm 2 loại là IgA huyết thanh và IgA tiết ở dịch niêm mạc),...

Sự sản xuất kháng thể khi có mặt kháng nguyên phụ thuộc tuyến ức (hồng cầu cừu) cần có sự tham gia của cả lympho bào B và lympho bào T [63]. Tuy nhiên, trên chuột nhắt trắng, tỷ lệ tế bào lympho T có thụ thể tự nhiên với hồng cầu cừu rất ít, chỉ 1 – 2%, trong khi tỷ lệ này là 80 – 90% ở lympho bào B [49],[51]. Tế bào lympho B miễn cảm với kháng nguyên là hồng cầu cừu sẽ biệt hoá trở thành tương bào. Tương bào tiết ra các kháng thể hoà tan trong dịch của cơ thể nên gọi là kháng thể dịch thể. Các kháng thể dịch thể gồm IgM, IgG, IgA, IgD và IgE. Trong đó IgM và IgG có nhiều



trong máu nhất đồng thời cũng đóng vai trò quan trọng nhất trong đáp ứng miễn dịch dịch thể. Do đó, hồng cầu cừu được lựa chọn làm kháng nguyên nhằm kích thích sự biệt hóa của lympho bào B thành tương bào, thông qua định lượng kháng thể IgG trong máu có thể đánh giá chức năng của tế bào lympho B trong đáp ứng miễn dịch dịch thể.

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.12 cho thấy ở lô mô hình nồng độ IgG trong máu ngoại vi giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với  $p < 0,001$ . Lô uống levamisol nồng độ IgG trong máu ngoại vi tăng rõ rệt so với lô mô hình với  $p < 0,001$ . Các lô uống TD0070 liều 1,728 g/kg và liều 3,456 g/kg nồng độ IgG trong máu ngoại vi tăng rõ rệt so với lô mô hình với lần lượt  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$ .

So sánh thấy TD0070 có tác dụng cải thiện hơn với nghiên cứu của Nguyễn Phương Thanh, Nguyễn Chí Dũng, Nguyễn Trọng Thông (2020) nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của viên nén Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính bằng cyclophosphamid ở chuột nhắt trắng cho kết quả Livganic liều 0,6g/kg đường uống làm tăng nồng độ IgG máu ngoại vi ( $p < 0,05$ ) [27].

Như vậy, mặc dù tổng lượng tế bào lympho trong công thức bạch cầu không có sự cải thiện có ý nghĩa thống kê giữa lô uống TD0070 các liều và lô mô hình nhưng TD0070 có tác dụng kích thích miễn dịch dịch thể thông qua làm tăng nồng độ IgG trong máu ngoại vi.

#### 4.2.2.2. Ảnh hưởng của TD0070 trên miễn dịch qua trung gian tế bào

##### **Phản ứng bì với kháng nguyên OA**

Bên cạnh đáp ứng miễn dịch dịch thể, đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào là một phương thức đáp ứng đặc hiệu nhằm loại trừ kháng nguyên, do tế bào lympho T phụ trách. Trong quá trình biệt hóa, chọn lọc và trưởng thành, các lympho bào T hoàn toàn phụ thuộc tuyến ức (Thymus) nên được gọi là lympho bào T [49].

Để đánh giá đáp ứng miễn dịch, nhiều phương pháp đã được sử dụng trên thực nghiệm như phản ứng bì với kháng nguyên OA, định lượng cytokin trong máu, xác định số lượng các dưới nhóm của lympho bào T, chuyển dạng lympho bào,... [51]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn phản ứng bì với kháng nguyên OA và định lượng cytokin trong máu để đánh giá đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào.

Phản ứng bì với kháng nguyên OA là phương pháp kinh điển, dễ thực hiện và được nhiều tác giả sử dụng để đánh giá chức năng của lympho bào T [57], [58], [59].

Ovalbumin (OA) là một protein kháng nguyên hình cầu phức tạp, phụ thuộc tuyến ức. Sau khi OA được xử lý bởi các tế bào trình diện kháng nguyên, lympho bào T có thể nhận biết, loại trừ trực tiếp OA hoặc hỗ trợ tế bào lympho B trong quá trình biệt hóa thành tương bào, tiết kháng thể [1]. Phản ứng bì với kháng nguyên OA là kết quả của phản ứng quá mẫn chậm. Sau khi tiếp xúc với kháng nguyên, các tế bào lympho T được hoạt hóa và tiết ra các cytokin. Các cytokin sau khi được tiết ra có vai trò thu hút các bạch cầu mono, bạch cầu trung tính và hoạt hóa đại thực bào tập trung tại vị trí tiếp xúc với kháng nguyên, gây ra đáp ứng viêm tại chỗ [64]. Do đó, khi tiêm kháng nguyên OA vào gan bàn chân chuột, phản ứng viêm làm tăng bề dày chân chuột so với bình thường.

Kháng nguyên (OA) khi vào cơ thể lần đầu, được đại thực bào đưa theo đường bạch huyết đến hạch gần nhất. Tế bào lympho T ở vùng vỏ hạch đó tăng sinh mạnh làm sưng to hạch. Sau 6 ngày, những tế bào lympho này được miễn cảm, rời hạch tới lách và các hạch khác, rời vào tuần hoàn để nhận biết kháng nguyên lạ đó và loại trừ chúng. Khi kháng nguyên OA vào lại thì chỉ cần 10 giờ sau tại chỗ tiêm sẽ xuất hiện viêm [49]. Do đó, chúng tôi tiến hành tiêm OA lần 2 vào gan bàn chân chuột (sau lần 1 là 6 ngày) và sau 24 giờ tiến hành đo bề dày gan bàn chân chuột.

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.7 cho thấy ở lô mô hình phản ứng bì giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học với  $p < 0,05$ . CY là tác nhân gây độc tế bào, làm giảm số lượng và chức năng của lympho bào T, do đó ức chế đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua làm giảm phản ứng bì với kháng nguyên OA. Lô uống levamisol phản ứng bì tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Các lô uống TD0070 liều 1,728 g/kg và liều 3,456 g/kg phản ứng bì có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Điều đó cho thấy TD0070 có xu hướng kích thích trên miễn dịch tế bào.

Kết quả tương đương với nghiên cứu của Nguyễn Phương Thanh, Nguyễn Chí Dũng, Nguyễn Trọng Thông (2020). Tác dụng kích thích miễn dịch của viên nén Livganic – viên nén Giải độc gan Tuệ Linh trên mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính bằng cyclophosphamid ở chuột nhắt trắng kết quả: Livganic liều 0,6 g/kg làm gia tăng có ý nghĩa thống kê chiều dày chân chuột so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ). Livganic liều 1,8 g/kg làm tăng chiều dày bàn chân chuột so với lô mô hình tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) [27].

### **Nồng độ IL-2**

Ngoài phản ứng bì với kháng nguyên OA, nồng độ cytokin trong máu cũng là chỉ số quan trọng để đánh giá đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào. Cytokin là các hoạt chất do tế bào hoạt hóa tiết ra và gây được tác dụng lên các tế bào khác. Cytokin là tên gọi chung, dưới nó còn có nhiều nhóm nhỏ hơn được phân chia theo nguồn gốc, phạm vi và cách tác dụng...Về chức năng, nếu hoạt chất do một bạch cầu tiết ra và gây tác dụng lên một bạch cầu khác thì hoạt chất đó được gọi là interleukin (viết tắt IL). [51]

IL-2 là một cytokin quan trọng, không thể thiếu trong đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. IL-2 do Th tiết ra làm kích thích, tạo dòng thác miễn dịch trong cơ thể do: Tác động vào chính bản thân Th do Th cũng có thụ thể với IL-2. Kích

thích sự biệt hóa lympho bào B thành tương bào, sản xuất kháng thể. Hoạt hóa Tc giúp tiêu diệt tác nhân gây bệnh,...

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.8 cho thấy lô mô hình nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với  $p < 0,001$ . Lô uống levamisol nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Lô uống TD0070 cả 2 liều đều có tác dụng làm tăng IL-2 so với lô mô hình. Đặc biệt là TD0070 uống liều 1,728 g/kg tăng có ý nghĩa thống kê. Điều đó khẳng định thêm tác dụng kích thích đáp ứng miễn dịch tế bào của viên nang cứng TD0070.

### **Nồng độ TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  (còn gọi là yếu tố hoại tử u) là một cytokin chủ yếu do đại thực bào và Tc tiết ra. Thoạt đầu do TNF- $\alpha$  có khả năng gây hoại tử tế bào ung thư. Trên thực tế, TNF- $\alpha$  còn có nhiều tác dụng sinh học khác trên đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào như diệt tế bào mang kháng nguyên, hoạt hóa quá trình chết theo chu trình của tế bào nội mô, hoạt hóa đại thực bào, tham gia vào quá trình viêm, kích thích sự di chuyển của các tế bào miễn dịch tới vị trí viêm...[51].

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.9 cho thấy ở lô mô hình nồng độ TNF- $\alpha$  trong máu ngoại vi giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với  $p < 0,001$ . Lô uống levamisol nồng độ TNF- $\alpha$  trong máu ngoại vi tăng rõ rệt so với lô mô hình với  $p < 0,001$ . Lô uống TD0070 liều 1,728g/kg nồng độ TNF- $\alpha$  trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Các lô uống TD0070 liều 3,456 g/kg nồng độ TNF- $\alpha$  trong máu ngoại vi tăng rõ rệt so với lô mô hình với  $p < 0,01$ .

### **Nồng độ IFN- $\alpha$**

Interferon alpha (IFN -  $\alpha$ ) là một cytokin có bản chất là glycoprotein có vai trò ức chế sự sao chép virus trong các tế bào nhiễm virus, ngăn chặn tăng

sinh tế bào, tăng hoạt tính thực bào của đại thực bào và tăng tính độc hại tế bào đặc thù của các tế bào lympho đối với các tế bào đích [51].

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.10 cho thấy ở lô mô hình nồng độ IFN- $\alpha$  trong máu ngoại vi giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học với  $p < 0,05$ . Lô uống levamisol nồng độ IFN- $\alpha$  trong máu ngoại vi tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Lô uống TD0070 liều 1,728 g/kg nồng độ IFN- $\alpha$  trong máu ngoại vi tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Lô uống TD0070 liều 3,456 g/kg nồng độ IFN- $\alpha$  trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

### **Nồng độ IFN- $\gamma$**

IFN- $\gamma$  là cytokin hoạt hóa đại thực bào, nó giúp tế bào T và NK hoạt hóa đại thực bào để giết các vi sinh vật đã được thực bào. IFN- $\gamma$  thực hiện điều này nhờ kích thích sự tổng hợp các chất trung gian oxy phản ứng và oxid nitric.

IFN- $\gamma$  kích thích sự bộc lộ của MHC lớp I và lớp II và các chất đồng kích thích trên tế bào trình diện kháng nguyên. IFN -  $\gamma$  cũng kích thích sự sản xuất của nhiều protein tham gia vào quá trình xử lý kháng nguyên như chất vận chuyển (TAP), và hai thành phần LMP - 2, LMP - 7 của proteasom và HLA - DM. Như vậy IFN -  $\gamma$  thúc đẩy sự trình diện kháng nguyên phối hợp với MHC và khuếch đại sự nhận diện trong đáp ứng miễn dịch. IFN- $\gamma$  cũng là chất hoạt hóa tế bào nội mạc thành mạch và tăng cường khả năng tác động của TNF trên tế bào nội mạch, tạo ra kết dính tế bào lymphô vào thành mạch và xuyên mạch đi đến vị trí nhiễm trùng.

IFN- $\gamma$  kích thích sự biệt hóa của tế bào T CD4+ còn nguyên vẹn thành tiểu nhóm Th1 và ức chế sự tăng sinh của tế bào Th2. Tác động của IFN- $\gamma$  lên Th1 một phần được trung gian bởi IL-12. Ngoài ra, IFN- $\gamma$  kích thích sự sản xuất yếu tố sao chép để tạo ra biệt hóa Th1.

IFN- $\gamma$  tác động lên tế bào B để chuyển mạch các tiểu lớp IgG, nhất là IgG2 ở chuột nhắt và ức chế chuyển mạch sang các isotyp phụ thuộc IL-4 như IgE và IgG1 ở chuột. Như vậy, IFN- $\gamma$  cũng tạo ra đáp ứng kháng thể và tham gia vào quá trình loại bỏ vi sinh vật qua trung gian quá trình thực bào.

IFN- $\gamma$  hoạt hóa tế bào trung tính và kích thích hoạt tính tế bào NK [51].

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.11 cho thấy ở lô mô hình nồng độ IFN- $\gamma$  trong máu ngoại vi có xu hướng giảm so với lô chứng sinh học, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Lô uống levamisol nồng độ IFN- $\gamma$  trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Các lô uống TD0070 liều 1,728 g/kg và 3,456 g/kg nồng độ IFN- $\gamma$  trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Như vậy, viên nang cứng TD0070 cả 2 liều có tác dụng kích thích đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua làm tăng phản ứng bì với kháng nguyên OA, nồng độ IL-2, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  trong máu ngoại vi. Cần thực hiện nhiều nghiên cứu tiếp theo ở mức độ tế bào để làm sáng tỏ cơ chế tác dụng của viên nang cứng TD0070 trong điều biến miễn dịch.

Kết quả cũng tương tự nghiên cứu của Nguyễn Phương Thanh, Nguyễn Chí Dũng, Nguyễn Trọng Thông (2020). Tác dụng kích thích miễn dịch của viên nén Livganic – viên nén Giải độc gan Tuệ Linh trên mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính bằng cyclophosphamid ở chuột nhắt trắng kết quả liều 0,6 g/kg và 1,8 g/kg làm tăng đáp ứng miễn dịch dịch thể thông qua: Tăng nồng độ IgG máu ngoại vi; làm tăng đáp ứng miễn dịch tế bào: Tăng phản ứng bì với kháng nguyên OA và tăng nồng độ IL – 2 [27].

### **4.2.3. Bàn luận về tác dụng điều biến miễn dịch của TD0070 theo phân tích tác dụng của từng vị thuốc và tác dụng chung bài thuốc theo YHCT.**

Y học cổ truyền không có bệnh danh cụ thể cho bệnh về suy giảm miễn dịch. Tuy nhiên, nếu căn cứ vào các chứng trạng lâm sàng thì các biểu hiện suy giảm miễn dịch tương ứng với chứng Chính khí bất túc của y học cổ truyền.

Chính khí bất túc là bao gồm Âm, Dương, Khí, Huyết, Tinh, Tân dịch cùng với các tạng phủ công năng hư nhược dẫn đến cơ thể sức đề kháng kém, ngoại tà xâm nhập vào gây ra bệnh tật.

Hư lao là bệnh lý khá phức tạp do nhiều nguyên nhân gây nên sự giảm sút chức năng các tạng phủ sinh ra âm dương khí huyết đều hư nhưng do có sự thiên thắng nên biểu hiện lâm sàng có những thể bệnh khác nhau. Những nguyên nhân chủ yếu có:

- Tiên thiên bất túc: Yếu tố bẩm sinh, suy yếu, dị dạng từ trong bụng mẹ, dễ mắc cảm nhiễm ngoại tà, tạng Phế bị bệnh trước, từ ngoại cảm dần dần vào nội thương, lúc đầu có thể bị ở một tạng dần dần lan sang các tạng khác, chuyển thành hư lao. Ngoài ra cơ thể suy yếu dễ nhiễm một số bệnh do di truyền: ngũ trì, ngũ nhuyễn từ tuổi nhỏ phát triển thành hư lao. Cũng có khi do sự phát dục kém, khi trưởng thành, thể lực yếu, ốm đau liên miên hoặc sau khi bệnh thể lực yếu, lâu hồi phục, dương khí và âm huyết ngày càng suy dần dần dẫn đến tổn thương ngũ tạng [16], [17].

- Mắc bệnh ngoại cảm hay nội thương lâu ngày không được chữa trị tốt dẫn đến chức năng tạng phủ suy yếu mà thành hư lao.

- Sinh hoạt, làm việc quá sức, ăn uống thiếu điều độ, uống rượu, hút thuốc, gây thương tổn tỳ phế, không hóa sinh được tinh chất, không sinh được khí huyết. Nguồn sinh ra khí huyết không đủ, không điều dưỡng được tạng phủ bên trong, không làm đầy phần doanh vệ bên ngoài, lại kèm bị ngoại cảm hoặc phòng dục tùy tiện gây tổn thương Can Thận ... đều dẫn đến hư lao.

- Thất tình: như tức giận nhiều hại can, vui mừng quá độ hại tâm, lo nghĩ nhiều hại Tỳ, buồn phiền hại Phế, kinh sợ hại Thận, đều là nguyên nhân về tâm thần làm âm dương mất cân bằng, khí huyết hư tổn, tinh hư lao [16], [17]

Hoạt động của hệ miễn dịch tạo ra sức đề kháng cho cơ thể nhằm đối phó với nguyên nhân gây bệnh. Sức đề kháng có vai trò quan trọng với sức khỏe, nó chính là “màng chắn” giúp kháng lại các yếu tố gây bệnh. Hoạt động hệ miễn dịch phải mạnh mẽ, mới duy trì tốt sức đề kháng bệnh tật.

