

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y - DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



BÙI MINH HẢI

**ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP, BÁN TRƯỜNG DIỄN
VÀ TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN CỦA CAO GM TUỆ
TÍNH TRÊN THỰC NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2025

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y - DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



BÙI MINH HẢI

**ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP, BÁN TRƯỜNG DIỄN VÀ TÁC DỤNG
BẢO VỆ GAN CỦA CAO GM TUỆ TÍNH TRÊN THỰC NGHIỆM**

Chuyên ngành: Y học cổ truyền

Mã số: 87 20 115

LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. PGS.TS. VŨ ĐỨC LỢI**
- 2. TS. ĐỖ LINH QUYÊN**

HÀ NỘI – 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Bùi Minh Hải, học viên cao học khóa 16 - Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam. Tôi xin cam đoan:

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

Hà Nội, ngày tháng năm 2025

Tác giả luận văn

Bùi Minh Hải

LỜI CẢM ƠN

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

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

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

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

Tôi xin trân trọng cảm ơn !

Hà Nội, ngày tháng năm 2025

Tác giả luận văn

Bùi Minh Hải

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Tổng quan về vai trò chức năng của gan	3
1.2. Tổng quan về bệnh lý viêm gan	4
1.2.1. Viêm gan theo YHHĐ.....	4
1.2.2. Viêm gan theo YHCT	8
1.3. Tổng quan về một số dược liệu điều trị viêm gan	11
1.4. Tổng quan về Cao GM Tuệ Tĩnh.....	12
1.4.1. Cơ sở xây dựng bài thuốc	12
1.4.2. Đặc điểm chiết xuất Cao GM Tuệ Tĩnh.....	13
1.4.3. Cà gai leo.....	13
1.4.4. Giảo cổ lam	15
1.4.5. Diệp hạ châu.....	17
1.4.6. Cây Râu mèo	18
1.4.7. Nga Truật	19
1.5. Tổng quan về mô hình đánh giá độc tính cấp, bán trường diễn.....	21
1.5.1. Các phương pháp thử nghiệm độc tính cấp	21
1.5.2. Các phương pháp thử nghiệm độc tính bán trường diễn	23
1.6. Tổng quan các mô hình đánh giá tác dụng bảo vệ gan	25
CHƯƠNG 2: CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	28
2.1. Chất liệu nghiên cứu	28
2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu	28
2.1.2. Thuốc, hoá chất dùng trong nghiên cứu.....	28
2.1.3. Máy móc và dụng cụ dùng trong nghiên cứu	29

2.2. Động vật nghiên cứu	29
2.2.1. Động vật nghiên cứu độc tính cấp và bảo vệ gan	29
2.2.2. Động vật nghiên cứu độc tính bán trường diễn	30
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	30
2.3.1. Sơ đồ nghiên cứu.....	30
2.3.2. Thiết kế nghiên cứu.....	30
2.3.3. Phương pháp nghiên cứu đánh giá độc tính cấp của Cao GM Tuệ Tĩnh	31
2.3.4. Phương pháp nghiên cứu đánh giá độc tính bán trường diễn của Cao GM Tuệ Tĩnh.....	31
2.3.5. Phương pháp nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ của Cao GM Tuệ Tĩnh	32
2.4. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	34
2.5. Xử lý và phân tích số liệu	34
2.6. Đạo đức trong nghiên cứu.....	34
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	35
3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của Cao GM Tuệ Tĩnh	35
3.2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao GM Tuệ Tĩnh	36
3.2.1. Tình trạng chung	36
3.2.2. Sự thay đổi thể trọng chuột	36
3.2.3. Đánh giá chức năng tạo máu.....	37
3.2.4. Đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan	41
3.2.5. Đánh giá chức năng gan.....	43
3.2.6. Đánh giá chức năng thận.....	45
3.2.7. Đánh giá hình thái và cấu trúc vi thể gan, thận của chuột:	45
3.3. Kết quả đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cao GM Tuệ Tĩnh.....	48

3.3.1. Ảnh hưởng của cao dược liệu Cao GM lên hoạt độ các enzym AST, ALT và chỉ số gan	48
3.3.2. Ảnh hưởng của Cao GM lên nồng độ MDA, GSH trong dịch đồng thể gan chuột gây độc bằng CCl ₄	50
3.3.3. Ảnh hưởng của Cao GM đến hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột được gây độc bằng CCl ₄	51
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	54
4.1. Bàn luận về độc tính của Cao GM Tuệ Tĩnh	54
4.1.1. Bàn luận về độc tính cấp của Cao GM Tuệ Tĩnh	54
4.1.2. Bàn luận về độc tính bán trường diễn của Cao GM Tuệ Tĩnh	55
4.2. Bàn luận về tác dụng bảo vệ gan của Cao GM Tuệ Tĩnh	58
4.2.1. Cao GM Tuệ tĩnh liều 2,4gam/kg/ngày	59
4.2.2. Cao GM Tuệ tĩnh liều 7,2 gam/kg/ngày	60
4.2.3. Bàn luận về “ Cao GM Tuệ Tĩnh” theo lý luận YHCT	61
KẾT LUẬN	63
KHUYẾN NGHỊ	64
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng việt	Tiếng Anh
ALT		Alanin aminotransferase
AST		Aspartat aminotransferase
CCl ₄		Carbon tetrachlorid
ĐVTN	Động vật thực nghiệm	
WHO	Tổ chức y tế thế giới	World Health Organization
YHCT	Y học cổ truyền	
YHHĐ	Y học hiện đại	
MDA		Malondialdehyde
ROS	Chất oxy hóa	Reactive Oxygen Species
Cao GM	Cao GM Tuệ Tĩnh	
VGVR	Viêm gan Virus	
ADH		Alcohol dehydrogenase
NAD		Nicotinamide Adenine Dinucleotide
MEOS		Microsomal Ethanol Oxidating System
ALDH2		acetaldehyd dehydrogenase 2
CYP 2E1		Cytochrom P450 2E1

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Các chất độc với gan được dùng để gây tổn thương gan thực nghiệm ở chuột cống trắng	26
Bảng 2.1.	Thành phần 100g Cao GM Tuệ Tĩnh.....	28
Bảng 2.2.	Bảng điểm đánh giá tổn thương vi thể gan chuột.....	33
Bảng 3.1:	Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của Cao GM.....	35
Bảng 3.2:	Ảnh hưởng của Cao GM đến thể trọng chuột.....	36
Bảng 3.3.	Ảnh hưởng của Cao GM đến số lượng hồng cầu trong máu chuột cống trắng.....	37
Bảng 3.4.	Ảnh hưởng của Cao GM đến hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột cống trắng.....	37
Bảng 3.5.	Ảnh hưởng của Cao GM đến hàm lượng Hematocrit trong máu chuột cống trắng.....	38
Bảng 3.6.	Ảnh hưởng của Cao GM đến thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột cống trắng.....	38
Bảng 3.7.	Ảnh hưởng của Cao GM đến số lượng bạch cầu trong máu chuột cống trắng.....	39
Bảng 3.8.	Ảnh hưởng của Cao GM đến công thức bạch cầu trong máu chuột cống trắng.....	40
Bảng 3.9.	Ảnh hưởng của Cao GM đến Tiểu cầu trong máu chuột cống trắng	41
Bảng 3.10.	Ảnh hưởng của Cao GM đến hoạt độ AST (GOT) trong máu .	41
Bảng 3.11.	Ảnh hưởng của Cao GM đến hoạt độ ALT (GPT) trong máu .	42
Bảng 3.12.	Ảnh hưởng của Cao GM đến Bilirubin toàn phần trong máu chuột.....	43
Bảng 3.13.	Ảnh hưởng của Cao GM đến Albumin trong máu chuột	44

Bảng 3.14.	Ảnh hưởng của Cao GM đến nồng độ Cholesterol toàn phần trong máu chuột	44
Bảng 3.15.	Ảnh hưởng của Cao GM đến Creatinin trong máu chuột.....	45
Bảng 3.16.	Hoạt độ AST và ALT ở các lô nghiên cứu	48
Bảng 3.17.	Chỉ số gan ở các lô nghiên cứu	49
Bảng 3.18.	Nồng độ MDA và GSH dịch đồng thể gan ở các lô nghiên cứu	50
Bảng 3.19.	Đặc điểm mô bệnh học đại thể của gan chuột.....	51

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1:	Cà gai leo	13
Hình 1.2:	Giảo cổ lam.....	15
Hình 1.3:	Diệp hạ châu	17
Hình 1.4:	Cây Râu mèo.....	18
Hình 1.5:	Nga truật.....	19
Hình 2.1:	Sơ đồ nghiên cứu	30
Hình 3.1:	Hình thái vi thể gan ở chuột lô chứng	45
Hình 3.2:	Hình thái vi thể gan chuột lô trị 1 sau 12 tuần uống mẫu thử	46
Hình 3.3:	Hình thái vi thể gan chuột lô trị 2 sau 12 tuần uống mẫu thử	46
Hình 3.4:	Hình thái vi thể thận chuột lô chứng	47
Hình 3.5:	Hình thái vi thể thận chuột lô trị 1 sau 12 tuần uống mẫu thử ...	47
Hình 3.6:	Hình thái vi thể thận chuột lô trị 2 sau 12 tuần uống mẫu thử ...	48
Hình 3.7:	Hình ảnh vi thể gan lô chứng sinh lý	52
Hình 3.8:	Hình ảnh vi thể gan lô chứng bệnh lý	52
Hình 3.9:	Hình ảnh vi thể gan lô chứng dương	52
Hình 3.10:	Hình ảnh vi thể gan lô Cao GM liều thấp.....	53
Hình 3.11:	Hình ảnh vi thể gan lô Cao GM liều cao	53

ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm gan là một trong những vấn đề sức khỏe cộng đồng nghiêm trọng nhất toàn cầu, ảnh hưởng đến hàng triệu người và gây ra những hậu quả nặng nề cho cá nhân và xã hội. Bệnh gan gây ra ước tính khoảng 2 triệu người tử vong mỗi năm trên toàn cầu, 1 triệu ca gây ra do biến chứng xơ gan, 1 triệu ca nguyên nhân do viêm gan siêu vi và ung thư biểu mô tế bào gan. Xơ gan hiện là căn nguyên gây tử vong phổ biến thứ 11 trên toàn thế giới và ung thư gan là nguyên nhân gây tử vong đứng thứ 16; cộng lại, chúng chiếm 3,5% tổng số người tử vong trên toàn thế giới [1].

Theo số liệu mới nhất do Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) công bố năm 2018, tại Việt Nam có khoảng 17.934 ca tử vong do các bệnh lý về gan, chiếm 3,51% tổng số trường hợp tử vong. Tỷ suất tử vong chuẩn hóa theo tuổi là 18,52 trên tổng 100.000 dân, đưa Việt Nam xếp ở vị trí 84 so với các nước trên thế giới về tỷ lệ tử vong do bệnh gan [2]. Trong số đó nguyên nhân thường gặp nhất là viêm gan do virus (VGVR) gây ra, sau đó là các nguyên nhân hay gặp khác như viêm gan do rượu, nhiễm độc thuốc, do hóa chất, do chế độ ăn... [3].

Phần nhiều các nguyên nhân được biết đến có thể gây các bệnh lý tại gan như nhiễm virus viêm gan, gan nhiễm mỡ do chế độ ăn giàu chất béo, do rượu, rối loạn tự miễn, do di truyền, phơi nhiễm các chất hóa học và các loại thuốc gây độc gan... [4].