YHCT có hai khái niệm là Chính khí và Tà khí. Chính khí là khả năng phản ứng của cơ thể đối với các nguyên nhân gây bệnh. Tà khí là các nguyên nhân gây bệnh. Chính khí đầy đủ thì tà khí khó có khả năng gây bệnh. Vì vậy, đưa ra nguyên tắc điều trị của YHCT là phù chính và khứ tà. Trong đó phù chính là dùng các thuốc bổ dưỡng nâng cao chính khí, nâng cao sức đề kháng của cơ thể, khứ tà là dùng các vị thuốc có tính giải biểu, khu phong tán hàn trừ thấp để đuổi tà khí ra ngoài [18], [19].

Chính khí của cơ thể gồm có 4 mặt chính là Âm, Dương, Khí, Huyết.

Phương thức tác động của chính khí bao gồm:

Tự mình điều tiết để thích ứng với sự thay đổi của nội và ngoại hoàn cảnh để duy trì cân bằng âm dương.

Kháng lại tà khí để phòng bệnh hoặc khi cơ thể mắc bệnh thì khu tà và đưa ra ngoài.

Khả năng cơ thể tự hồi phục sau khi bị bệnh hoặc khi cơ thể bị hư nhược thì tự mình thay đổi và hồi phục sức khỏe.

Từ đó có thể nói Chính khí của Đông y tương quan gần với sức đề kháng của Tây y. Hay nói một cách khác: Lý luận về Chính khí của YHCT và quan điểm miễn dịch học có nhiều điểm gần nhau. Vì vậy, việc tăng cường, bồi bổ chính khí của YHCT cũng có nghĩa tương đương với tăng cường hoạt động hệ miễn dịch của cơ thể.



Các vị thuốc như Nhân sâm, Hoàng kỳ, Linh chi, Bồ cốt chi, Câu kỷ tử, Mạch môn... có tác dụng rõ rệt lên hệ thống miễn dịch [17].

Xây dựng bài thuốc trên cơ sở biện chứng luận trị theo y lý YHCT, sau đó nghiên cứu theo mô hình YHHD để đánh giá hiệu quả là hướng nghiên cứu đang được ứng dụng đối với thuốc YHCT hiện nay.

TD0070 là chế phẩm YHCT với công thức chứa bài thuốc cổ phương Nhân sâm bại độc tán. Gồm 15 vị là Sài hồ, Tiền hồ, Xuyên khung, Chỉ xác, Khương hoạt, Độc hoạt, Phục linh, Cát cánh, Cam thảo, Sinh khương, Bạc hà, thay Nhân sâm bằng Đảng sâm thêm các vị là Quế chi, Đại diệp đẳng, Cách lông vàng.

Sài hồ vị đắng, tính hơi hàn, quy vào các kinh Can, Đờm, Tâm bào, Tam tiêu. Công năng: Phát biểu, hoà lý, thoái nhiệt, giải uất, điều kinh. Tác dụng dược lý: Sài hồ giúp tăng cường thể dịch miễn dịch và miễn dịch tế bào. Tác dụng hạ nhiệt, an thần, giảm đau, giảm ho rõ rệt. Bảo vệ gan và lợi mật. Hạ mỡ trong máu. Tăng khả năng tổng hợp protein của chuột. Ức chế liên cầu khuẩn tan huyết, phẩy khuẩn tả, trực khuẩn lao, leptospira, virus cúm. Kháng virus viêm gan, ký sinh trùng sốt rét [6],[18],[20].

Tiền hồ tính đắng, cay, hơi hàn quy vào các kinh Phế, Tỳ. Công năng: Tuyên tán phong nhiệt, hạ khí chỉ ho, tiêu đờm. Tác dụng dược lý: Tiền hồ có tác dụng giảm viêm, tăng tiết trong đường hô hấp giúp hóa đàm. Có tác dụng đối vận calci, ức chế calci đi vào cơ trơn, ức chế co cơ trơn. Ngoài ra, dược liệu còn có tác dụng tăng lưu lượng máu của động mạch vành, không ảnh hưởng nhịp tim và sức co bóp cơ tim. Thuốc có tác dụng ức chế ngưng tập tiểu cầu [6],[18],[20].

Xuyên khung vị cay, tính ấm, quy vào kinh can, đờm, tâm bào. Công năng: Hành khí, hoạt huyết, khu phong chỉ thống. Tác dụng dược lý: Xuyên khung có tác dụng chống loạn nhịp, gây giãn động mạch vành. Ức chế kết tập tiểu cầu. Tăng lưu lượng máu mạch vành [6],[18],[20].

Chỉ xác vị đắng, chua, hơi hàn, quy vào kinh tỳ, vị. Có tác dụng: Phá khí, tiêu tích, hoá đờm, trừ bã, lợi cách, khoan hung. Tác dụng dược lý: Chỉ xác có tác dụng tăng cường tim mạch, huyết áp: do thành phần chủ yếu là Neohesperidin nhưng không làm tăng nhịp tim. Thuốc có tác dụng co mạch, tăng lực cản của tuần hoàn ngoại vi, tăng co bóp của cơ tim, tăng lượng cGMP của cơ tim và huyết tương nơi chuột nhất. Hỗ trợ rối loạn tiêu hóa [6],[18],[20].

Khương hoạt vị cay, đắng, tính ấm, quy vào kinh bàng quang, thận. Có tác dụng: Phát tán phong hàn, phong thấp, chỉ thống. Tác dụng dược lý: Khương hoạt có tác dụng hạ sốt, giảm đau. Chống loạn nhịp tim. Đối kháng với cơ tim thiếu máu cấp. Chống choáng. Kháng khuẩn. Chống viêm, chống dị ứng [6],[18],[20].

Độc hoạt vị cay, tính ôn, quy vào kinh thận, can. Công năng: Khu phong hàn, trừ thấp, thông tỳ, chỉ thống, giảm đau. Tác dụng dược lý: Độc hoạt có tác dụng giảm đau. An thần. Kháng viêm. Chống co thắt. Chống lão hoá [6],[18],[20].

Phục linh vị ngọt, nhạt, tính bình, quy vào kinh Tâm, tỳ, thận. Công năng: Lợi thủy, thẩm thấp, kiện tỳ, định tâm. Tác dụng dược lý: Phục linh có tác dụng chống ung thư (tác dụng này có được là từ hoạt chất polysaccharide của thuốc) do đó làm tăng khả năng miễn dịch của cơ thể. Ngoài ra còn hạ đường huyết. chống thải ghép, chống ký sinh trùng, chống virus viêm gan B. [6],[18],[20].

Cát cánh vị đắng, cay, vi ôn, quy kinh Phế. Công năng: Tuyên phế khí, tán phong hàn, tán ho, trừ đờm. Tác dụng dược lý: Cát cánh có tác dụng trừ đờm, giảm ho. Chống viêm. Giảm đau, hạ sốt. Hạ đường huyết và cholesterol [6],[18],[20].

Đảng sâm vị ngọt, tính bình, quy vào kinh phế, tỳ. Công năng: Bổ trung ích khí, sinh tân, chỉ khát. Tác dụng dược lý: Đảng sâm có tác dụng cải thiện

trí nhớ. Tăng cường chức năng cho vùng dưới đồi, tuyến yên và tuyến thượng thận. Tăng trương lực cơ, tăng lưu lượng máu mạch vành, cải thiện cung lượng oxy cho cơ tim, não và các chi của cơ thể. Điều hoà hệ tiêu hoá. Ức chế khối u. Hạ đường huyết. Chống lão hoá [6],[18],[20].

Cam thảo vị ngọt, tính bình, quy vào 12 kinh. Công năng: Bổ trung khí, dưỡng huyết nhuận phế chỉ ho, thanh nhiệt giải độc, hoà hoãn giảm đau. Tác dụng dược lý: Cam thảo có tác dụng ức chế thần kinh trung ương. Giảm ho. Giảm co thắt cơ trơn. Chữa loét tiêu hóa, ức chế tăng tiết dịch vị của histamin. Bảo vệ gan, tăng tiết mật. Chống viêm gan, chống dị ứng. Chữa bệnh addison. Giải độc trên tim. Lợi tiểu, chữa táo bón [6],[18],[20].

Sinh khương vị cay, tính ấm, quy vào các kinh phế, tỳ, vị. Công năng: phát biểu trừ hàn, ôn ấm, làm hết nôn, tiêu đờm, hành thủy giải độc. Sinh khương có tác dụng ức chế thần kinh trung ương. Hạ nhiệt. Giảm đau, giảm ho. Chống co thắt. Chống nôn. Kích thích vận chuyển đường tiêu hoá. Chống viêm [6],[18],[20].

Bạc hà vị cay, tính mát, quy vào kinh phế, can. Tác dụng làm ra mồ hôi, điều trị bệnh sợ nóng, sốt cao do cảm cúm, cảm lạnh, nhức đầu, chóng mặt, đau họng, thư giãn, long đờm, kích thích tiêu hóa. Bạc hà có tác dụng sát khuẩn mạnh, điều trị cảm cúm. Chống co thắt cơ trơn. Giảm đau. Ức chế hô hấp, tuần hoàn, thần kinh trung ương. Tác động đến nhiệt độ cơ thể [6],[18],[20].

Quế chi vị ngọt, đắng tính ấm, quy vào kinh tâm, phế, bàng quang. Tác dụng giải cảm tán hàn, chỉ thống thông kinh, hành huyết lợi tiểu. Tác dụng dược lý: kích thích tiêu hóa, trợ hô hấp và tuần hoàn, tăng sự bài tiết, co mạch, tăng nhu động ruột và co bóp tử cung, chống khối u, chống xơ vữa động mạch vành, chống oxy hóa. Tinh dầu có chất sát trùng mạnh [6],[18],[20].

Đại diệp đằng gốc, thân có vị đắng, tính hàn. Có tác dụng: hoạt huyết thông lạc, tán ứ chỉ thống, cường gân cốt [6],[18],[20].

Cách lông vàng vị nhạt, hơi chát, tính bình. Có tác dụng: Hoạt huyết tán ứ, mạnh gân cốt, khu phong giảm đau [6],[18],[20].

Đẳng sâm, phục linh, cam thảo có tác dụng bổ trung ích khí, kiện tỳ, tăng cường chính khí; Sài hồ: thăng dương khí; Tiền hò, Cát cánh, Chỉ xác lý khí; Bạc hà, Sinh khương giải biểu; Độc hoạt, Xuyên khung, Khương hoạt, Qué chi, Đại diệp đằng, Cách lông vàng tán phong hàn thấp, hoạt huyết, thông kinh, chỉ thống. Toàn bài có tác dụng ích khí giải biểu, tán phong hàn, trừ thấp.

Cả bài thuốc bên trong sử dụng các vị thuốc bổ khí, trợ dương giúp nâng cao chính khí. Bên ngoài sử dụng các vị thuốc khứ phong, tán hàn, trừ thấp đánh đuổi ngoại tà. Phù hợp với nguyên tắc điều trị Phù chính – Khứ tà.

Luu Nguyên, Luu Kim Báo, Bàn Vĩ (2020) dùng các thuật toán để nghiên cứu Nhân sâm bại độc tán trong điều trị COVID-19 bằng cách thông qua cơ sở dữ liệu TCMSD và cơ sở dữ liệu Batman-TCM. Kết quả Nhân sâm bại độc tán có 209 thành phần và 145 đích tiếp nhận ứng dụng trong việc điều trị COVID-19. Các đích tiếp nhận chính là AR, ESR1, PTGS2, NOS2 và GSK3B, v.v. Trong số đó, 40 đích tiếp được biểu hiện tương thích với thụ thể men chuyển 2 (ACE2) của coronavirus mới (SARS-CoV-2). [25].

Đồng thời bài thuốc được bào chế thành dạng viên hoàn cứng để việc sử dụng trên lâm sàng, bảo quản được thuận tiện và góp phần kế thừa, phát triển và hiện đại hoá YHCT.

## CHƯƠNG 5

### KẾT LUẬN

#### 5.1. Kết luận về độc tính cấp của viên nang cứng TD0070.

- Chưa xác định được LD50 trên chuột nhắt trắng của viên nang cứng TD0070 theo đường uống.

- Viên nang cứng TD0070 liều tối đa 37,5 viên/kg không có biểu hiện độc tính cấp.

#### 5.2. Kết luận về tác dụng điều biến miễn dịch của viên nang cứng TD0070

*TD0070* liều 1,728 g/kg và liều 3,456 g/kg cho chuột uống liên tục trong 7 ngày có tác dụng kích thích miễn dịch rõ rệt trên mô hình gây suy giảm miễn dịch cấp tính tiêm CY liều duy nhất 200 mg/kg thông qua các chỉ số:

- Trên chỉ số miễn dịch chung: Xu hướng tăng trọng lượng lách, ức tương đối, tăng số lượng Bạch cầu, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

- Trên miễn dịch qua trung gian tế bào: TD0070 uống liều 1,728 g/kg nồng độ IL-2, IFN- $\alpha$  tăng có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), nồng độ TNF- $\alpha$  ở liều dùng 3,456 g/kg tăng có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01$ ), phản ứng bì với kháng nguyên OA, nồng độ IFN- $\gamma$  trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

- Trên miễn dịch dịch thể: tăng rõ rệt nồng độ IgG trong máu ngoại vi có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01, 0,001$ ).

## **KIẾN NGHỊ**

TD0070 là chế phẩm YHCT với công thức chứa bài thuốc cổ phương Nhân sâm bại độc tán. Từ các kết quả nghiên cứu, chúng tôi xin đề xuất các kiến nghị như sau:

+ Tiếp tục thực hiện các nghiên cứu về độc tính bán trường diễn và cơ chế điều biến miễn dịch của các vị thuốc trong sản phẩm TD0070.

+ Tiếp tục thực hiện các nghiên cứu về tính an toàn và tác dụng điều biến miễn dịch trên lâm sàng của sản phẩm TD0070.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Văn Đình Hoa** (2019). *Sinh lý bệnh và miễn dịch*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. **De Tommasi et al** (2000). *Miễn dịch thiết yếu, Bản dịch của Roitt I.M*, Trường Đại học Y Hà Nội.
3. **Đào Văn Phan** (2012). *Dược lý học lâm sàng*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, 567-578.
4. **Patil US, JaydeoKar AV and BandawaneDD** (2012), Immunomodulator: a pharmacological review. *Int J Pharm Sci*, second edition, 4(1), 30-36.
5. **Đào Văn Chinh, Nguyễn Quốc Tuấn, Phạm Vân Thức** (2002). *Miễn dịch học lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học
6. **Đào Văn Phan** (2013). *Dược lý học*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học.
7. **Phạm Thị Vân Anh** (2011). *Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch và chống oxy hóa của cao quả Nhàu (Morinda citrifolia L. Rubiaceae) trên động vật thực nghiệm*, Trường Đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
8. **Nguyễn Nhược Kim** (2017). *Bệnh học nội khoa Y học cổ truyền*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, tr 128-136.
9. **Faderl S., Harris D., Van Q. Et al** (2003). Granulocyte- acrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces antiapoptotic and proapoptotic signals in acute myeloid leukemia. *Blood*, **102(2)**, 630–637.
10. **Sergeeva A., Ono Y., Rios R. Et al** (2008). High titer autoantibodies to GM-CSF in patients with AML, CML and MDS are associated with active disease. *Leukemia*, **22(4)**, 783–790.

11. **Kynina E.S., Dziubak S.T., Vitvitskiĭ V.M. Et al** (1991). *Immunomodulating effect of levamisole in antibiotic therapy. Antibiot Khimioterapiia Antibiot Chemoterapy Sic*, **36(1)**, 26–28
12. **Du X., Pan H., Zhang C. và cộng sự** (2010). Zingiber officinale extract modulates g-rays-induced immunosuppression in mice. *J Med Plants Res*, **4(16)**, 1647–1655.
13. **Ronit E, Hope L** (2009). The biology of cancer and its relationship to disparities in cancer occurrence and outcomes. *Cause Evid –Based Solut*, Springer Publishing Company, New York 12-14.
14. **Trần Thuý** (2006). *Nội kinh*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, tr. 150.
15. **Trần Thuý** (2001). *Kim quĩ yếu lược*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, tr 83.
16. **Các bộ môn nội** (2012). *Điều trị bệnh nội khoa tập 2*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học.
17. **Trần Thuý** (2006). *Chuyên đề nội khoa Y học cổ truyền*, Trường Đại học Y Hà Nội, NXB Y học, tr 470-473.
18. **Đỗ Tất Lợi** (2015). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học.
19. **Nguyễn Bá Tĩnh** (2007). *Tuệ Tĩnh toàn tập - Nam dược thần hiệu*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 140-142.
20. **Võ Văn Chi** (2021). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản y học.
21. **Kuo Y.H and Kuo L.M.** (1997). Antitumour and anti – AIDS triterpenes from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry*, **44(7)**, 1275 – 1281.
22. **Toh D-F, Patel D, Chan E et.al.** (2011). Anti – proliferative effects of raw and steamed extracts of *Panax notoginseng* and its ginsenoside constituents on human liver cancer cells. *Chin Med*, **6(1)**,4.



23. **Xu Jiping, Qiu Weiyan và cộng sự (1988).** Quan sát tiếp theo về tỷ lệ sống sót của bệnh ung thư phổi phế quản giai đoạn trung và giai đoạn nặng được điều trị bằng phương pháp bổ khí và dưỡng âm so với hóa trị liệu [J], *Tạp chí Y học cổ truyền Trung Quốc Giang Tô*, (12), 37.
24. **Pan Minqiu, Li Yueheng, Liu Jing'an (1990).** Báo cáo về 80 trường hợp sử dụng hợp chất phổi và hóa trị trong điều trị ung thư biểu mô tế bào vảy phế quản phổi nguyên phát ở giai đoạn trung bình và giai đoạn cao [J], *Tạp chí Y học Cổ truyền Trung Quốc*, 5 (3 ),19.
25. **Liu Yuan-Liu Jinbao, Peng Wei (2020),** *Tạp chí Dược liệu Trung Quốc* Tập 43 số 6, 1536 – 1544.
26. **Phạm Huy Quyến, Phan Thị Phi Phi, Phan Thu Anh (1994),** “Nghiên cứu invitro tác dụng kích thích miễn dịch của chất chiết toàn phần rễ lá *Morinda citrifolia*”. *Tạp chí Y học Việt Nam*, số 9, tr. 21-26.
27. **Nguyễn Phương Thanh, Nguyễn Chí Dũng, Nguyễn Trọng Thông (2020).** Tác dụng kích thích miễn dịch của viên nén Livganic – viên nén Giải độc gan Tuệ Linh trên mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính bằng cyclophosphamid ở chuột nhắt trắng, *Tạp chí Y học Việt Nam*, Tập 491(1), tr. 261-266.
28. **Nguyễn Gia Chấn, Bùi Thị Bằng, Lê Nguyệt Nga cùng cộng sự (1998).** Tác dụng phục hồi miễn dịch của polysaccarid chiết từ rễ củ cây đương quy Nhật Bản: Thông báo số 1. *Tạp Chí Dược Liệu*, 2, 47–49.
29. **Đinh Thị Thu Hằng (2020).** Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của đông trùng hạ thảo *Banikha* trên động vật thực nghiệm. *Tạp chí nghiên cứu y học*, tập 138(2), tr 69-77.
30. **Trần Thị Minh Tâm, Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Minh Đức (2014).** Nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch của cao xương cá sấu hoa cà, *Tạp chí Viện Dược liệu – Bộ Y tế số 4/2014*.

31. **Nguyễn Thị Mỹ Nương và cộng sự** (2017). Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của Bài thuốc Nam Địa Long trên chuột gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphomide, *Tạp chí phát triển khoa học và công nghệ*, chuyên sâu khoa học tự nhiên, tập 1, số 6 năm 2017.
32. **Văn phòng Tổng hợp Ủy ban Y tế Quốc gia, Văn phòng Cục Quản lý Nhà nước về Y học Cổ truyền Trung Quốc** (2020), Kế hoạch Chẩn đoán và Điều trị Bệnh Viêm phổi do vi rút Corona mới (Phiên bản thử nghiệm 7) [J] *Tạp chí Bệnh tim phổi và mạch máu*, 39(2): 103-108.
33. **Bộ Y tế** (2018). *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ năm, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
34. **Bộ y tế** (2015). *Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu* (ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015).
35. **Nguyễn Thị Vinh Hà, Phạm Huy Quyến, Phan Thị Phi Phi** (1994). Về mô hình gây suy giảm miễn dịch thực nghiệm, *Kỹ yếu công trình nghiên cứu khoa học*, Trường Đại học Y Hà Nội, 16-17
36. **Đinh Thị Thu Hằng** (2017). *Nghiên cứu độc tính và tác dụng kích thích miễn dịch của viên nang Kovir trên động vật thực nghiệm*. Trường Đại học Y Hà Nội.
37. **Manepalli S., Gandhi J.A., Ekhar V.V. Et al** (2013). Characterization of a cyclophosphamide-induced murine model of immunosuppression to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *J Med Microbiol*, **62(Pt 11)**, 1747–1754.
38. **Vigila A. and Baskaran X.** (2008). Immunomodulatory Effect of Coconut Protein on Cyclophosphamide Induced Immune Suppressed Swiss Albino Mice. *Ethnobot Leaflet* 12 1206-12, **2008(1)**.

39. **Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC** (2011). “Chap 61: Cytotoxic Agents”, *Goodman & Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics 12e*, McGraw-Hill Global Education Holdings.
40. **Guo L., Zhang X., Zheng B. và cộng sự.** (2008). IgM-mediated signaling is required for the development of a normal B cell memory response. *Mol Immunol*, **45**(4), 1071–1077.
41. **Phan Anh Tuấn** (2006). *Đánh giá tác dụng phục hồi tổn thương hệ miễn dịch sau chiếu xạ của “Đông trùng hạ thảo nam- sâu chít” (Brihaspa atrostigmella moore 1868) giai đoạn thực nghiệm.* Trường Đại học Y Hà Nội, tr. 48 – 54.
42. **Xuhui Chen, Shasha Wang, Guangjing Chen, et al** (2020), The immunomodulatory effects of Carapax Trionycis ultrafine powder on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice, *J Ethnopharmacol*, **115**(3):502-6.
43. **Kyakulaga A.H., Ogwang P.E., Obua C. Et al** (2013). Immunomodulatory Effects of Aqueous Extracts of Auricularia sp and Pleurotus sp Mushrooms in Cyclophosphamide- Immunosuppressed Wistar Rats. *Br J Pharm Res*, **3**(4), 662–670.
44. **Đỗ Trung Đàm (2006)**, Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm. Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật. *Tạp chí dược học*, số 479, tr. 38-41
45. **Đỗ Trung Đàm (2014)**, *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, Nhà xuất bản y học.
46. **Gerhard Vogel H.** (2016), *Drug discovery and evaluation Pharmacological assays*, Springer.

47. **World Health Organization** (2013), Working group on the safety and efficacy of herbal medicine, *Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization*.
48. **Anh, P. T. V., Đức, N. H. M., Năm, N. V., Minh, P. T. T., Tiên, N. V., Hải, V. X., Dung, L. N. T., Quỳnh, N. T. N., Anh, B. T. V., Hằng, N. T. T., & Hằng, Đình T. T. (2023)**. Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của Imuglucan trên động vật thực nghiệm. *Tạp Chí Nghiên cứu Y học*, 167(6), 43-50. <https://doi.org/10.52852/tencyh.v167i6.1708>
49. **Văn Đình Hoa và Nguyễn Ngọc Lanh (2011)**, *Sinh lý bệnh và miễn dịch*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội
50. **Vũ Triệu An (2001)**, *Miễn dịch học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội
51. **Goodman and Gilman (2010)**, *The pharmacological basis of therapeutics, twelfth edition*, McGraw-Hill Companies, Inc
52. **Bộ Y tế (2015)**, *Dược thư quốc gia*, Hội đồng Dược điển Việt Nam, Nhà Xuất bản Y học, Hà Nội.
53. **Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, et al (2015)**, Rang and Dale's pharmacology, *eighth edition*, Elsevier, UK.
54. **Hussain A, Shadma W, Maksood A, et al (2013)**. *Protective effects of Picrorhiza kurroa on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice*. Pharmacognosy Res, 5(1), 30-35.
55. **Zhao X, Zhang Y, Song X, et al (2015)**. Effect of Chuanminshen violaceum polysaccharides and its sulfated derivatives on immunosuppression induced by cyclophosphamide in mice. *Int J Clin Exp Med*, 8(1), 558-568.
56. **Gong Y, Wu J and Shi-Tong Li (2015)**. Immuno-enhancement effects of Lycium ruthenicum Murr. polysaccharide on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Int J Clin Exp Med*, 8(11), 20631–20637.

57. **Nguyễn Văn Rư và Quách Thị Hà Vân (2015).** Thử nghiệm tác dụng kích thích miễn dịch của pidotimod tổng hợp trên động vật thí nghiệm. *Tạp chí Dược học*, 55(469), 26-31.
58. **Phạm Thị Vân Anh (2011),** *Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch và chống oxy hóa của cao quả Nhàu (Morinda citrifolia L. Rubiaceae) trên động vật thực nghiệm*, Trường Đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
59. **Phạm Thủy Phương, Trương Việt Bình, Phạm Thị Vân Anh và cộng sự (2014).** Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của Hồi xuân hoàn trên chuột nhắt trắng bị suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid. *Tạp chí dược học*, 54 (461), 25-30.
60. **Gupta M (2016).** *Levamisole: A multi-faceted drug in dermatology. Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 82(2), 230-236.
61. **Patnaik S, Balderia P, Vanchhawng L, et al (2015).** Levamisole: Is levamisole-induced vasculitis a relegated diagnostic possibility? A case report and review of literature. *Am J Case Rep*, 16, 658-662.
62. **Chen LY, Lin YL and Chiang BL (2008).** Levamisole enhances immune response by affecting the activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 151(1), 171-181.
63. **Haquea MR, Ansaria SH and Rashikhbv A (2013).** Coffea arabica seed extract stimulate the cellular immune function and cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(1), 101-108
64. **Morefield GL, Jianga D, Romero-Mendez IZ, et al (2005).** *Effect of phosphorylation of ovalbumin on adsorption by aluminum-containing adjuvants and elution upon exposure to interstitial fluid. Vaccine* 23, 1502–1506.

## PHỤ LỤC 1 HÌNH ẢNH NGHIÊN CỨU



Chuột nhắt trắng sử dụng trong nghiên cứu



## PHỤ LỤC 2

### CÁC VỊ THUỐC TRONG VIÊN NANG CỨNG TD0070

#### 1. Sài hồ [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** Radix Bupleuri chinensis

**Bộ phận dùng:** Rễ đã được phơi khô hoặc sấy khô của cây sài hồ Bupleurum sinense DC. Và một số cây khác cùng chi cùng họ. Rễ Sài hồ (Radix Bupleuri).



**Hoạt chất:** saponin, bupleurumola, chất béo, phytosteron, ít tinh dầu.

**Tác dụng dược lý:** Tác dụng hạ nhiệt, an thần, giảm đau, giảm ho rõ rệt. Bảo vệ gan và lợi mật. Hạ mỡ trong máu. Tác dụng tăng cường thể dịch miễn dịch và miễn dịch tế bào. Tăng khả năng tổng hợp protein của chuột. Ức chế liên cầu khuẩn tan huyết, phẩy khuẩn tả, trực khuẩn lao, leptospira, virus cúm. Kháng virus viêm gan, ký sinh trùng sốt rét.

**Tính vị, quy kinh:** Đắng, hơi hàn. Vào các Can, Đờm, Tâm bào, Tam tiêu.

**Tác dụng:** Phát biểu, hoà lý, thoái nhiệt, giải uất, điều kinh.

**Ứng dụng lâm sàng:** Bệnh thiếu dương, hàn nhiệt vãng lai, tai ù, hoa mắt, đầu vầng non mưa, sốt rét, kinh nguyệt không đều.

**Liều lượng:** Ngày dùng 12g đến 30 g, dạng thuốc sắc hay thuốc bột.

#### 2. Tiên hồ [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** Radix Peucedani

**Bộ phận dùng:** Rễ đã phơi hay sấy khô của cây Tiên hồ (Peucedanum decursivum Maxim), hoặc cây Tiên hồ hoa trắng (Peucedanum praeruptomm Dunn.), họ Hoa tán (Apiaceae).



**Hoạt chất:** Nodakenin, nodakenetin, decusin, tannin, tinh dầu, spongosterola, manitol, pyranocoumarin...

**Tác dụng dược lý:** giảm viêm, tăng tiết trong đường hô hấp. Ức chế co cơ trơn. Ức chế ngưng tập tiểu cầu. Tăng lưu lượng máu của động mạch vành.

**Tính vị, quy kinh:** Đắng, cay, hơi hàn. Vào các kinh Phế, Tỳ.

**Tác dụng:** Tuyên tán phong nhiệt, hạ khí chỉ ho, tiêu đờm.

**Ứng dụng lâm sàng:** Phong nhiệt sinh ho, đờm đặc, suyễn tức.

**Liều lượng:** Ngày dùng từ 9 g đến 15 g. Dạng thuốc sắc

### 3. Xuyên khung [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** *Rhizoma Ligustici wallichii*

**Bộ phận dùng:** Thân rễ đã phơi hay sấy khô của cây Xuyên khung (*Ligusticum chuanxiong* Hort.), Họ Hoa tán (*Apiaceae*).



**Hoạt chất:** Tinh dầu, dầu béo, acid ferulic, adenosin, adenin.

**Tác dụng dược lý:** Ức chế co bóp tử cung. Chống loạn nhịp, gây giãn động mạch vành. Ức chế kết tập tiểu cầu. Tăng lưu lượng máu mạch vành.

**Tính vị quy kinh:** Vị cay, tính ấm. Quy vào kinh can, đờm, tâm bào.

**Tác dụng:** Hành khí, hoạt huyết, khu phong chỉ thống.

**Ứng dụng lâm sàng:** Hoạt huyết điều kinh: chữa kinh nguyệt không đều, bế kinh, thống kinh rau thai không xuống. Chữa nhức đầu, đau mình, đau các khớp do phong thấp. Giải uất chữa chứng can khí uất kết, đau mạng sườn, tình chí uất kết. Tiêu viêm chữa mụn nhọt. Bổ huyết: phối hợp với một số vị khác để bổ huyết dùng trong các trường hợp huyết hư.

**Liều lượng:** 6g - 12g/ ngày.



#### 4. Chỉ xác [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** *Fructus Aurantii*

**Bộ phận dùng:** quả chưa chín hoặc gần chín đã bỏ đôi để làm thuốc, phơi hay sấy khô của cây họ Cam chua (Rutaceae)



**Hoạt chất:** Naringin, methylhesperdin.

**Tác dụng dược lý:** làm giảm trương lực cơ trơn của ruột và chống co thắt, vừa có thể hưng phấn làm tăng nhu động ruột, do trạng thái chức năng cơ thể, nồng độ thuốc và sức vật thực nghiệm khác nhau mà có tác dụng cả hai mặt ngược nhau.

**Tính vị quy kinh:** Vị đắng, chua, hơi hàn. Quy vào kinh tỳ, vị.

**Tác dụng:** Phá khí, tiêu tích, hoá đờm, trừ bí, lợi cách, khoan hung.

**Ứng dụng lâm sàng:** giúp sự tiêu hóa, trừ đờm, táo thấp, lợi tiểu tiện, ra mồ hôi, yên dạ dày, ruột..

**Liều lượng:** 6g - 12g/ ngày. Dạng thuốc sắc. Thường phối hợp với các vị thuốc khác.

#### 5. Khương hoạt [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** *Rhizoma et Radix Notopterygii*

**Bộ phận dùng:** Thân rễ và rễ đã phơi khô của cây Khương hoạt (*Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang) hoặc Khương hoạt lá rộng (*Notopterygium forbesii* Boiss.), họ Hoa tán (*Apiaceae*).



**Hoạt chất:** Coumarin, ester.

**Tác dụng dược lý:** Hạ sốt, giảm đau. Chống loạn nhịp tim. Đối kháng với cơ tim thiếu máu cấp. Chống choáng. Kháng khuẩn. Chống viêm, chống dị ứng.

**Tính vị, quy kinh:** Vị cay, đắng, tính ấm. Quy vào kinh bàng quang, thận.

**Tác dụng:** Phát tán phong hàn, phong thấp, chỉ thống.

**Ứng dụng lâm sàng:** Chữa viêm khớp mạn, đau dây thần kinh, đau các cơ do lạnh, cảm lạnh gây đau nhức các khớp, sốt, đau đầu do phong hàn thấp xâm phạm. Dùng kết hợp với phòng phong, xuyên khung, thương truật... để khu phong, trừ hàn, chỉ thống.

**Liều lượng:** 4g - 8g/ ngày.

## 6. Độc hoạt [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** *Radix Angelicae pubescentis*

**Bộ phận dùng:** rễ phơi hay sấy khô của cây Độc hoạt (*Angelica pubescens*), thuộc họ Hoa tán (*Apiaceae*)

**Hoạt chất:** Ostol, bergapten, angelon và angelical.

**Tác dụng dược lý:** Giảm đau. An thần. Kháng viêm. Chống co thắt. Chống lão hoá.

**Tính vị, quy kinh:** Vị cay, tính ôn. Quy vào kinh thận, can.

**Tác dụng:** Khu phong hàn, trừ thấp, thông tý, chỉ thống, giảm đau.

**Ứng dụng lâm sàng:** dùng trị phong thấp, đau khớp, trúng phong co quắp, lưng gối đau mỏi, chân tay tê cứng, chữa cảm gió, đau đầu, đau răng.