Trong điều trị viêm gan hiện nay, chỉ một vài trường hợp có thể sử dụng thuốc đặc trị theo nguyên nhân, còn lại đa phần các trường hợp là sử dụng các thuốc bảo vệ và làm tăng cường khả năng hồi phục tế bào gan [5]. Trong số các phương pháp điều trị hiện nay các bệnh về gan, việc nghiên cứu và đẩy mạnh phát triển thuốc mới có nguồn gốc dược liệu là hướng tiếp cận

có nhiều tiềm năng và gây thu hút nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học ở trong nước cũng như trên thế giới. Nhiều dược liệu và hoạt chất chiết xuất từ dược liệu được báo cáo có hiệu quả tốt trong bảo vệ và phục hồi chức năng do nhiều nguyên nhân khác nhau gây ra [6],[7],[8]. Việt Nam có nguồn dược liệu đa dạng và phong phú, trong số đó có nhiều dược liệu được dùng để điều trị các bệnh gan mật như: Diệp hạ châu, Giảo cổ lam, Cà gai leo, Nga truật, Ngũ vị tử, Râu mèo, Kế sữa... góp phần phát hiện và bổ sung thêm các loại dược liệu có sẵn trong tự nhiên có tác dụng bảo vệ gan, việc này rất có ý nghĩa thực tiễn.

Để phát triển mục tiêu Y học cổ truyền (YHCT) kết hợp với Y học hiện đại (YHHĐ), chúng ta càng ngày càng hiện đại hóa Y Dược học cổ truyền với phương châm kế thừa, bảo tồn và sử dụng tối đa nguồn tài nguyên cây thuốc Việt Nam. Sản phẩm “Cao GM Tuệ Tĩnh” được chiết xuất từ cây Diệp hạ châu, Giảo cổ lam, Cà gai leo, Nga truật, Râu mèo. Dưới góc nhìn về lý luận y học cổ truyền thì sản phẩm có tác dụng bảo vệ gan hiệu quả. Mặc dù vậy, bằng chứng khoa học về độc tính cấp, bán trường diễn và tác dụng bảo vệ gan của sản phẩm chưa được làm rõ. Vì thế, chúng tôi tiến hành đề tài: **“Đánh giá độc tính cấp, bán trường diễn và tác dụng bảo vệ gan của Cao GM Tuệ Tĩnh trên thực nghiệm”** với 2 mục tiêu để giải quyết vấn đề trên:

1. *Đánh giá độc tính cấp, bán trường diễn của Cao GM Tuệ Tĩnh.*
2. *Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của Cao GM Tuệ Tĩnh trên mô hình gây tổn thương gan bằng CCl_4 .*

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về vai trò chức năng của gan

Gan là một cơ quan lớn nhất của cơ thể, có vai trò vô cùng quan trọng. Gan đảm nhiệm nhiều chức phức tạp và đặc thù như: chức năng dự trữ máu, đệm các chất dinh dưỡng; chức năng tổng hợp protein; chức năng chuyển hóa carbohydrate; chuyển hóa lipid; chuyển hóa acid amin; chuyển hóa vitamin và muối khoáng; chuyển hóa bilirubin; chức năng bài tiết mật; tham gia vào tổng hợp các yếu tố đông máu; chức năng khử độc [9]. Ta thấy gan là cơ quan chính biến đổi các chất độc nội hoặc ngoại sinh hình thành các chất không độc để đào thải ra khỏi cơ thể, có thể nói gan là cơ quan có vai trò quan trọng trong việc loại bỏ các chất độc, bảo vệ cơ thể [10].

Gan có thể khử các chất độc bằng hai cách: (1) phương pháp vật lý thông qua sự thực bào của tế bào Kuffer và (2) phương pháp sinh hóa thông qua enzym cytochrome P450.

Gan có thể biến đổi các chất hóa học nội sinh (như các hormon tan trong mỡ) và ngoại sinh (như các thuốc sulfonamid, penicillin, ampicillin, erythromycin,...) thành các chất ít độc hơn, làm giảm hoạt tính sinh học của chúng. Bản chất của quá trình này là biến đổi các chất độc tan trong mỡ thành các sản phẩm tan trong nước để có thể đào thải ra ngoài dễ dàng qua dịch mật hay nước tiểu, bao gồm hai giai đoạn liên tiếp:

- Giai đoạn 1: là quá trình oxy hóa, hydroxyl hóa và các phản ứng khác qua trung gian cytochrome P450.
- Giai đoạn 2: Là quá trình este hóa để tạo ra những sản phẩm dễ tan trong nước, tạo thuận lợi cho quá trình đào thải.

Trong đó, cytochrome 450 có vai trò giúp tế bào biểu mô nhỏ có khả năng kháng lại carbon tetrachloride [9].

1.2. Tổng quan về bệnh lý viêm gan

1.2.1. Viêm gan theo YHHĐ

1.2.1.1. Khái niệm

Viêm gan là một bệnh lý thường gặp trong số các bệnh về gan mật. Dựa vào sự tiến triển của bệnh, viêm gan được chia làm hai loại: [11]

- Viêm gan cấp: là tổn thương gan với sự có mặt của các tế bào viêm trong mô gan dưới 6 tháng. Hoặc dựa vào các tổn thương giải phẫu bệnh lý: có các hoại tử ở trung tâm tiểu thùy.

- Viêm gan mạn: là tổn thương tại gan với sự có mặt của tế bào viêm trong mô gan trên 6 tháng. Giải phẫu bệnh lý: có những tổn thương hoại tử xung quanh tiểu thùy, có thể kèm theo xơ hoá.

1.2.1.2. Nguyên nhân

Viêm gan có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau gây ra, ta có thể xếp loại như sau [12]:

- Nguyên nhân do virus gồm: Virus viêm gan A, B, C, D, E;
- Nguyên nhân vi khuẩn hoặc ký sinh trùng: Leptospirose, bệnh amip, thương hàn, bệnh Salmonella, sốt Q;
- Do nhiễm độc thuốc hoặc hóa chất;
- Do rượu;
- Do thiếu oxy: Thắt động mạch gan, suy tuần hoàn gan (do suy tim), hội chứng Budd Chiari;
- Do chuyển hóa: Viêm gan ở phụ nữ có thai, hemosiderosis, bệnh Wilson.

Trong đó thì nguyên nhân do virus, do rượu và do ngộ độc thuốc hoặc hóa chất là nhóm nguyên nhân thường gặp nhất [12].