**Liều lượng:** 3g - 6g/ ngày. Dùng dạng sắc, thường kết hợp với các vị thuốc khác.

## 7. Phục linh [6] [18] [20]

**Tên khoa học :** *Poria*

**Bộ phận dùng :** thể quả nấm đã phơi hay sấy khô của nấm Phục linh (*Poria*), thuộc họ Nấm lỗ (*Polyporaceae*), mọc ký sinh trên rễ một số loài thông.



**Hoạt chất:** polysaccharide, triterpenes, steroid, axit amin, choline, histidine và muối kali.

**Tác dụng dược lý :** Chống viêm. Điều hoà miễn dịch. Chống ung thư. Hạ đường huyết. chống thải ghép, chống ký sinh trùng, chống virus viêm gan B.

**Tính vị, quy kinh:** Vị ngọt, nhạt, tính bình. Quy vào kinh Tâm, tỳ, thận.

**Tác dụng :** Lợi thủy, thâm thấp, kiện tỳ, định tâm.

**Ứng dụng lâm sàng :** Tỳ khí hư nhược, bí tiểu, đái buốt, đàm ẩm, tiêu chảy, nhịp tim nhanh, tim yếu, mất ngủ, hồi hộp, phù nề, viêm bàng quang, chướng bụng.

**Liều lượng:** 5g – 10g. Dạng thuốc sắc, bột , viên.

## 8. Cát cánh [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** Radix Platycodi grandiflori

**Bộ phận dùng:** Rễ đã phơi hay sấy khô của cây Cát cánh (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.), họ Hoa chuông (*Campanulaceae*).

**Hoạt chất:** Saponin, flavonoid, acid phenol, polyacetylen, sterol, acid béo, amino acid.



**Tác dụng dược lý:** Trừ đờm, giảm ho. Chống viêm. Giảm đau, hạ sốt. Hạ đường huyết và cholesterol.

**Tính vị, quy kinh:** Đắng, cay, vi ôn. Vào kinh Phế.

**Tác dụng:** Tuyên phế khí, tán phong hàn, tán ho, trừ đờm.

**Ứng dụng lâm sàng:** dùng chữa ngoại cảm sinh ho, cổ họng sưng đau, ngực đầy trướng đau, ho ra máu, mủ

**Liều lượng:** Ngày dùng từ 3g đến 9g. Dạng sắc uống. Thường phối hợp với một số vị thuốc khác.

## 9. Đảng sâm [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** Radix Codonopsis pilosulae

**Bộ phận dùng:** Rễ phơi hoặc sấy khô của cây Đảng sâm [Codonopsis pilosula (Franch.) Nannf., Codonopsis pilosula (Franch.) Nannf. var. modesta (Nannf.) L. T. Shen hoặc Codonopsis tanashen Oliv.], họ Hoa chuông (Campanulaceae).



**Hoạt chất:** polyacetylen, alkaloids, phenylpropanoids, triterpenoids và polysacarit...

**Tác dụng dược lý :** Tác dụng cải thiện trí nhớ. Tăng cường chức năng cho vùng dưới đồi, tuyến yên và tuyến thượng thận. Tăng trương lực cơ, tăng lưu lượng máu mạch vành, cải thiện cung lượng oxy cho cơ tim, não và các chi của cơ thể. Điều hoà hệ tiêu hoá. Ức chế khối u. Hạ đường huyết. Chống lão hoá.

**Tính vị, quy kinh:** vị ngọt, tính bình. Quy vào kinh phế, tỳ.

**Tác dụng:** Bổ trung ích khí, sinh tân, chỉ khát.

**Ứng dụng lâm sàng:** dùng chữa tỳ hư, ăn không tiêu, chân tay yếu mỏi, phế hư sinh ho, phiền khát.

**Liều lượng:** Ngày dùng từ 6 g đến 12 g, có thể tăng tới 30g. Dạng thuốc sắc.

## 10. Cam thảo [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** Radix Glycyrrhizae

**Bộ phận dùng:** Rễ và thân rễ phơi hay sấy khô của cây Cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.; hoặc *G. inflata* Bat.; hoặc *G. glabra* L.) họ Đậu (*Fabaceae*).

**Hoạt chất:** Glycyrrhiza, flavonoid, oestrogen.



**Tác dụng dược lý:** Ức chế thần kinh trung ương. Giảm ho. Giảm co thắt cơ trơn. Chữa loét tiêu hóa, ức chế tăng tiết dịch vị của histamin. Bảo vệ gan, tăng tiết mật. Chống viêm gan, chống dị ứng. Chữa bệnh addison. Giải độc trên tim. Lợi tiểu, chữa táo bón. Gây phù khi dùng thời gian dài

**Tính vị quy kinh:** Vị ngọt, tính bình. Quy vào 12 kinh.

**Tác dụng:** Bổ trung khí, dưỡng huyết nhuận phế chỉ ho, thanh nhiệt giải độc, hoà hoãn giảm đau.

**Ứng dụng lâm sàng:** Ích khí, dưỡng huyết, nhuận phế, chỉ ho. Tả hoả, giải độc: dùng trong bệnh mụn nhọt đĩnh độc sưng đau. Hoãn cấp, chỉ thống: trị đau dạ dày, loét đường tiêu hoá, đau bụng, gân mạch co rút kết hợp với bạch thực. Điều vị, giảm tác dụng phụ và dẫn thuốc khi dùng phối hợp.

**Liều lượng:** 4g - 10g/ ngày.

## 11. Sinh khương [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** *Rhizoma Zingiberis*

**Bộ phận dùng:** Thân rễ của cây gừng tươi, thuộc họ Gừng (Zingiberaceae).

**Hoạt chất:** hydrocarbon sesquiterpenic chất nhựa dầu, chất béo, tinh bột và các chất cay như zingeron, zingerola và shogaola.



**Tác dụng dược lý:** Ức chế thần kinh trung ương. Hạ nhiệt. Giảm đau, giảm ho. Chống co thắt. Chống nôn. Kích thích vận chuyển đường tiêu hoá. Chống viêm.

**Tính vị quy kinh:** vị cay, tính ấm. Vào các kinh phế, tỳ, vị

**Tác dụng:** phát biểu trừ hàn, ôn ấm, làm hết nôn, tiêu đờm, hành thủy giải độc.

**Ứng dụng lâm sàng:** dùng để chữa bụng đầy trướng, nôn mửa, ho có đờm; giải độc bán hạ, nam tinh, cua cá.



**Liều lượng:** Dùng với liều 3 – 6 g dưới dạng thuốc sắc hay thuốc pha rượu gừng tươi (mỗi ngày dùng 2 – 5 ml).

## 12. Bạc hà [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** Herba Menthae

**Bộ phận dùng:** Toàn phần trên đem sấy khô hoặc phơi trong bóng râm của cây Bạc hà (Herba Menthae), họ Hoa môi (Labiatae).

**Hoạt chất:** Menthol, Menthone, Menthyl Acetate, Camphene, Limonene, Menthene, Rosmarinic acid...



**Tác dụng dược lý:** Sát khuẩn mạnh, điều trị cảm cúm. Chống co thắt cơ trơn. Giảm đau. Ức chế hô hấp, tuần hoàn, thần kinh trung ương. Tác động đến nhiệt độ cơ thể.

**Tính vị, quy kinh:** vị cay, tính mát. Quy vào kinh phế, can.

**Tác dụng:** Làm ra mồ hôi, điều trị bệnh sợ nóng, sốt cao do cảm cúm, cảm lạnh, nhức đầu, chóng mặt, đau họng, thư giãn, long đờm, kích thích tiêu hóa...

**Liều lượng:** Dùng ngày 4g – 8g. Dạng thuốc sắc.

## 13. Quế chi [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** *Ramulus Cinnamomi*

**Bộ phận dùng:** Vỏ thân, vỏ cành nhỏ hoặc non được phơi sấy khô của cây Quế.

**Hoạt chất:** aldehyd cinnamic, cinnamil acetate, phenylpropyl acetate, trans-acid cinnamic, coumarin, acid protocatechic...



**Tác dụng dược lý:** kích thích tiêu hóa, trợ hô hấp và tuần hoàn, tăng sự bài tiết, co mạch, tăng nhu động ruột và co bóp tử cung, chống khối u, chống xơ vữa động mạch vành, chống oxy hóa. Tinh dầu có chất sát trùng mạnh.

**Tính vị, quy kinh:** Đắng, cam, tính âm. Quy kinh tâm, phế, bàng quang.

**Tác dụng:** hoạt huyết, trừ hàn, chỉ thống thông kinh, lợi tiểu, tăng tiết mồ hôi, làm giảm hội chứng ngoại sinh.

**Ứng dụng lâm sàng:** cấp cứu bệnh do hàn như chân tay lạnh, mạch chậm nhỏ, hôn mê, đau bụng trướng thực, phong tê bại, tả lỵ, thũng do tiểu tiện bất lợi, kinh bế, rắn cắn, ung thư.

**Liều lượng:** Ngày dùng từ 1 g đến 4 g. Dạng thuốc sắc.

#### 14. Đại diệp đẳng [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** *Tinomisium tonkinense*

**Bộ phận dùng:** Gốc, thân, lá phơi hoặc sấy khô của cây Đại diệp đẳng, Thuộc họ Tiết dê (Menispermaceae).

**Tính vị, quy kinh:** Cay, đắng, tính hàn.

**Tác dụng:** hoạt huyết thông lạc, tán ú chỉ thống, cường gân cốt.

**Ứng dụng lâm sàng:** Đau do phong thấp tí, di chứng bại liệt trẻ con, đau họng đau, nhũ nga, viêm kết mạc, vàng da, viêm thể hạch cấp tính; dùng ngoài trị bong gân, gãy xương, trật khớp. Lá dùng ngoài thì tán bột hòa rượu đắp lên chỗ bong gân trật khớp, vết thương do dao kiếm. Gốc rễ tươi đã nát lấy nước trị đau mắt đỏ, tim đập nhanh.

**Liều lượng:** Ngày dùng từ 9 g đến 15 g. Dạng thuốc sắc.



## 15. Cách lông vàng [6] [18] [20]

**Tên khoa học:** *Premna fulva*

**Bộ phận dùng:** Thân của cây Cách lông vàng (*Premna fulva* Craib) thuộc họ Cỏ roi ngựa (Verbenaceae).

**Hoạt chất:** Phenol, acid phenolic, diterpen, Beta-sitosterol, tanin, vitamin E.

**Tính vị quy kinh:** Nhạt, hơi chát, tính bình. Vào các kinh

**Tác dụng:** Hoạt huyết tán ứ, mạnh gân cốt, khu phong giảm đau.

**Ứng dụng lâm sàng:** trị viêm xương cột sống phì đại, đau nhức khớp do phong thấp, tổn thương lưng cơ, đòn đánh nội thương, viêm quanh vai, đau dây thần kinh tọa.

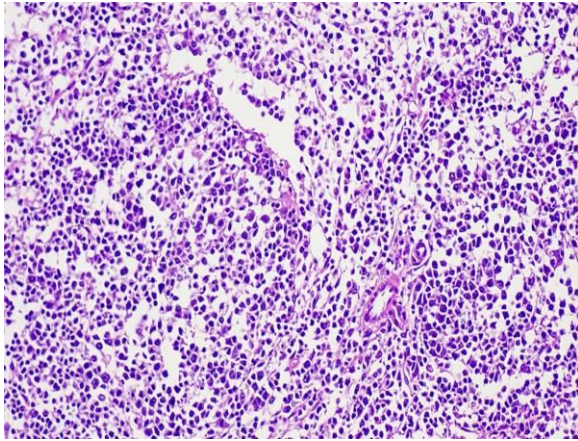
**Liều lượng:** Ngày dùng từ 30 g đến 60





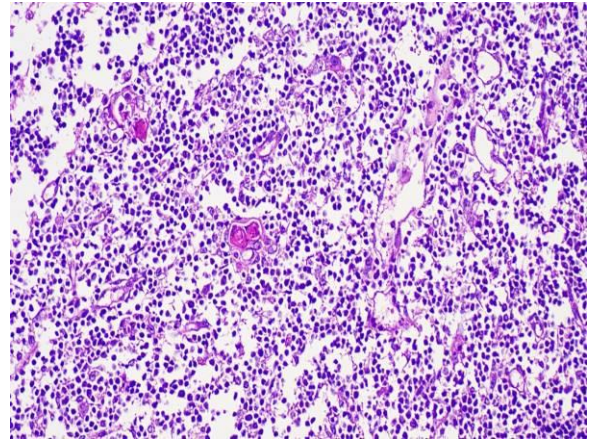
### PHỤ LỤC 3

## KẾT QUẢ GIẢI PHẪU BỆNH LÁCH VÀ TUYẾN ỨC CỦA CHUỘT



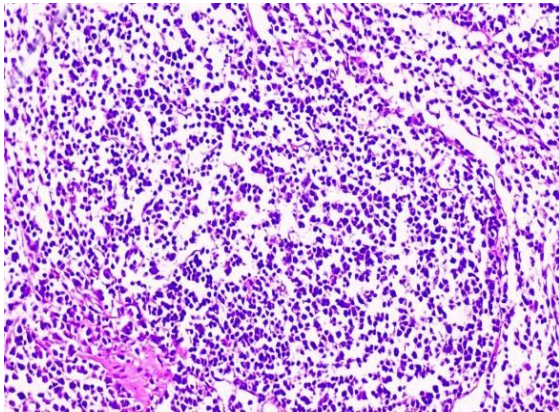
**Ảnh 1:** Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng sinh học (chuột số 1)  
(HE × 20)

*Lách bình thường, rõ tủy đỏ và tủy trắng, giàu lympho bào trưởng thành*



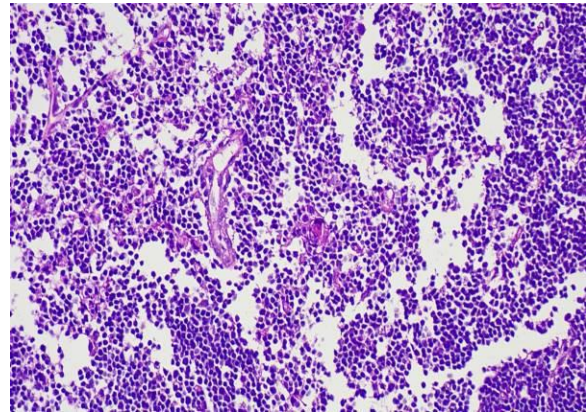
**Ảnh 2:** Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô chứng sinh học (chuột số 1)  
(HE × 20)

*Tuyến ức bình thường, rõ cấu trúc vùng vỏ và vùng tủy, giàu lympho bào trưởng thành*



**Ảnh 3:** Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng sinh học (chuột số 3)  
(HE × 20)

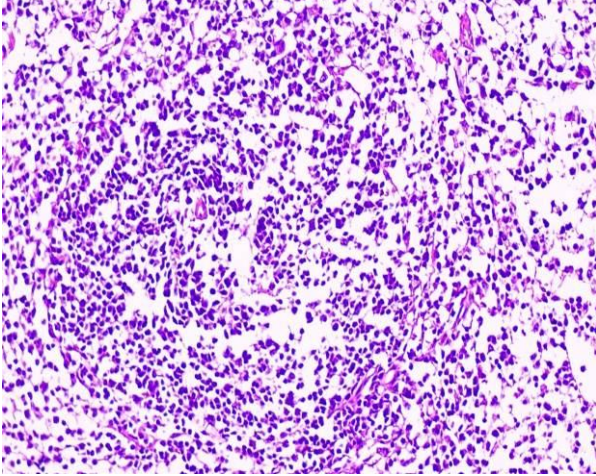
*Lách bình thường, rõ tủy đỏ và tủy trắng, giàu lympho bào trưởng thành*



**Ảnh 4:** Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô chứng sinh học (chuột số 3)  
(HE × 20)

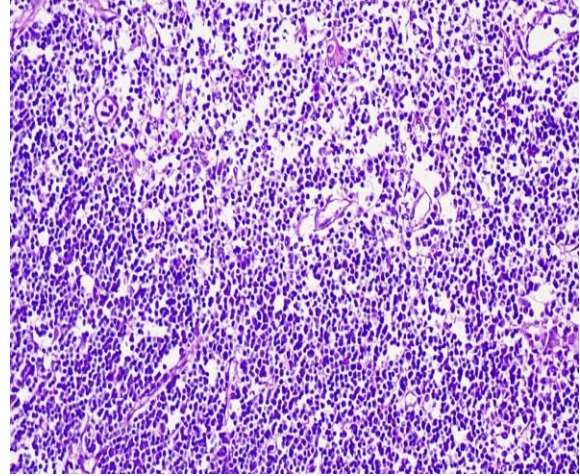
*Tuyến ức bình thường, rõ cấu trúc vùng vỏ và vùng tủy, giàu lympho bào trưởng thành*





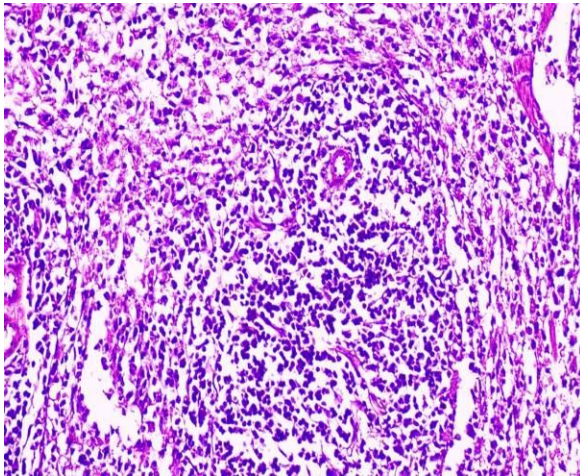
**Ảnh 5:** Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng sinh học (chuột số 7)  
(HE × 20)

*Lách bình thường, rõ tủy đỏ và tủy trắng, giàu lympho bào trưởng thành*



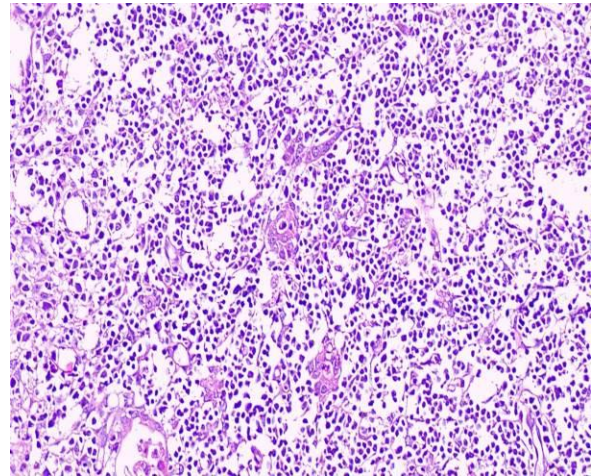
**Ảnh 6:** Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô chứng sinh học (chuột số 7)  
(HE × 20)

*Tuyến ức bình thường, rõ cấu trúc vùng vỏ và vùng tủy, giàu lympho bào trưởng thành*



**Ảnh 7:** Hình ảnh vi thể lách chuột lô mô hình (chuột số 16)  
(HE × 20)

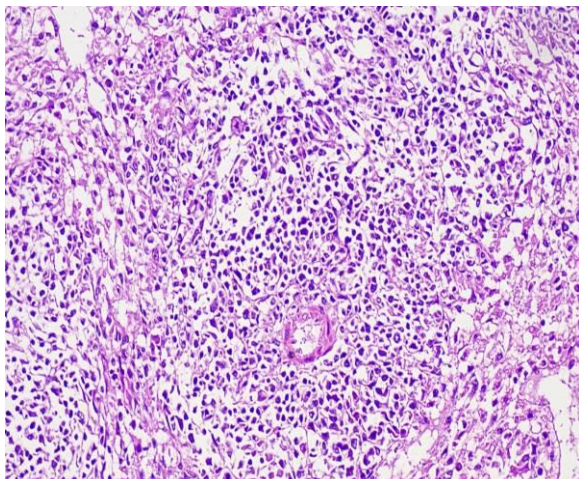
*Số lượng lympho bào giảm mạnh so với lô chứng sinh học*



**Ảnh 8:** Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô mô hình (chuột số 16)  
(HE × 20)

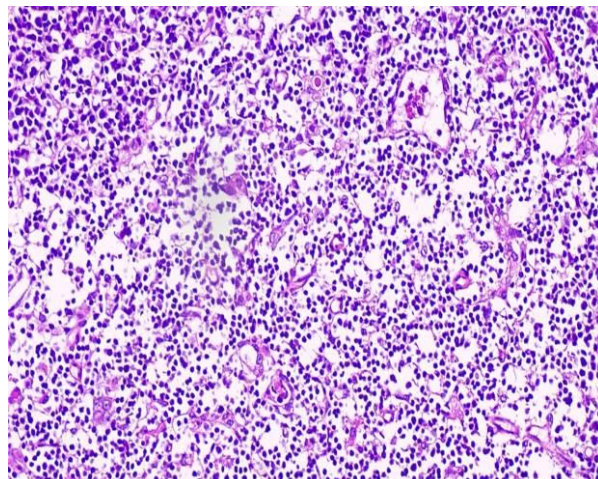
*Số lượng lympho bào của tuyến ức giảm mạnh so với lô chứng sinh học*





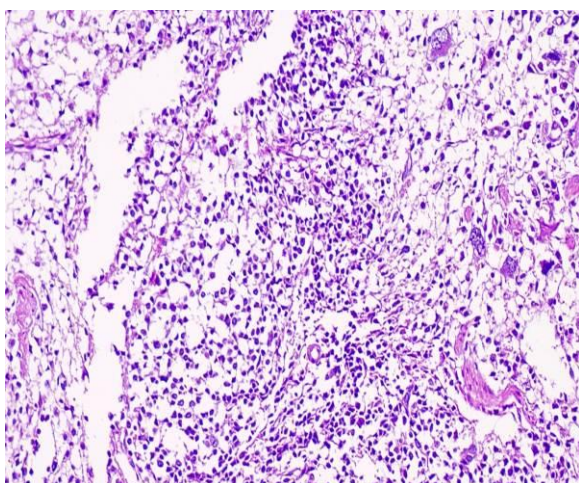
**Ảnh 9:** Hình ảnh vi thể lách chuột  
lô mô hình (chuột số 17)  
(HE × 20)

*Số lượng lympho bào của tủy trắng  
giảm mạnh*



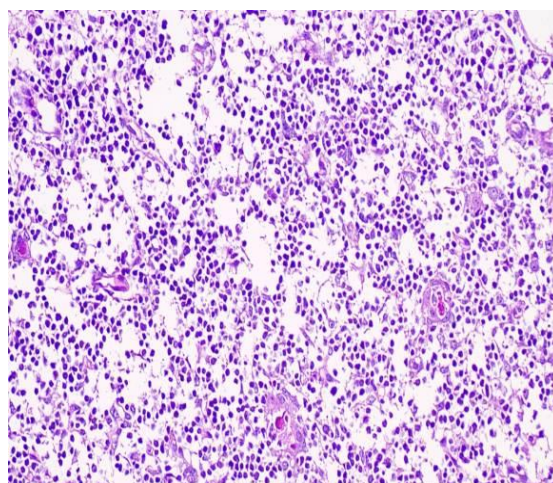
**Ảnh 10:** Hình ảnh vi thể tuyến ức  
chuột lô mô hình (chuột số 17)  
(HE × 20)

*Số lượng lympho bào của tuyến ức  
giảm nhẹ*



**Ảnh 11:** Hình ảnh vi thể lách chuột  
lô mô hình (chuột số 18)  
(HE × 20)

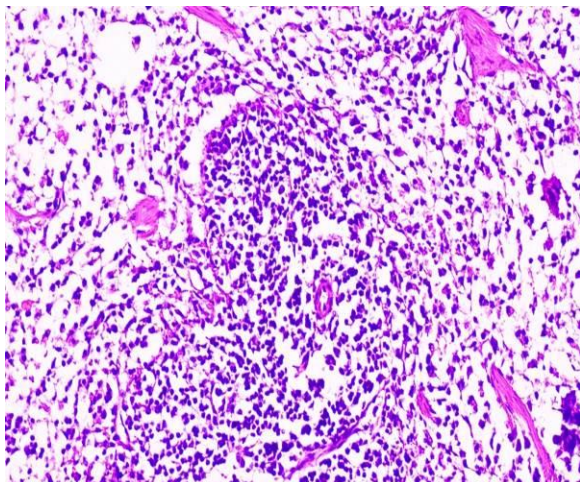
*Số lượng lympho bào của tủy trắng  
giảm mạnh*



**Ảnh 12:** Hình ảnh vi thể tuyến ức  
chuột lô mô hình (chuột số 18)  
(HE × 20)

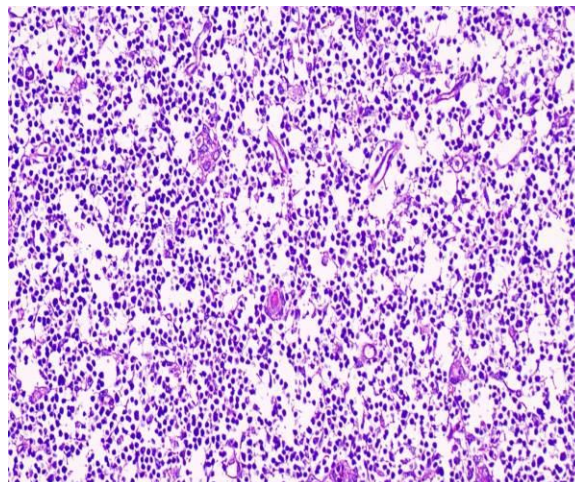
*Số lượng lympho bào của tuyến ức  
giảm mạnh*





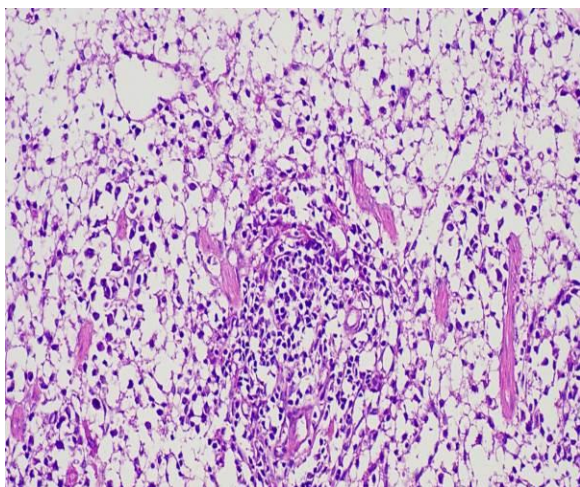
**Ảnh 13:** Hình ảnh vi thể lách chuột  
lô uống levamisol (chuột số 23)  
(HE × 20)

*Số lượng lympho bào của tủy trắng  
tăng nhẹ so với mô hình*



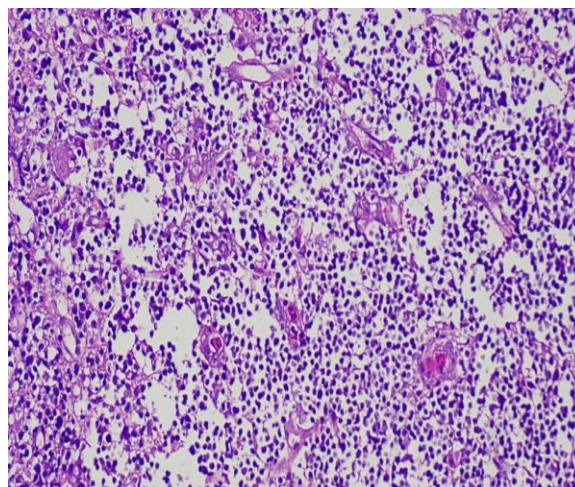
**Ảnh 14:** Hình ảnh vi thể tuyến ức  
chuột lô uống levamisol  
(chuột số 23) (HE × 23)

*Số lượng lympho bào của tuyến ức  
tăng nhẹ so với mô hình*



**Ảnh 15:** Hình ảnh vi thể lách chuột  
lô uống levamisol (chuột số 24)  
(HE × 20)

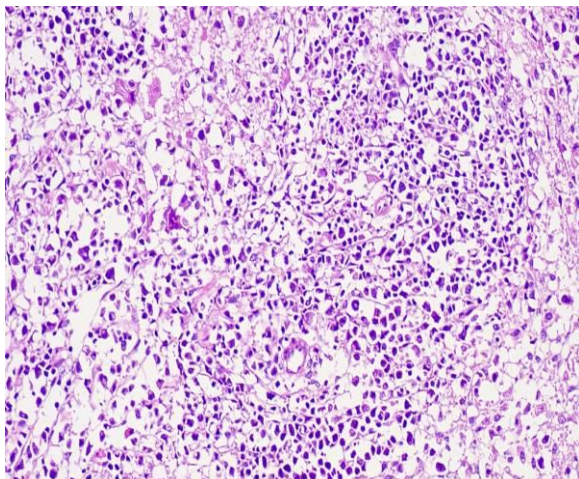
*Số lượng lympho bào không thay đổi  
nhiều so với mô hình*



**Ảnh 16:** Hình ảnh vi thể tuyến ức  
chuột lô uống levamisol  
(chuột số 24) (HE × 20)

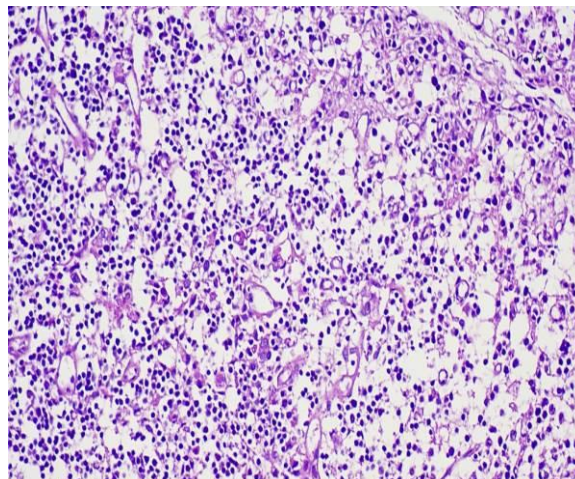
*Số lượng lympho bào của tuyến ức  
tăng mức độ vừa so với mô hình*





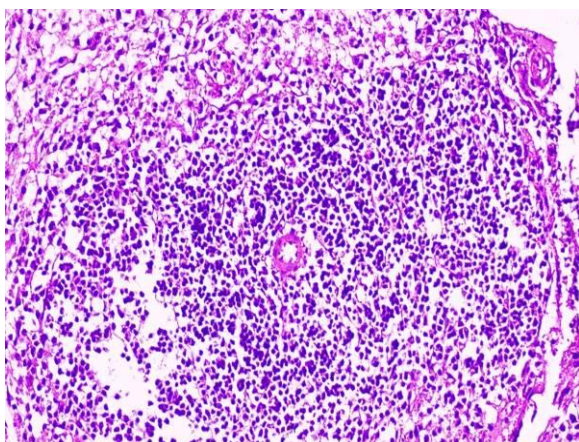
**Ảnh 17:** Hình ảnh vi thể lách chuột  
lô uống levamisol  
(chuột số 31)(HE × 20)

*Số lượng lympho bào không thay đổi  
nhiều so với mô hình*



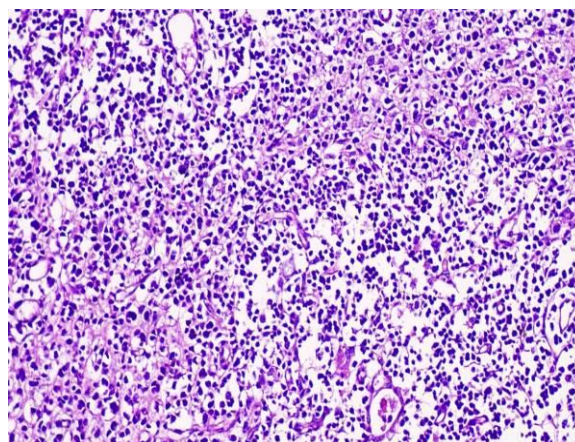
**Ảnh 18:** Hình ảnh vi thể tuyến ức  
chuột lô uống levamisol  
(chuột số 31)(HE × 20)

*Số lượng lympho bào tăng mức độ  
vừa so với mô hình*



**Ảnh 19:** Hình ảnh vi thể lách chuột  
lô uống TD0070 liều  
2,16 viên/kg (chuột số 44) (HE × 20)

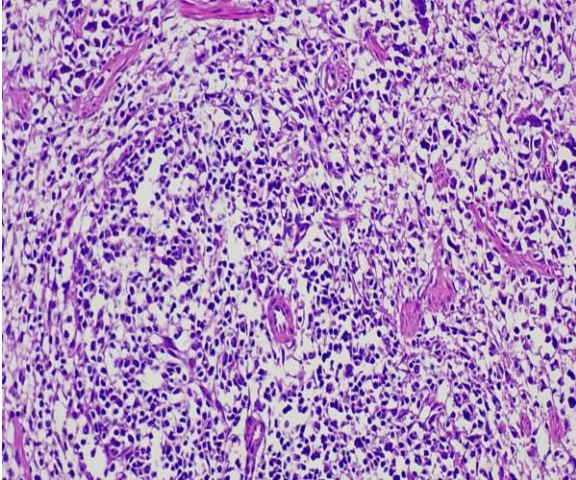
*Số lượng lympho bào của tủy trắng  
tăng mức độ nhẹ so với mô hình*