1.2.1.3. Cơ chế bệnh sinh

- * Viêm gan do rượu: Gan là cơ quan diễn ra quá trình chuyển hóa rượu

mạnh nhất trong cơ thể. Lượng rượu hấp thu vào cơ thể có đến 90% sẽ được chuyển hóa tại gan, còn lại sẽ được thải ra ngoài qua thận và phổi [13]. Tại gan, rượu sẽ chuyển hóa theo hai giai đoạn:

Giai đoạn 1: Chuyển hóa rượu thành acetaldehyd được thực hiện bởi ba hệ thống enzym: (1) Alcohol dehydrogenase (ADH) cùng với sự tham gia của coenzym NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) nằm trong bào tương; (2) Hệ thống oxy hóa rượu ở microsome (Microsomal Ethanol Oxidating System – MEOS); (3) Các men catalase.

Giai đoạn 2: Acetaldehyd được hình thành là một chất độc, sẽ nhanh chóng được chuyển thành acetat bởi enzym acetaldehyd dehydrogenase 2 (ALDH2). Như vậy chủ yếu nhờ enzym enzym acetaldehyd dehydrogenase 2 (ALDH2) và alcohol dehydrogenase (ADH) giúp ethanol được chuyển hoá [13],[14].

Hệ thống MEOS ở màng của mạng lưới nội bào tương sẽ hoạt động khi nồng độ cồn trong máu cao. Trong hệ thống này có enzym quan trọng nhất đó là cytochrom P450, vì enzym này không những có vai trò trọng tâm trong chuyển hóa rượu mà nó còn tham gia vào việc giáng hóa nhiều chất của cơ thể cũng như chất lạ từ bên ngoài vào. Cytochrom P450 2E1 (CYP 2E1), một typ của cytochrom P450, có vai trò đặc biệt quan trọng trong chuyển hóa alcohol thành acetaldehyd. Phản ứng giáng hóa này sẽ giải phóng ra các gốc oxy tự do hoạt động (ROS) và gây ra stress oxy hóa dẫn đến tổn thương tế bào gan [15].

Việc thường xuyên tiêu thụ lượng lớn alcohol sẽ kích hoạt mạnh hơn hai enzym khác tham gia vào quá trình chuyển hóa acetaldehyd thành acetate, đó là các enzym xanthinoxidase và aldehydoxidase. Thông qua hoạt động của hai enzym này gây hậu quả làm tăng thêm các tổn thương gan do rượu bởi một lượng lớn gốc tự do được sinh ra bởi sự xúc tác của 2 enzym trên [15].

* Viêm gan do thuốc và hóa chất: Mỗi loại thuốc có thể gây tổn thương gan thông qua nhiều con đường khác nhau nên cơ chế bệnh sinh vẫn chưa được tìm hiểu rõ. Nhìn chung, các cơ chế chính bao gồm: phản ứng đặc ứng, trong đó thuốc

kích hoạt đáp ứng miễn dịch chống lại tế bào gan, thường không phụ thuộc liều và có thể đi kèm các dấu hiệu quá mẫn như sốt, phát ban hoặc tăng bạch cầu ưa acid; và tổn thương do quá liều hoặc tương tác thuốc, khi nồng độ thuốc vượt ngưỡng chuyển hóa của gan, gây rối loạn chức năng enzym giải độc và dẫn tới hoại tử tế bào gan. Một số thuốc như paracetamol, thuốc kháng lao hoặc halothan là những nguyên nhân điển hình được ghi nhận trong các nghiên cứu gần đây về tổn thương gan do thuốc [16] [17].

Các hình thức gây tổn thương tế bào gan: Ít nhất 6 hình thức gây tổn thương gan đã được nhận diện:

1. Thay đổi nội môi calci trong tế bào dẫn tới tách rời hoạt động của các sợi actin trên bề mặt tế bào gan, màng tế bào bị vỡ dẫn tới hiện tượng tiêu tế bào;
2. Sự gãy vỡ sợi actin có thể xuất hiện ở gần các kênh (canaliculus), phần đặc biệt của tế bào gan đảm trách bài tiết mật. Mất quá trình tạo nhung mao và ngừng bơm vận chuyển như MRP3 (multidrug-resistance-associated protein-3) giúp ngăn ngừa bài tiết bilirubin và các phức hợp hữu cơ khác;
3. Nhiều phản ứng của tế bào gan kéo theo hệ cytochrom P-450 chứa hem, sản sinh phản ứng năng lượng cao dẫn tới gắn đồng hóa trị thuốc với enzym, tạo nên các phức hợp mới không có chức năng;
4. Các phức hợp thuốc - enzym di trú lên bề mặt tế bào trong các bọc nhỏ tác động giống như kháng nguyên đích của tế bào T đến tấn công ly giải, kích thích nhiều dạng đáp ứng miễn dịch (tế bào T và các cytokin);
5. Hoạt hóa con đường chết theo chương trình thông qua receptor TNF- α hoặc Fas dẫn tới chết tế bào theo chương trình;
6. Một số thuốc ức chế chức năng ty thể bằng tác động kép lên quá trình p-oxy hóa (tác động sản sinh năng lượng bằng ức chế tổng hợp NAD và FAD, gây giảm sản sinh ATP) và các enzym trong chuỗi hô hấp tế bào. Các acid béo tự do không được chuyển hóa và thiếu hô hấp yếm khí dẫn tới tích tụ

lactat và các gốc tự do. Các gốc ROS có thể làm đứt gãy các DNA của ty thể. Kiểu tổn thương này là đặc trưng của nhiều tác nhân khác nhau bao gồm cả các chất ức chế sao chép ngược nucleosid (nucleoside reverse-transcriptase inhibitors) - gắn trực tiếp vào DNA của ty thể như acid valproic, tetracyclin và aspirin [18].

* Vai trò của các gốc tự do trong cơ chế bệnh sinh của tổn thương gan:

- Hầu hết cơ chế bệnh sinh bệnh gan do các nguyên nhân khác nhau đều liên quan đến sự phát sinh của các gốc tự do độc hại trong cơ thể. Gốc tự do độc hại đã được chứng minh có vai trò trong một loạt các bệnh lý của các cơ quan trong cơ thể [19], [20], [21].