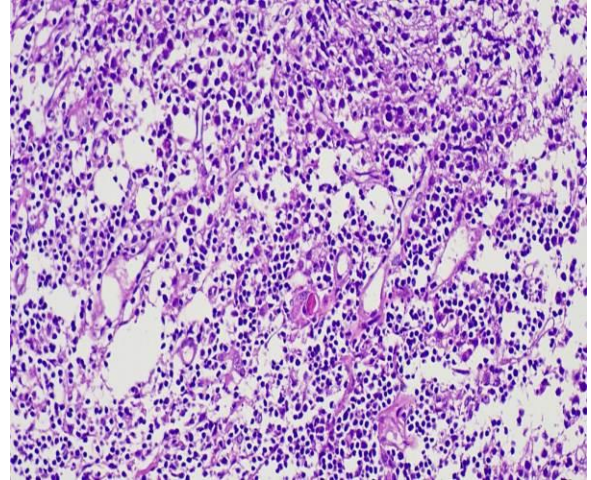
**Ảnh 20:** Hình ảnh vi thể tuyến ức  
chuột lô uống TD0070 liều 2,16  
viên/kg (chuột số 44) (HE × 20)

*Số lượng lympho bào tăng mức độ  
nhẹ so với mô hình*

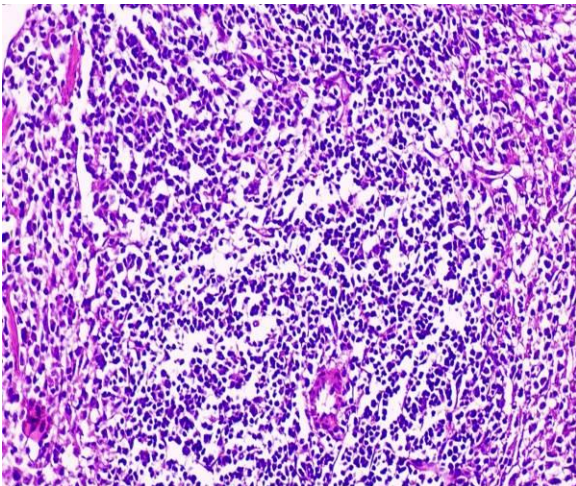




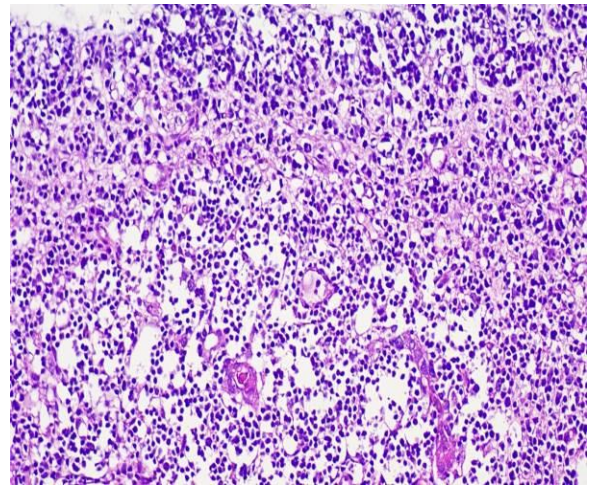
**Ảnh 21:** Hình ảnh vi thể lách chuột  
lô uống TD0070 liều  
2,16 viên/kg (chuột số 47) (HE × 20)  
*Số lượng lympho bào tăng mức độ  
nhẹ so với mô hình*



**Ảnh 22:** Hình ảnh vi thể tuyến ức  
chuột lô uống TD0070 liều  
2,16 viên/kg (chuột số 47) (HE × 20)  
*Số lượng lympho bào tăng mức độ  
nhẹ so với mô hình*

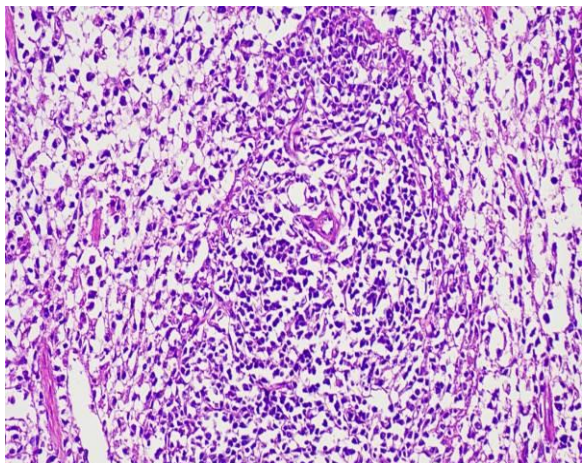


**Ảnh 23:** Hình ảnh vi thể lách chuột  
lô uống TD0070 liều  
2,16 viên/kg (chuột số 49) (HE × 20)  
*Số lượng lympho bào của tủy trắng  
tăng mức độ nhẹ so với mô hình*



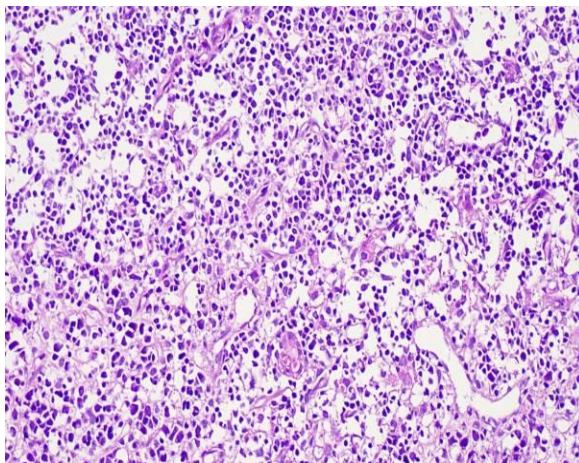
**Ảnh 24:** Hình ảnh vi thể tuyến ức  
chuột lô uống TD0070 liều  
2,16 viên/kg (chuột số 49) (HE × 20)  
*Số lượng lympho bào tăng mức độ  
nhẹ so với mô hình*





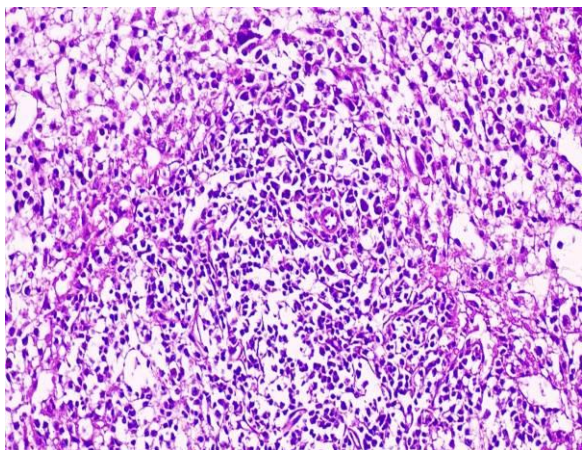
**Ảnh 25:** Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống TD0070 liều 4,32 viên/kg (chuột số 33) (HE × 20)

*Số lượng lympho bào tăng nhẹ so với mô hình*



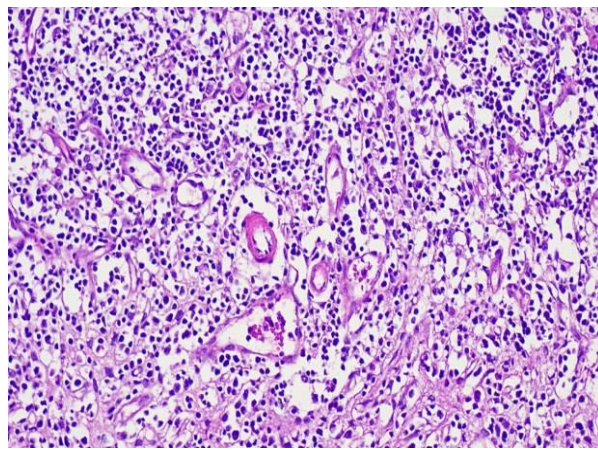
**Ảnh 26:** Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống TD0070 liều 4,32 viên/kg (chuột số 33) (HE × 20)

*Số lượng lympho bào tăng mức độ nhẹ đến vừa so với mô hình*



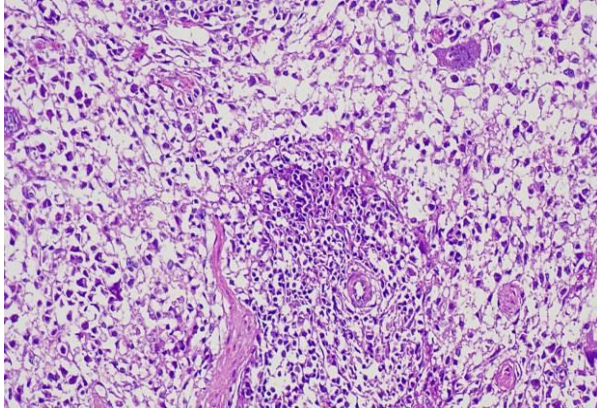
**Ảnh 27:** Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống TD0070 liều 4,32 viên/kg (chuột số 34) (HE × 20)

*Số lượng lympho bào thay đổi không đáng kể so với mô hình*

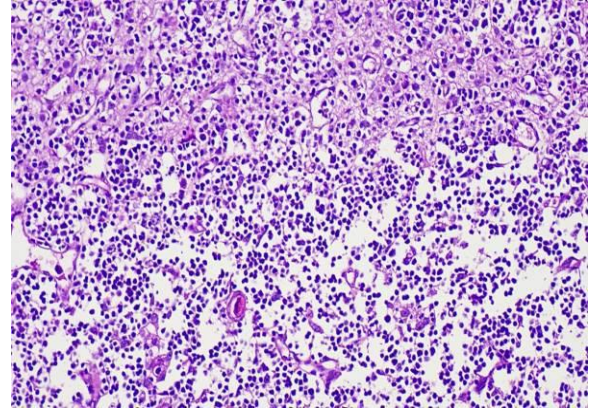


**Ảnh 28:** Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống TD0070 liều 4,32 viên/kg (chuột số 34) (HE × 20)

*Số lượng lympho bào thay đổi không đáng kể so với mô hình*



**Ảnh 29:** Hình ảnh vi thể lách chuột  
lô uống TD0070 liều  
4,32 viên/kg (chuột số 35)(HE × 20)  
*Số lượng lympho bào của tủy trắng  
tăng mức độ nhẹ so với mô hình*



**Ảnh 30:** Hình ảnh vi thể tuyến ức  
chuột lô uống TD0070 liều  
4,32 viên/kg (chuột số 35)(HE × 20)  
*Số lượng lympho bào thay đổi không  
đáng kể so với mô hình*



**PHỤ LỤC 4**  
**NHẬT KÝ NGHIÊN CỨU**

<b>STT</b>	<b>Các bước tiến hành</b>	<b>Thời gian</b>
<b>1</b>	Lên ý tưởng, thu thập tài liệu, viết đề cương	Tháng 1- 4/2023
<b>2</b>	Thông qua đề cương luận văn	Tháng 4/2023
<b>3</b>	Nghiên cứu độc tính cấp của viên nang cứng TD0070	Tháng 5/2023 - 10/2023
<b>4</b>	Nghiên cứu tác dụng điều biến miễn dịch của viên nang cứng TD0070	
<b>5</b>	Xử lý số liệu, hoàn thiện luận văn	Tháng 11/2023
<b>6</b>	Bảo vệ luận văn	Tháng 1/2023

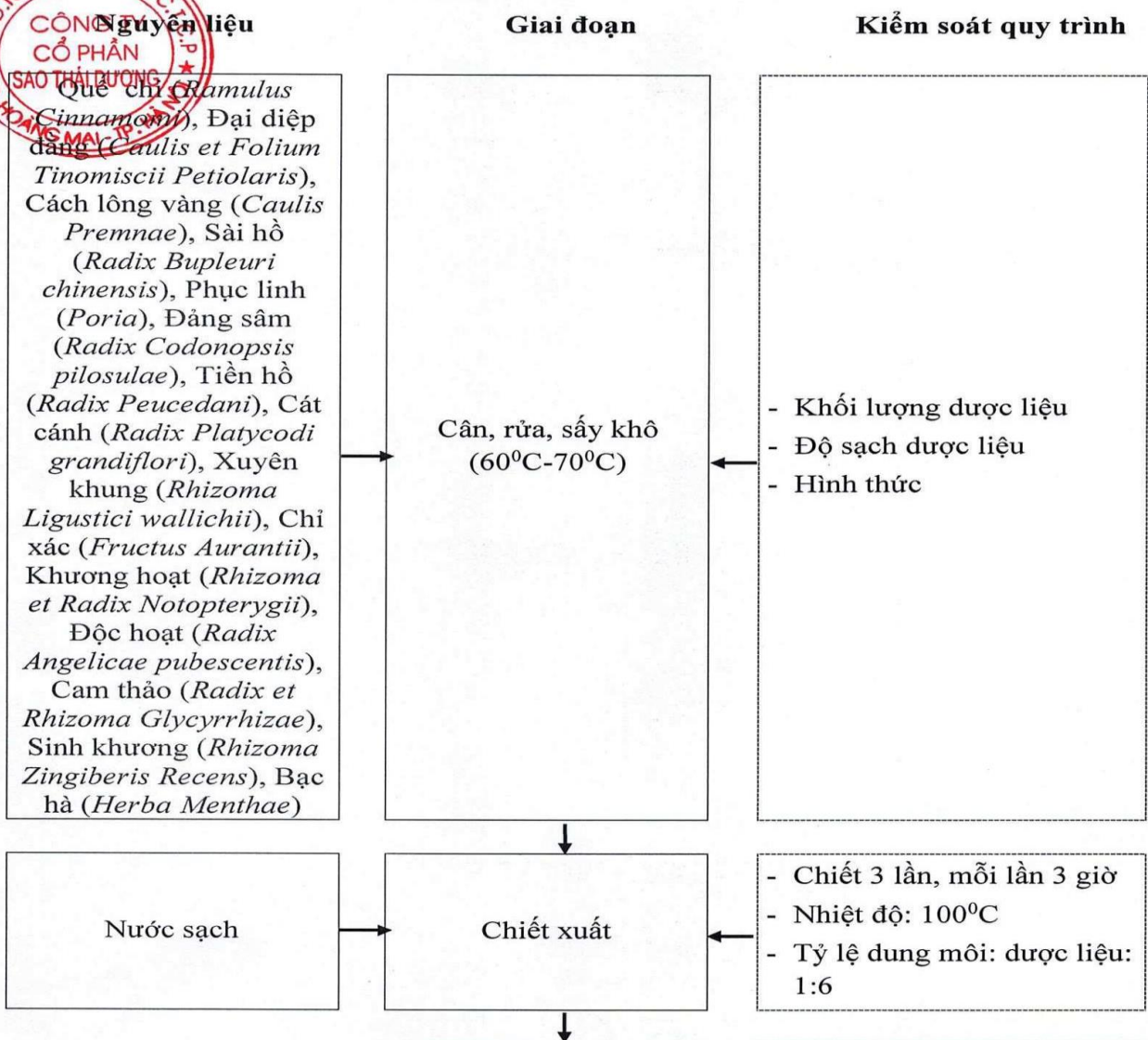
# PHỤ LỤC 5

## QUY TRÌNH SẢN XUẤT VÀ TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CỦA VIÊN NANG CỨNG TD0070



CÔNG TY CỔ PHẦN SAO THÁI DƯƠNG  
Lô CCI-III.13.4 thuộc dự án KĐT mới Pháp Vân – Tứ Hiệp, phường Hoàng Liệt, quận Hoàng Mai, thành phố Hà Nội, Việt Nam  
Số điện thoại: +84 916 451 269 Fax: +84 916 451 269