- Gốc tự do có thể là nguyên tử, phân tử, các ion (anion và cation) mà lớp điện tử ngoài cùng có chứa điện tử không cặp đôi (điện tử cô độc hoặc hóa trị tự do). Số lượng điện tử không cặp đôi có thể là một hoặc nhiều. Gốc tự do có thể là nguyên tử ($\text{Cl}^\cdot$, $\text{O}_2^\cdot$), là nhóm nguyên tử ($\text{CH}_3^\cdot$, $\text{OH}^\cdot$), là phân tử ($\text{NO}_2^\cdot$, $\text{NO}^\cdot$) [22], [23].

- Hầu như tất cả các trạng thái bệnh lý quan trọng đều do ROS gây ra, bao gồm gốc hydroxyl, gốc superoxid anion, hydro peroxid, hypochlorit, oxy đơn bội, gốc oxid nitric và gốc peroxynitrit [22].

- Các gốc tự do có thể có nguồn gốc nội sinh hoặc ngoại sinh. Trong cơ thể luôn có sự cân bằng nội môi giữa ROS và các chất chống oxy hóa. Khi cơ thể nhiễm chất độc, stress tâm lý, viêm, nhiễm khuẩn... làm tăng cao số lượng các ROS trong cơ thể dẫn đến sự mất cân bằng giữa các chất chống oxy hóa với các ROS gọi là stress oxy hóa [12], [24].

- Các gốc tự do này có thể tác động tới màng hoặc nhân tế bào, gây ra các phản ứng sinh học có hại cho phân tử DNA, protein, carbohydrat và lipid [25]. Các gốc tự do tấn công các đại phân tử quan trọng dẫn đến tổn thương tế bào và phá vỡ cân bằng nội môi gây ra chết tế bào [26].

1.2.2. Viêm gan theo YHCT

1.2.2.1. Đại cương theo YHCT

Khái niệm: Theo YHCT, các triệu chứng mô tả trong bệnh viêm gan thuộc phạm trù các chứng hiệp thống, hoàng đản, cổ trướng, tích tụ, dịch độc và uất chứng [27].

Trong y văn cổ của YHCT, dựa trên các biểu hiện lâm sàng thường gặp như chán ăn, đau hạ sườn phải, gan to, lách to, vàng da, vàng mắt..., bệnh được quy vào phạm vi các chứng “hiệp thống”, “hoàng đản” và “tích tụ”.

“*Chứng hoàng đản*”:

Trong “*Hoàng Đế Nội Kinh*” - bộ kinh điển của Y học Trung Hoa ra đời vào khoảng thế kỷ VIII trước Công nguyên - chương “*Bình nhân khí tượng luận*” đã mô tả những biểu hiện lâm sàng như vàng da, lòng trắng mắt vàng, nước tiểu vàng đỏ, ưa nằm... và gọi chung là chứng hoàng đản. Tác phẩm cũng nêu rõ các nguyên nhân gây bệnh, bao gồm sự tác động của các yếu tố môi trường như thử, thấp, nhiệt... kết hợp với sự suy giảm chức năng tạng phủ bên trong mà dẫn đến phát bệnh. Đến thời Hán ở Trung Quốc (thế kỷ II–III sau Công nguyên), bộ “*Kim Quỹ Yếu Lược*” đã phân chứng hoàng đản thành 5 loại: Hoàng đản, Cốc đản, Tửu đản, Nữ lao đản, Hắc đản, đồng thời nêu ra các phương pháp điều trị tương ứng như thanh nhiệt trừ thấp, thẩm thấp lợi niệu, thoái hoàng... [28]. Chư bệnh nguyên hậu luận của tác giả Sào Nguyên Phương đưa ra khái niệm âm hoàng, giai đoạn nguy hiểm thì gọi là cấp hoàng; rồi Tam nhân cực-bệnh chứng phương luận-ngũ đản luận, nhấn mạnh bệnh có liên quan đến yếu tố tình chí; Đan Khê tâm pháp của Chu Đan Khê nhấn mạnh yếu tố thấp nhiệt; Cảnh Nhạc toàn thư của Trương Cảnh Nhạc lại phân ra âm hoàng, dương hoàng, biểu tà phát hoàng, đờm hoàng; Ngô Hữu Khả trong cuốn ôn dịch luận-phát hoàng hay đời Thanh tác giả Thẩm Kim Ngao trong “Thẩm thị tôn sinh thư-Hoàng đản” liên quan tới bệnh

truyền nhiễm... Các bài thuốc cổ phương như “*Nhân trần cao thang*”, “*Nhân trần ngũ linh tán*” vẫn được đánh giá cao và còn được các thầy thuốc YHCT ứng dụng hiệu quả trong lâm sàng ngày nay [29].

“*Chứng hiếp thống*”:

Đau tức và cảm giác nặng vùng hạ sườn phải là một triệu chứng cơ năng thường gặp trong các bệnh lý gan mật như viêm gan mạn hay xơ gan. Trong YHCT, triệu chứng này thuộc phạm vi chứng *hiếp thống*, với nghĩa Hán–Việt: ‘hiếp’ là vùng mạng sườn và ‘thống’ là đau, tức đau vùng mạng sườn. Trong “*Linh Khu*” một kinh điển YHCT có từ trước Công nguyên, trong thiên ‘*Ngũ tà*’ có ghi: tà khí phạm vào can sẽ gây đau vùng mạng sườn, vì đường kinh của can đi qua khu vực này.

“*Chứng tích tụ*”:

Trong YHHĐ, gan và lách to là một trong những triệu chứng lâm sàng thường gặp của xơ gan. Trong YHCT, biểu hiện này được xếp vào phạm vi chứng “*tích tụ*”. “*Tổ VẤN*” chương 74 có câu: “Tà khí lưu đọng thì hình thành tích tụ”. Từ rất sớm, các thầy thuốc cổ truyền đã nhận thấy rằng sự xuất hiện của tích tụ bắt nguồn từ tà khí ứ trệ làm khí huyết không thông. “*Nạn Kinh*” phân biệt khá rõ giữa ‘tích’ và ‘tụ’: tích do ngũ tạng phát sinh, thuộc âm; tụ do lục phủ hình thành, thuộc dương. Đến “*Kim Quy Yếu Lược*”, lý luận về nguyên nhân, cơ chế bệnh sinh và phương pháp điều trị chứng tích tụ đã được trình bày đầy đủ và sâu sắc hơn.