### QUY TRÌNH SẢN XUẤT TD0070

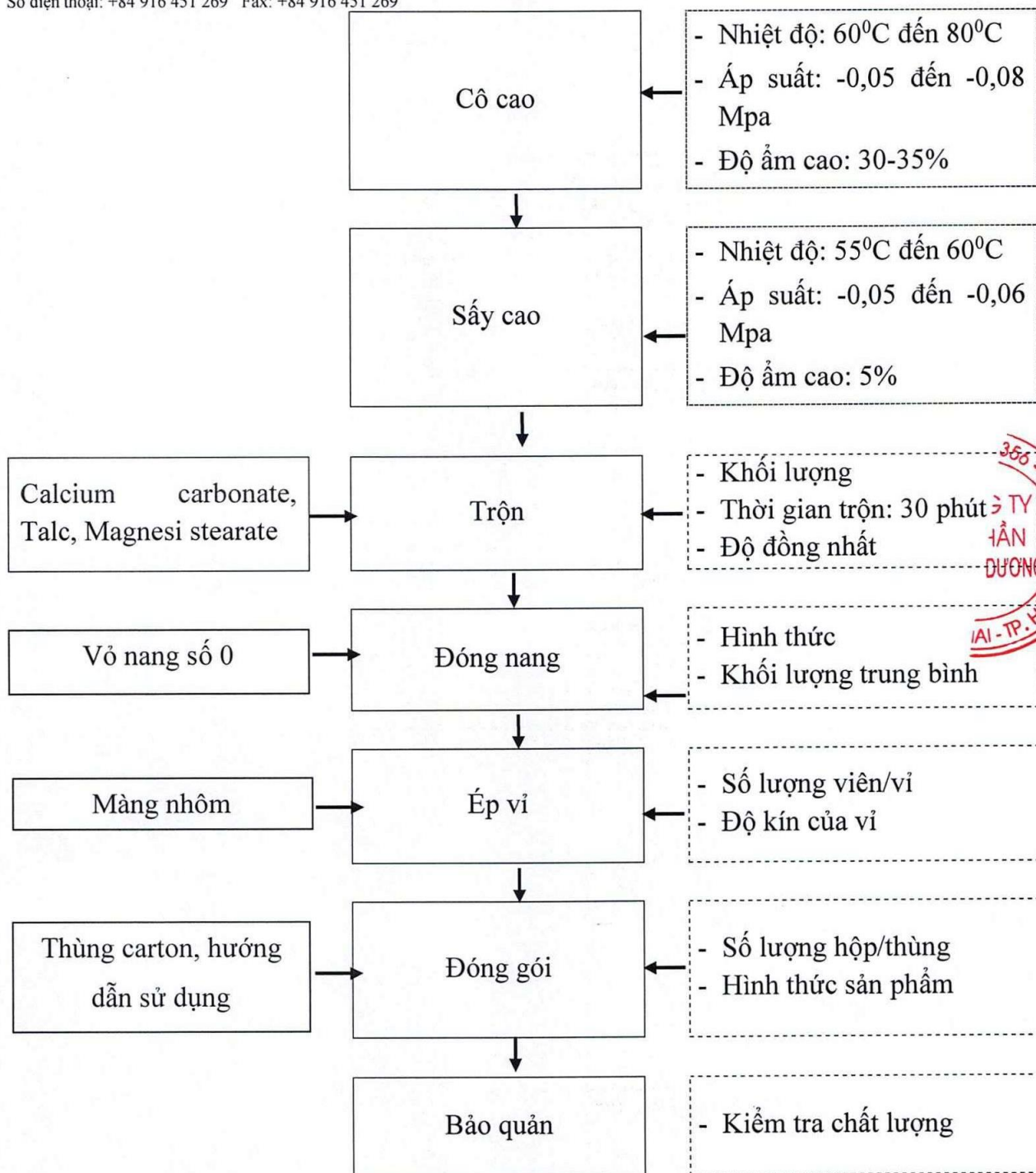




CÔNG TY CỔ PHẦN SAO THÁI DƯƠNG

Lô CC1-III.13.4 thuộc dự án KĐT mới Pháp Vân – Tứ Hiệp, phường Hoàng Liệt, quận Hoàng Mai, thành phố Hà Nội, Việt Nam

Số điện thoại: +84 916 451 269 Fax: +84 916 451 269





TIÊU CHUẨN CƠ SỞ		
CÔNG TY CP SAO THÁI DƯƠNG	Viên nang cứng	Số tiêu chuẩn: 46/TCCS/TPT-21
	TD0070	Có hiệu lực từ kể từ ngày ký

## I. YÊU CẦU KỸ THUẬT

### 1.1. Công thức bào chế cho một đơn vị đóng gói nhỏ nhất (1 viên nang cứng):

TT	Nguyên liệu	Khối lượng
1	Cao khô hỗn hợp dược liệu (trung đương Quế chi ( <i>Ramulus Cinnamomi</i> ) 480 mg, Đại diệp đẳng ( <i>Caulis et Folium Tinomiscii petiolaris</i> ) 480 mg, Cách lông vàng ( <i>Caulis Premnae</i> ) 480 mg, Sài hồ ( <i>Radix Bupleuri chinensis</i> ) 160 mg, Phục linh ( <i>Poria</i> ) 160 mg, Đảng sâm ( <i>Radix Codonopsis pilosulae</i> ) 160 mg, Tiền hồ ( <i>Radix Peucedani</i> ) 160 mg, Cát cánh ( <i>Radix Plantycodi grandiflori</i> ) 160 mg, Xuyên khung ( <i>Rhizoma Ligustici wallichii</i> ) 160 mg, Chỉ xác ( <i>Fructus Aurantii</i> ) 160 mg, Khương hoạt ( <i>Rhizoma et Radix Notopterygii</i> ) 160 mg, Độc hoạt ( <i>Radix Angelicae pubescentis</i> ) 160 mg, Cam thảo ( <i>Radix et Rhizoma Glycyrrhizae</i> ) 160 mg, Sinh khương ( <i>Rhizoma Zingiberis Recens</i> ) 80 mg, Bạc hà ( <i>Herba Menthae</i> ) 80 mg, Natri benzoat 1,60 mg).	800 mg
3	Talc	4 mg
4	Magnesi stearat	5 mg
5	Calci carbonat	4 mg

### 1.2. Tiêu chuẩn nguyên phụ liệu

Nguyên liệu	Tiêu chuẩn
Cao khô hỗn hợp dược liệu	TCCS
Talc	ĐDVN V
Magnesi stearat	ĐDVN V
Calci carbonat	ĐDVN V

### 1.3. Tiêu chuẩn chất lượng

**1.3.1. Tính chất:** Viên nang cứng số 00 gồm hai nửa hình trụ lồng khít vào nhau, bên trong chứa bột màu nâu nhạt, mùi thơm đặc trưng của dược liệu.

**1.3.2. Độ rã:** Không quá 30 phút.

**1.3.3. Độ đồng đều khối lượng:** Khối lượng trung bình thuốc trong nang  $\pm 7,5\%$ .

**1.3.4. Mất khối lượng do làm khô:** Không quá 9,0 %.



**1.3.5. Định tính:** Chế phẩm phải thể hiện phép thử định tính của Quế chi, Khương hoạt, Độc hoạt, Sài hồ, Xuyên khung, Tiền hồ, Đảng sâm.

**1.3.6. Giới hạn nhiễm khuẩn:** Đạt yêu cầu phụ lục 13.6, Dược điển Việt Nam V.

Tổng số vi sinh vật hiếu khí  $\leq 10^4$  CFU/g; Tổng số nấm  $\leq 10^2$  CFU/g; Không quá  $10^2$  CFU vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong 1g; Không có *Salmonella* trong 10g; Không có *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* trong 1g.

**1.3.7. Giới hạn chất bảo quản:** Hàm lượng Natri benzoat không được quá 1,92 mg/viên.

**1.3.8. Chất chiết được:** Hàm lượng chất chiết được không dưới 30% khối lượng trung bình viên.

## II. PHƯƠNG PHÁP THỬ

### 2.1. Tính chất

Kiểm tra bằng cảm quan, chế phẩm phải đạt các tính chất đã nêu.

### 2.2. Độ rã

Thử theo ĐĐVN V, Phụ lục 11.6 “Phép thử độ rã của viên nén và viên nang”

### 2.3. Độ đồng đều khối lượng

Thử theo ĐĐVN V, Phụ lục 11.3 “Phép thử độ đồng đều khối lượng”

### 2.4. Mất khối lượng do làm khô

Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 9.6: “Xác định mất khối lượng do làm khô”.

Cân chính xác khoảng 1 g chế phẩm, sấy ở 100°C trong 4h.

### 2.5. Định tính

Phương pháp sắc ký lớp mỏng, ĐĐVN V, phụ lục 5.4

#### 2.5.1. Định tính Quế chi

- *Bản mỏng:* Silica gel G đã hoạt hóa ở 100 °C trong 1 giờ.
- *Dung môi khai triển:* Cloroform – Ethyl acetat (9:1)
- *Thuốc thử:* dung dịch 2,4-dinitrophenyl hydrazin
- *Dung dịch thử:* Lấy 4 g cao khô thêm 100ml nước, đun sôi 30 phút, để nguội, lọc. Thêm 30 ml ether ethylic, lắc chiết. Cô dịch chiết ether ethylic được cần. Hòa tan cần với 2 ml ethanol tuyệt đối được dung dịch thử.
- *Dung dịch đối chiếu:* Lấy 2,4 g bột thuốc thêm 100ml nước và tiến hành tương tự như mô tả ở phần dung dịch thử được dung dịch đối chiếu.
- *Cách tiến hành:* Chấm riêng biệt lên bản mỏng 6  $\mu$ l mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được 8 - 10 cm, lấy bản mỏng ra, phun dịch hiện màu, sấy ở 105°C đến khi hiện vết.



- *Kết quả:* Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và cùng giá trị  $R_f$  với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

### **2.5.2. Định tính Khương hoạt**

*Bản mỏng:* Silica gel GF<sub>254</sub> đã hoạt hóa ở 100 °C trong 1 giờ.

*Dung môi khai triển:* *Cloroform – methanol* (8 : 2)

*Dung dịch đối chiếu:* Lấy khoảng 1 g bột dược liệu Khương hoạt (mẫu chuẩn), thêm 10 ml *methanol* (TT) siêu âm 20 phút, để lắng và dùng lớp dung dịch phía trên làm dung dịch chấm sắc ký

*Dung dịch thử:* Lấy khoảng 5 g bột thuốc, thêm 30 ml *methanol* (TT) tiến hành chiết tương tự như mô tả phần dung dịch chuẩn.

*Cách tiến hành:* Châm riêng biệt lên bản mỏng 5  $\mu$ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Sau khi khai triển sắc ký, bản mỏng được lấy ra để khô ở nhiệt độ phòng. Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm.

*Kết quả:* Sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và giá trị  $R_f$  với các vết của dung dịch đối chiếu.

### **2.5.3. Định tính Độc hoạt**

*Bản mỏng:* Silica gel GF<sub>254</sub> đã hoạt hóa ở 100 °C trong 1 giờ.

*Dung môi khai triển:* *Cyclohexan - ethyl acetat - aceton* (8 : 2 : 0,5)

*Dung dịch thử:* Lấy khoảng 10 g bột thuốc, thêm 30 ml *ether* (TT), ngâm qua đêm, lọc. Bốc hơi dịch lọc trên cách thủy đến khô, hòa tan cần trong 2 ml *cloroform* (TT).

*Dung dịch đối chiếu:* Lấy khoảng 2 g dược liệu Độc hoạt (mẫu chuẩn), thêm 10 ml *ether* (TT) tiến hành chiết như mô tả ở phần dung dịch thử được dung dịch đối chiếu.

*Cách tiến hành:* Châm riêng biệt lên bản mỏng 5  $\mu$ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Sau khi khai triển sắc ký, bản mỏng được lấy ra để khô ở nhiệt độ phòng. Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm.

*Kết quả:* Sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và giá trị  $R_f$  với các vết của dung dịch đối chiếu.

### **2.5.4. Định tính Sài hồ**

- *Bản mỏng:* Silica gel G đã hoạt hóa ở 100 °C trong 1 giờ.

- *Dung môi khai triển:* *Ethyl acetat – ethanol – nước* (8: 2 : 1)



- *Dung dịch thử*: Lấy khoảng 2,5 g bột thuốc, thêm 30 ml *methanol* (TT), đun hồi lưu ở 80°C trong 1 giờ, để nguội, lọc. Bốc hơi dịch lọc trên cách thủy đến còn khoảng 5ml, lọc được dung dịch thử.

- *Dung dịch dược liệu đối chiếu*: Lấy 0,5 g bột Sài hồ (mẫu chuẩn), thêm 20 ml *methanol* (TT) chiết như mô tả ở phần dung dịch thử được dung dịch đối chiếu.

- *Cách tiến hành*: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5  $\mu$ l mỗi dung dịch trên. Sau khi khai triển xong, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Phun dung dịch *p-dimethylaminobenzaldehyd* (TT) 2% trong *acid sulfuric* (TT) 40%. Sấy bản mỏng ở 60°C cho tới khi xuất hiện vết (khoảng 5 phút). Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm.

*Kết quả*: Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết cùng màu sắc và giá trị  $R_f$  với vết trên sắc ký đồ của dung dịch chất đối chiếu.

#### 2.5.5. Định tính Xuyên khung

- *Bản mỏng*: Silica gel GF<sub>254</sub> đã hoạt hóa ở 100 °C trong 1 giờ.

- *Dung môi khai triển*: *n-hexan* – *ethyl acetat* (3 : 1)

- *Dung dịch thử*: Lấy 5 g bột thuốc, thêm 40 ml *ether* (TT) đun hồi lưu cách thủy trong 1h, để nguội, lọc. Bốc hơi dịch lọc trên cách thủy đến cạn. Hòa tan cạn trong 2 ml *ethyl acetat* (TT) được dung dịch thử

- *Dung dịch đối chiếu*: Lấy 1 g bột Xuyên khung (mẫu chuẩn), thêm 20 ml *ether* (TT) chiết như mô tả ở phần Dung dịch thử.

- *Cách tiến hành*: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5  $\mu$ l mỗi dung dịch trên. Sau khi khai triển xong, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 nm.

*Kết quả*: Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết cùng màu và giá trị  $R_f$  với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

#### 2.5.6. Định tính Tiên hồ

- *Dụng cụ, hóa chất, thuốc thử*:

- Bản mỏng Silica gel GF<sub>254</sub> tráng sẵn (Merck), hoạt hoá ở 100 oC trong 30 phút

- Ethanol 96 %, cloroform (TT).

- *Dung môi triển khai sắc ký*: *Cyclohexan* - *ethyl acetat* - *aceton* (9 : 1 : 0,5)

- *Hiện vết*: Thuốc thử (1) Dung dịch kali hydroxyd 5 % trong ethanol, thuốc thử (2) dung dịch vanilin - acid sulfuric.

*Cách thử*:



- Dung dịch thử: Lấy 25,5 g bột thuốc, thêm 70 ml ethanol 96 %, đun hồi lưu trên cách thủy khoảng 10 phút, để nguội, lọc. Bốc hơi 10 ml dịch lọc đến cạn. Hòa tan cặn trong khoảng 3 ml cloroform làm dung dịch chấm sắc ký.
- Dung dịch chuẩn: Lấy 5,0 g bột Tiên hồ (mẫu chuẩn) thêm 30 ml ethanol 96 %, đun hồi lưu trên cách thủy khoảng 10 phút, để nguội, lọc. Bốc hơi 10 ml dịch lọc đến cạn. Hòa tan cặn trong khoảng 3 ml cloroform làm dung dịch chấm sắc ký.
- Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 20  $\mu$ l mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được 10 - 12 cm, lấy bản mỏng ra để khô ở nhiệt độ phòng, quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm. Sau đó phun thuốc thử hiện vết (1), rồi sấy nhẹ trong 5 phút. Phun tiếp thuốc thử hiện vết (2), quan sát bản mỏng dưới ánh sáng thường.
- Yêu cầu: Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và cùng giá trị R<sub>f</sub> với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

### 2.5.7. Định tính Đảng sâm

- *Bản mỏng*: Silica gel G đã hoạt hóa ở 100 °C trong 1 giờ.
- *Dung môi khai triển*: n-hexan - ethyl acetat (2 : 1).
- *Dung dịch thử*: Lấy 5 g bột thuốc, cho vào bình nón nút mài 100 ml, thêm 30 ml ethanol 96% (TT), đun sôi trên cách thủy 30 phút, để nguội, lọc. Cô dịch lọc trong cách thủy đến cạn. Hòa tan cặn với n-butanol (TT) 3 lần, mỗi lần 10 ml. Gộp dịch chiết butanol, cô cách thủy đến cạn. Hòa cặn trong 5 ml ethanol (TT), thêm 30 ml dung dịch acid sulfuric 20% (TT), đun sôi hồi lưu trong 2 giờ, để nguội, lọc lấy tủa, rửa tủa bằng nước cất. Thêm 20 ml chloroform (TT) vào tủa, đun cách thủy 15 phút, để nguội, lọc. Cô dịch lọc đến cạn. Hòa cặn trong 1 ml ethanol (TT) được dung dịch thử.
- *Dung dịch đối chiếu*: Lấy 1 g dược liệu Đảng sâm đối chiếu đã cắt nhỏ, cho vào bình nón nút mài 100 ml, thêm 30 ml ethanol 96% (TT), đun sôi trên cách thủy 30 phút, để nguội, lọc. Cô dịch lọc trong cách thủy đến cạn. Hòa tan cặn với n-butanol (TT) 3 lần, mỗi lần 10 ml. Gộp dịch chiết butanol, cô cách thủy đến cạn. Hòa cặn trong 5 ml ethanol (TT), thêm 30 ml dung dịch acid sulfuric 20% (TT), đun sôi hồi lưu trong 2 giờ, để nguội, lọc lấy tủa, rửa tủa bằng nước cất. Thêm 20 ml chloroform (TT) vào tủa, đun cách thủy 15 phút, để nguội, lọc. Cô dịch lọc đến cạn. Hòa cặn trong 1 ml ethanol (TT) được dung dịch đối chiếu.
- *Cách tiến hành*: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10  $\mu$ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Sau khi khai triển sắc ký, bản mỏng được để khô ngoài không khí hay sấy nhẹ cho bay hết dung môi. Phun dung dịch vanilin 1% trong acid sulfuric (TT), để khô và sấy bản mỏng ở 105 °C đến khi hiện rõ vết. Quan sát dưới ánh sáng thường sau khi phun thuốc thử.
- *Kết quả*: Sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và giá trị R<sub>f</sub> với các vết của dung dịch đối chiếu.