1.2.2.2. Nguyên nhân gây bệnh và cơ chế bệnh sinh

Hiện nay, y học cổ truyền nhận thức về nguyên nhân gây bệnh còn có nhiều điểm chưa thống nhất nhưng đại đa số các học giả đều cho rằng nguyên nhân chủ yếu của bệnh là do thấp nhiệt. Tổn thương chủ yếu của bệnh ở các tạng như can, tỳ và thận. Biểu hiện lâm sàng trong từng giai đoạn bệnh có sự khác nhau. Ở giai đoạn đầu chủ yếu thấy biểu hiện của khí huyết, âm dương thất điều,

bệnh kéo dài; tác nhân gây bệnh vẫn còn tồn tại trong cơ thể. Vì vậy, ở giai đoạn sau của bệnh thấy các biểu hiện của thấp nhiệt và các biểu hiện của chứng can uất, tỳ thận khí huyết hư.

** Thấp nhiệt:*

Cảm nhiễm phải thấp nhiệt, dịch độc: thấp nhiệt, dịch độc từ biểu nhập vào lý làm cho hoạt động của khí trong cơ thể bị trở ngại, khí uất ở trung tiêu gây rối loạn chức năng của tỳ, đồng thời thấp nhiệt hun đốt can và đờm gây nên bệnh.

Thời kỳ cấp tính do thấp nhiệt uẩn kết, hóa độc bao phủ toàn bộ tam tiêu nên ảnh hưởng tới toàn bộ chức năng của tỳ, thận, can và đờm. Do thấp nhiệt uẩn kết ở can đờm gây trở ngại chức năng bài tiết dịch mật nên xuất hiện chứng hoàng đản (thể bệnh này tương ứng với viêm gan cấp tính thể vàng da). Nếu thấp làm ảnh hưởng tới chức năng của tỳ là chính, trọng khi đó thấp uẩn kết ở can đờm không nặng, chưa làm ảnh hưởng tới chức năng bài tiết dịch mật thì trên lâm sàng không xuất hiện vàng da (thể bệnh này tương ứng với viêm gan cấp tính thể không vàng da của y học hiện đại). Trong giai đoạn này, nếu bệnh nhân không được điều trị, điều trị không đúng hoặc thể chất của người bệnh suy nhược (chính khí hao hư) thì bệnh dễ chuyển thành mạn tính [27] [28].

Giai đoạn mạn tính, biểu hiện lâm sàng chủ yếu là chứng thấp nhiệt trung trở. Tuy nhiên, do tính chất của tác nhân gây bệnh khác nhau (thấp là âm tà, nhiệt là dương tà) nên trên lâm sàng tùy thuộc vào mức độ mạnh yếu của thấp và nhiệt mà có biểu hiện của chứng âm hư hoặc chứng dương hư. Do tính chất của thấp là dính trệ, dễ làm tổn thương tới tỳ, bệnh kéo dài dẫn đến tỳ vị bị hao hư. Khi tỳ vị bị hư nhược sẽ làm cho thận hư (hậu thiên lụy tới tiên thiên), vì vậy lâm sàng sẽ có biểu hiện của chứng tỳ thận dương hư. Nhiệt làm tổn thương can âm, do "can thận đồng nguyên" vì vậy bệnh lâu ngày cũng dẫn đến can thận âm hư. Thấp nhiệt xâm nhập vào huyết phân, huyết nhiệt

làm tổn thương tới phần âm của cơ thể, làm cho sự lưu thông của huyết bị trở ngại dẫn đến chứng huyết ứ. Tuy nhiên huyết ứ còn do khí hư không đủ sức để vận hành huyết [27] [28].

* *Can uất*: Do can chủ sơ tiết, tính thích điều đạt, sợ uất ức. Nếu tình thần căng thẳng, uất ức hoặc nóng giận kéo dài sẽ làm tổn thương tới can dẫn đến tình trạng hoạt động của khí trong cơ thể không được thông thoát, can mất điều đạt làm cho chức năng sơ tiết bị trở ngại. Sách Kim quỹ yếu lược, chương Tạng phủ kinh lạc tiên hậu bệnh mạch chứng viết: "kiến can chi bệnh, tri can truyền tỳ" có nghĩa là can bị bệnh sẽ ảnh hưởng tới tỳ. Do can khí uất kết, hoành nghịch phạm vào tỳ làm cho chức năng kiện vận của tỳ bị suy giảm, do đó không những không hóa được thấp mà còn làm cho đàm thấp nội sinh; đàm thấp uất lâu ngày hoặc khí cơ uất trệ lâu ngày đều có thể hóa thành nhiệt, thấp nhiệt hồ kết ở can đởm dẫn tới viêm gan. Khí và huyết có mối quan hệ mật thiết, trong đó khí là động lực thúc đẩy sự vận động của huyết; vì vậy nếu khí cơ không được thông thoát thì sự vận hành của huyết sẽ bị trở ngại dẫn đến tình trạng huyết bị ứ trệ ở kinh lạc [27] [28].

* *Ăn uống*: Ăn uống không đầy đủ, uống quá nhiều rượu đều có khả năng làm tổn thương tỳ vị, chức năng vận hóa của tỳ bị giảm sút làm cho thấp trọc nội sinh, đàm thấp uất trệ lâu ngày hóa nhiệt, hun đốt can đởm, làm rối loạn quá trình bài tiết dịch mật của can đởm gây nên vàng da. Sách: Kim quỹ yếu lược, chương Hoàng đản bệnh mạch chứng tính trị có nêu: "cốc khí bất tiêu, vị trùng khổ trọc, trọc khí hạ lưu, tiểu tiện bất thông... thân thể tận hoàng, danh viết cốc đản"[27] [28].

* *Tỳ hư*: Người bệnh sẵn có tỳ dương bị suy yếu hoặc mắc bệnh mạn tính kéo dài, chức năng của tỳ dương bị suy giảm dẫn đến ngoại thấp hoặc nội thấp đều có thể hàn hóa. Hàn và thấp gây trở trệ trung tiêu, ảnh hưởng đến sự bài tiết và lưu thông của dịch mật gây nên vàng da [27] [28].

1.3. Tổng quan về một số dược liệu điều trị viêm gan

Cây Actiso (*Cynara scolymus* L.): Theo YHCT, actiso có vị đắng, tính

mát và mùi thơm nhẹ, được xem là dược liệu quý giúp thanh lọc độc tố, làm mát gan, giải nhiệt và giảm cholesterol, qua đó góp phần cải thiện sức khỏe. Nhờ những công dụng này, atisô thường được sử dụng như một vị thuốc hỗ trợ trong điều trị các bệnh lý về gan như viêm gan hay suy gan [30].

Cây nhân trần (*Adenosma caeruleum* R.Br): Đây là vị thuốc thường được sử dụng trong điều trị vàng da và các bệnh về đường mật, có tác dụng tăng tiết mật, thanh nhiệt, trừ thấp, đồng thời chống viêm và kháng khuẩn. Thuốc còn được dùng để chữa các chứng hoàng đản do nhiễm trùng và cảm mạo do phong nhiệt [30].

Nghệ (*Curcuma longa* L.): Tác dụng kích thích tế bào gan tiết mật xuất phát từ paratolyl methyl cacbinol cùng với khả năng thông mật của curcumin chiết xuất từ nghệ. Các curcuminoid đã được chứng minh có hiệu quả trong việc bảo vệ và phục hồi tổn thương gan cấp tính trên thực nghiệm [31].

Cây dừa dại (*Pandanus odoratissimus* L.f.): Rễ và quả dừa dại có tác dụng điều trị viêm gan, xơ gan [32].

1.4. Tổng quan về Cao GM Tuệ Tĩnh

1.4.1. Cơ sở xây dựng bài thuốc

“Cao GM Tuệ Tĩnh” là bài thuốc theo kinh nghiệm, được rút ra từ quá trình điều trị lâm sàng, từ các vị thuốc trong bài thuốc có tác dụng bảo vệ gan, chống oxy hóa, hỗ trợ chống xơ hóa gan, tăng thải độc gan, từ đó giúp gan hoạt động tốt hơn.

- Dựa vào lý luận của y học cổ truyền, các triệu chứng biểu hiện của bệnh.

- Dựa vào tác dụng của các vị thuốc phù hợp để điều trị các chứng bệnh về gan. Bài thuốc gồm có 5 vị thuốc, trong đó: Diệp hạ châu vị đắng, tính mát nổi bật có tác dụng thanh nhiệt, giải độc, tiêu viêm, hỗ trợ tái tạo tế bào gan. Cà gai leo, Giảo cổ lam, có vai trò thanh nhiệt, giải độc, hóa ứ, tiêu viêm, bảo

vệ tế bào gan, hỗ trợ điều trị xơ gan và viêm gan. Nga truật có tác dụng hành khí, phá huyết, hóa ứ, tiêu trệ giúp tăng cường lưu thông khí huyết, giảm ứ trệ gây tổn thương gan. Râu mèo có tác dụng lợi tiểu, thanh nhiệt, tiêu thũng giúp hỗ trợ bài tiết độc tố qua đường tiểu, giảm gánh nặng giải độc cho gan.

1.4.2. Đặc điểm chiết xuất Cao GM Tuệ Tĩnh

Cao toàn phần được chiết xuất tại Viện nghiên cứu YDCT Tuệ Tĩnh-Học viện Y dược cổ truyền Việt Nam. Bài thuốc là bài thuốc tân phương gồm các dược liệu sau:

Diệp hạ châu	<i>Herba Phyllanthi urinariae</i>	DĐVN V
Giảo cổ lam	<i>Herba Gynostemmae</i>	DĐVN V
Cà gai leo	<i>Herba Solani procumbensis</i>	DĐVN V
Nga truật	<i>Rhizoma Curcumae zedoariae</i>	DĐVN V
Râu mèo	<i>Herba Orthosiphonis spiralis</i>	DĐVN V

Thành phần 100g cao khô: Diệp hạ châu 255g, Giảo cổ lam 255g, Cà gai leo 170g, Nga truật 102g, Râu mèo 68g.

1.4.3. Cà gai leo

Tên khoa học: *Solanum procumbens* Lour. , họ Cà *Solanaceae*



Hình 1.1 Cà gai leo

Bộ phận dùng: Dược liệu cà gai leo (*Herba Solani procumbensis*) là phần trên mặt đất được phơi hoặc sấy khô ở 50 °C đến 60 °C của cây Cà Gai Leo. [33]

Tính vị quy kinh: Khô, ôn, hơi có độc, quy kinh Can

Công năng, chủ trị: Vị thuốc có tác dụng tán phong thấp, tiêu đờm, tiêu độc, trừ ho, giảm đau và cầm máu. Chủ trị các chứng phong thấp, đau nhức đầu gân xương, ho gà, ho khan, dị ứng, xơ gan, cũng như viêm nhiễm quanh răng.

Liều dùng, cách dùng: dùng 16 - 20 gam trên ngày, sử dụng ở dạng thuốc sắc. Thường dùng kết hợp với các vị thuốc khác [33].

Thành phần hóa học

Trong toàn cây và nhiều nhất là ở rễ Cà gai leo chứa alcaloid. Trong rễ còn có tinh bột, saponosid, flavonozid, solasodin, solasodinon... [30].

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Bích Thu (2002) cùng cộng sự đã chỉ ra thành phần hóa học của Cà gai leo. Thân, lá, rễ và quả của cây chứa các hợp chất chính gồm alcaloid, flavonoid, saponin, phytosterol, chất béo, coumarin, carotenoid, axit hữu cơ và axit amin. Trong số này, glycoalcaloid được xác định là hoạt chất chủ đạo, có tác dụng ức chế sự phát triển xơ, chống viêm và bảo vệ gan. [34].

Gần đây, Nguyễn Xuân Hải (2018) đã công bố thêm sáu hoạt chất lần đầu tiên được phát hiện trong Cà gai leo, gồm: ziganein, axit benzoic, axit vanillic, axit salicylic, 4-hydroxybenzaldehyde và indole-3-carbaldehyde [35].