## 2.6. Độ nhiễm khuẩn

Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 13.6: “Thử giới hạn nhiễm khuẩn”.

### 2.6.1. Môi trường, dung dịch pha loãng

#### - Môi trường thạch Casein đậm tương

Casein thủy phân với Pancreatin	17,0g
Bột đậm tương thủy phân bởi papain	3,0 g
Natri clorid	5,0 g
Dikali hydrophosphat	2,5 g
Glucose	2,5 g
Thạch	15,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH sau khi hấp tiệt trùng	7,3 ± 0,2

#### - Môi trường Casein đậm tương lỏng

Casein thủy phân với Pancreatin	17,0g
Bột đậm tương thủy phân bởi papain	3,0 g
Natri clorid	5,0 g
Dikali hydrophosphat	2,5 g
Glucose	2,5 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH sau khi hấp tiệt trùng	7,3 ± 0,2

#### - Môi trường thạch Sabouraud dextrose kháng sinh

Glucose (Dextrose)	40,0g
Casein thủy phân với Pancreatin	5,0 g
Pepton từ mô động vật	5,0 g
Thạch	15,0 g
Cloramphenicol	50 mg
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH sau khi tiệt khuẩn	5,6 ± 0,2

#### - Môi trường Mac Conkey

Gelatin thủy phân bởi pancreatin	20,0g
Lactose monohydrate	10,0 g
Mật bò khô	5,0 g
Tím Bromocresol	10,0 mg
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH sau khi tiệt khuẩn	7,3 ± 0,2

#### - Môi trường thạch Mac Conkey

Gelatin thủy phân bởi pancreatin	20,0 g
Pepton (thịt hoặc casein)	3,0 g
Lactose monohydrate	10,0 g

Natri clorid	5,0 g
Muối mật	5,0 g
Thạch	13,5 g
Đỏ trung tính	30 mg
Tím tinh thể	1 mg
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH sau khi tiệt khuẩn	7,1 ± 0,2

- Môi trường tăng sinh Salmonella Rappaport Vassiliadis

Pepton đậu tương	4,5 g
Magnesi clorid hexahydrat	29,0 g
Natri clorid	8,0 g
Dikali phosphat	0,4 g
Kali dihydrophosphat	0,6 g
Xanh malachit	0,036 g
Nước tinh khiết	1000 ml

**Hòa tan đun nóng nhẹ, hấp tiệt trùng không quá 115°C. Điều chỉnh pH 5,2 ± 0,2 ở 25°C**

- Môi trường thạch xylon, lysin, desoxycholate

Xylose	3,5 g
L-lysin	5,0 g
Lactose monohydrat	7,5 g
Sucrose	7,5 g
Natri clorid	5,0 g
Cao nấm men	3,0 g
Đỏ phenol	80 mg
Thạch	13,5 g
Natri deoxycholat	2,5 g
Sắt amoni citriat	0,8 g
Nước tinh khiết	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp tiệt trùng môi trường có pH 7,4 ± 0,2 ở 25°C. Đun sôi, để nguội 50°C thì rót môi trường vào đĩa Petri. Không được hấp tiệt khuẩn trong nồi hấp.

- Môi trường Thạch muối – manitol

Casein thủy phân bởi pancreatin	5,0 g
Pepton từ mô động vật	5,0 g
Cao thịt bò	1,0 g
Natri clorid	75,0 g
D- manitol	10,0 g
Đỏ phenol	0,025 g
Thạch	15,0 g
Nước cất	1000 ml



Đun sôi trong 1 phút, lắc đều. Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp tiệt khuẩn, môi trường có **pH sau khi tiệt khuẩn  $7,4 \pm 0,2$**  ở  $25^{\circ}\text{C}$ . Hấp tiệt khuẩn trong nồi hấp theo quy trình đã thẩm định.

- Môi trường lỏng tăng sinh Enterobacteria – Mossel

Casein thủy phân bởi pancreatin	10,0 g
Glucose monohydrat	5,0 g
Mật bò khô	20,0 g
Kali dihydrophosphat	2,0 g
Di natri hydrophosphat dihydrat	8,0 g
Xanh Brilliant	15 ml
Nước tinh khiết	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi tiệt khuẩn, môi trường có **pH sau khi tiệt khuẩn  $7,2 \pm 0,2$**  ở  $25^{\circ}\text{C}$ . Tiệt khuẩn ở  $100^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút và làm lạnh ngay.

- Môi trường thạch muối mật tím đỏ

Cao nấm men	3,0 g
Gelatin thủy phân bằng pancreatin	7,0 g
Muối mật	1,5 g
Natri clorid	5,0 g
Glucose monohydrat	10,0 g
Đỏ trung tính	30 mg
Tím tinh thể	2 mg
Thạch	15,0 g
Nước cất	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp tiệt khuẩn, môi trường có **pH sau khi tiệt khuẩn  $7,4 \pm 0,2$**  ở  $25^{\circ}\text{C}$ . Không được hấp tiệt khuẩn trong nồi hấp.

- Dung dịch đệm phosphat pH 7,2

Kali dihydrophosphat	34,0 g
Nước cất	1000 ml

Hòa tan 34,0 Kali dihydrophosphat trong 500 ml nước cất, điều chỉnh tới pH  $7,2 \pm 0,1$  bằng dung dịch NaOH 4% (khoảng 175 ml). Thêm nước cất tới vạch. Trộn đều, phân chia vào các bình đựng dung dịch thích hợp. Khi dùng hòa loãng nước theo tỷ lệ 1:800 và tiệt khuẩn

### 2.6.2. Thiết bị

- Nồi hấp;
- Tủ ấm;
- Tủ mát;
- Buồng thổi khí sạch.

### **2.6.3. Chuẩn bị mẫu**

Cân khoảng 10 g chế phẩm, thêm dung dịch đệm phosphate pH 7,2 vừa đủ 100 ml thu được dung dịch có nồng độ pha loãng  $10^{-1}$  (hỗn hợp X). Tiếp tục pha loãng bằng dung dịch pha loãng đến các nồng độ  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ .

### **2.6.4. Đếm tổng số lượng vi khuẩn hiếu khí.**

Chuẩn bị mẫu như phần 2.6.3. Hút chính xác 1 ml hỗn hợp thử nghiệm ở độ pha loãng thích hợp vào 1 đĩa petri đã được thêm 15 – 20 ml môi trường thạch casein đậu tương, ủ ở 30 – 35 °C, sau 3 – 5 ngày đọc kết quả. Mỗi nồng độ tiến hành trên ít nhất 2 đĩa Petri.

Số lượng vi khuẩn hiếu khí trong 1g mẫu thử được tính theo công thức:  $N \times d$

Trong đó: N: số lượng khuẩn lạc đếm được trên đĩa

d: độ pha loãng

### **2.6.5. Đếm tổng số lượng nấm**

Chuẩn bị mẫu như phần 2.6.3. Hút chính xác 1 ml hỗn hợp thử nghiệm ở độ pha loãng thích hợp vào 1 đĩa petri đã được thêm 15 – 20 ml môi trường thạch sabouraud dextrose, ủ ở 20 – 25 °C, sau 5 – 7 ngày đọc kết quả. Mỗi nồng độ tiến hành trên ít nhất 2 đĩa Petri.

Số lượng vi khuẩn hiếu khí trong 1g mẫu thử được tính theo công thức:  $N \times d$

Trong đó: N: số lượng khuẩn lạc đếm được trên đĩa

d: độ pha loãng

### **2.6.6. Tìm vi khuẩn gram âm dung nạp mật.**

Cân chính xác khoảng 1g chế phẩm, thêm 10 ml môi trường casein đậu tương trộn đều và ủ 20 – 25°C trong 3 giờ.

- Phát hiện vi khuẩn:

Chuyển toàn bộ lượng trên vào 100 ml môi trường tăng sinh lỏng Enterobacteria – Mossel. Ủ 30 – 35°C trong 18 – 24 giờ. Cây chuyển lên môi trường thạch muối mật tím đỏ. Ủ 30 – 35°C trong 18 – 24 giờ.

Mẫu thử không có Enterobacteria nếu không thấy khuẩn lạc mọc trên môi trường này

- Đánh giá số lượng:

Phân lập và cấy chuyển: Cấy một lượng mẫu thử đã chuẩn bị phân tiên ủ tương ứng chứa 0,1 g; 0,01 g; 0,001 g mẫu thử vào 20 ml môi trường tăng sinh lỏng Enterobacteria – Mossel. Ủ 30 – 35°C trong 18 – 24 giờ. Cây chuyển lên môi trường thạch muối mật tím đỏ. Ủ 30 – 35°C trong 18 – 24 giờ.



Đánh giá kết quả: Khuẩn lạc mọc trên môi trường chứng tỏ kết quả dương tính. Ghi lượng nhỏ nhất của chế phẩm mà ở đó cho kết quả dương tính và lượng lớn nhất chế phẩm ở đó cho kết quả âm tính. Xác định số lượng vi khuẩn theo bảng sau:

Kết quả đối với mỗi lượng chế phẩm			Số vi khuẩn trong 1g chế phẩm
0,1 g	0,01 g	0,001 g	
+	+	+	$> 10^3$
+	+	-	$< 10^3$ và $> 10^2$
+	-	-	$< 10^2$ và $> 10$
-	-	-	$< 10$

#### 2.6.7. Tìm vi khuẩn *Escherichia coli*:

Cân chính xác khoảng 1,0 g chế phẩm, thêm 20 ml môi trường lỏng casein đậu tương trộn đều và ủ 30 – 35°C trong 18 – 24 giờ.

Phân lập và cấy chuyển: Lắc bình môi trường lỏng casein đậu tương, cấy chuyển 1ml môi trường lỏng casein đậu tương sang môi trường lỏng MacConkey, ủ 42 – 44 °C trong 24 – 48 giờ.

Tiếp tục cấy chuyển sang môi trường thạch MacConkey, ủ 30 – 35°C trong 18 – 72 giờ.

Đánh giá kết quả: Khuẩn lạc mọc trên môi trường cho thấy mẫu thử có thể có *E.coli*. Mẫu thử không có *E.coli* khi không có khuẩn lạc mọc trên môi trường

#### 2.6.8. Tìm vi khuẩn *Salmonella*:

Mẫu thử và tiên ủ: Cân chính xác khoảng 10,0 g chế phẩm, thêm 50 ml môi trường lỏng casein đậu tương trộn đều và ủ 30 – 35°C trong 18 – 24 giờ.

Phân lập và cấy chuyển: Lắc bình môi trường lỏng casein đậu tương, cấy chuyển 0,1 ml môi trường lỏng casein đậu tương sang môi trường tăng sinh *Salmonella* Rappaport Vassiliadis và ủ 30 – 35°C trong 18 – 24 giờ

Tiếp tục cấy chuyển sang môi trường thạch Xylose, Lysin, Deoxycholat , ủ 30 – 35°C trong 18 – 48 giờ.

Đánh giá kết quả: Khuẩn lạc mọc trên môi trường có màu đỏ, trung tâm màu đen cho thấy mẫu thử có thể có *Salmonella*. Mẫu thử không có *Salmonella* khi không có khuẩn lạc mọc trên môi trường

#### 2.6.9. Tìm vi khuẩn *Stap.aureus*:

Mẫu thử và tiên ủ: Cân chính xác khoảng 1,0 g chế phẩm, thêm 10 ml môi trường lỏng casein đậu tương trộn đều và ủ 30 – 35°C trong 18 – 24 giờ.

Cấy chuyển sang môi trường thạch muối Manitol, ủ 30 – 35°C trong 18 – 72 giờ.

Đánh giá kết quả: Khuẩn lạc mọc trên môi trường có màu vàng hoặc màu trắng có vòng vàng bao quanh cho thấy có thể có *Stap.aureus*. Mẫu thử không có *Stap.aureus* khi không có khuẩn lạc như mô tả mọc trên môi trường

## 2.7. Giới hạn chất bảo quản:

Phương pháp sắc ký lỏng (DĐVN V, phụ lục 5.3)

### **Điều kiện sắc ký:**

- Cột Inersutain C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5μm)
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 20 μl.
- Bước sóng phát hiện: 228 nm.
- Pha động: methanol - Dung dịch acid acetic 0,8% (50 : 50).
- Dung môi pha mẫu: methanol : nước (50 : 50)

**Chuẩn bị dung dịch chuẩn:** Cân chính xác khoảng 25,0 mg natri benzoat chuẩn vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 30ml dung môi pha mẫu, siêu âm 15 phút, để nguội. Định mức vừa đủ bằng dung môi pha mẫu, lắc đều (dung dịch A). Hút chính xác 5,0 ml dung dịch A vào bình định mức 20 ml, bổ sung vừa đủ thể tích bằng dung môi pha mẫu, lắc đều thu được dung dịch Natri benzoat chuẩn. Lọc qua màng lọc 0,45μm trước khi tiêm sắc ký.

**Chuẩn bị dung dịch thử:** Lấy 20 viên, xác định khối lượng trung bình bột thuốc trong viên, đồng nhất mẫu. Cân chính xác khoảng một lượng chế phẩm tương ứng với 5 mg natri benzoat vào bình nón 50 ml, thêm khoảng 30 ml dung môi pha mẫu, siêu âm 15 phút, để nguội. Lọc bằng giấy lọc sang bình định mức 50 ml. Lặp lại 1 lần nữa. Định mức vừa đủ thể tích bằng dung môi pha mẫu, lắc đều, lọc qua giấy lọc thu được dung dịch thử. Lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi tiêm sắc ký.

### **Cách tiến hành:**

- Tính tương thích hệ thống: Tiêm dung dịch chuẩn 6 lần lặp lại, % RSD của 6 lần tiêm lặp lại ≤ 2,0%.
- Tiêm riêng biệt 20 μl mỗi dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào máy, ghi lại sắc ký đồ và tính kết quả dựa trên diện tích pic.

Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn và dung dịch thử, ghi lại sắc ký đồ.

\* **Kết quả:** Lượng chất bảo quản có trong 1 đơn vị phân liều được tính theo công thức:

$$\text{Khối lượng CBQ} = \frac{\text{St} \times \text{Dt} \times \text{HLc} \times \text{mc} \times \text{mtbv}}{\text{Sc} \times \text{Dc} \times \text{mt}}$$



Trong đó:

St, Sc: Diện tích pic natri benzoat trong sắc ký đồ của mẫu thử và chuẩn (mAu.s),

Dt, Dc: Độ pha loãng của mẫu thử và mẫu chuẩn (ml),

mc, mt: Khối lượng cân mẫu chuẩn, mẫu thử (g),

mtbv: Khối lượng trung bình viên (g)

HLC: Hàm lượng natri benzoat trong chuẩn.

## 2.8. Chất chiết được

Cân chính xác khoảng 4,000 g chế phẩm cho vào bình nón 250 ml. Thêm chính xác 100,0 ml *ethanol 70% (TT)*, đậy kín, ngâm lạnh, thỉnh thoảng lắc trong 6 h đầu, sau đó để yên 18 h. Lọc qua phễu lọc khô vào một bình hứng khô thích hợp. Lấy chính xác 20 ml dịch lọc cho vào một cốc thủy tinh đã cân bì trước, cô trong cách thủy đến gần khô. sấy cân ở 105 °C trong 3 h, lấy ra để nguội trong bình hút ẩm 30 phút, cân nhanh để xác định khối lượng cân sau khi sấy.

Tính phần trăm lượng chất chiết được bằng ethanol 70% theo chế phẩm khô theo công thức

$$\% \text{ chất chiết được} = \frac{mc \times 100}{20 \times mt} \times 100\%$$

Trong đó:

mc: Khối lượng cân thu được

mt: Khối lượng mẫu thử

## III. ĐÓNG GÓI, BẢO QUẢN, HẠN DÙNG

- *Đóng gói*: Chế phẩm đóng gói trong bao bì kín.
- *Ghi nhãn*: Nhãn rõ ràng, đúng qui chế.
- *Bảo quản*: Bảo quản nơi khô, tránh ánh sáng, nhiệt độ không quá 30°C.
- *Hạn dùng*: 36 tháng kể từ ngày sản xuất.

Hà Nội, ngày 05 tháng 10 năm 2021

GIÁM ĐỐC 



TỔNG GIÁM ĐỐC  
*Nguyễn Hữu Cường*