Tác dụng dược lý:

Tác dụng chống viêm

Nguyễn Thị Bích Thu cùng cộng sự đã nghiên cứu tác dụng chống viêm của cao lỏng Cà gai leo trên mô hình viêm mạn tính do amiant, theo kỹ thuật của Ducrot và Julou, cũng như tác dụng ức chế xơ gan trên mô hình xơ gan thực nghiệm. Kết quả cho thấy, cao lỏng chiết toàn phần từ cây Cà gai leo làm giảm 42,2% trọng lượng u trên mô hình u hạt và giảm 27% hàm lượng collagen trên mô hình xơ gan [34].

Tác dụng bảo vệ gan:

Nguyễn Minh Khai cùng cộng sự đã nghiên cứu tác dụng của Cà gai leo trên mô hình xơ gan thực nghiệm do CCl₄ gây ra. Kết quả cho thấy, ở nhóm

dùng Cà gai leo, mức độ xơ gan giảm rõ rệt cả trên quan sát đại thể lẫn vi thể so với nhóm không dùng thuốc [36].

1.4.4. *Giảo cổ lam*

Tên khoa học: *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino. Họ Bí (*Cucurbitaceae*).



Hình 1.2. *Giảo cổ lam*

Bộ phận dùng: Dược liệu *Giảo cổ lam* (*Herba Gynostemmae*) là phần trên mặt đất của cây *Giảo cổ lam*. Thu hái vào mùa hạ, rửa sạch, phơi khô, cắt đoạn ngắn 2 cm đến 3 cm, phơi hoặc sấy khô, khi dùng sao vàng. [33]

Tính vị quy kinh: Vị khô, tính hàn, vào kinh can, phế

Công năng, chủ trị: Vị thuốc có tác dụng thanh nhiệt, giải độc, chỉ ho và trừ đàm. Chủ trị các đợt cấp của viêm phế quản mạn, viêm gan do virus, viêm thận, viêm dạ dày cấp, đồng thời hỗ trợ trong bệnh tiểu đường và tình trạng tăng mỡ máu.

Liều dùng, cách dùng: dùng 15g đến 30g trên ngày, ở dạng thuốc sắc hoặc có thể tán bột khô, làm chè hãm uống [33].

Thành phần hóa học:

* **Gypenoid:** Năm 2017, có gần 201 gypenosides loại dammarane đã được báo cáo trong *Giảo cổ lam*, trong đó có 47 gypenosides loại dammarane

mới đã được phân lập và xác định, tám trong số đó phù hợp với ginsenosides Rb1, Rb3, F2, Rg3, Rc, Rd, malonyl-Rb1 và malonyl-Rd. Các ginsenosides này chiếm khoảng 25% tổng số gypenosides trong cây và GP là cây đầu tiên chứa saponin nhân sâm bên ngoài họ Araliaceae. Do đó, GP được ca ngợi là "nhân sâm phương Nam" [37], [38]. Ngoài ra, hai saponin loại cucurbitane đã được tìm thấy trong Giảo cổ lam [39], [40].

* **Polysaccharides:** chủ yếu được tìm thấy trong thân và lá của Giảo cổ lam [41].

* **Flavonoid:** có hơn 10 loại flavonoid đã được báo cáo và có 7 glycoside flavonoid đã được xác định [42].

* **Sterol, Amino Acids và các thành phần vô cơ:** khoảng mười tám sterol đã được phân lập từ GP. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng GP chứa 18 loại axit amin, bao gồm tám loại axit amin thiết yếu. Tuy nhiên, hàm lượng axit amin trong GP thay đổi tùy theo từng nơi. Ngoài ra, GP chứa 23 loại nguyên tố vô cơ, trong đó có 13 loại nguyên tố vi lượng và năm loại nguyên tố chính cần thiết cho cơ thể con người [37], [43].

Tác dụng dược lý:

Tác dụng bảo vệ gan:

Thành phần của cây Giảo cổ lam chứa flavonoid và saponin, có tác dụng chống viêm, chống oxy hóa và bảo vệ gan. Trên chuột nhắt trắng bị độc gan do PAR, phân đoạn chiết saponin của Giảo cổ lam với liều 200 mg/kg và 600 mg/kg thể trọng chuột đã hạn chế tổn thương gan bằng cách giảm tăng trọng lượng gan tương đối, giảm hoạt độ AST và ALT, hạ nồng độ MDA trong dịch đồng thể gan, đồng thời hạn chế tổn thương gan trên giải phẫu vi thể, hiệu quả tương đương với Sylimarine liều 70 mg/kg thể trọng chuột [37]. Tác dụng chống oxy hóa của thuốc giúp bảo vệ tế bào gan khỏi tổn thương do tetrachlorua cacbon (CCl₄) và ethanol, thể hiện rõ qua việc giảm đáng kể các chỉ số AST và ALT sau khi sử dụng [45], [46].

Ngoài ra Giảo cổ lam còn được chứng minh có nhiều tác dụng nổi bật khác như chống viêm, chống oxy hoá, hạ glucose máu, hạ lipid máu...

1.4.5. Diệp hạ châu

Tên khoa học: *Phyllanthus urinaria* L., thuộc họ *Euphorbiaceae* (họ Thầu dầu). Tên gọi khác là chó đẻ răng cưa.



Hình 1.3. Diệp hạ châu

Bộ phận dùng: Dược liệu Diệp hạ châu (*Herba Phyllanthi urinariae*) là toàn cây, rửa sạch, dùng tươi hay sấy khô của cây chó đẻ răng cưa [33].

Tính vị quy kinh: Cam, khổ, lương. Vào các kinh can, phế

Công năng, chủ trị: Vị thuốc có tác dụng tiêu độc, sát trùng, tiêu viêm, tán ứ và thông huyết. Chủ trị các chứng viêm họng, mụn nhọt, viêm da thần kinh, chàm, cũng như ứ huyết sau sinh kèm đau bụng.

Liều dùng, cách dùng: dùng từ 8g - 20g dược liệu khô trên ngày, ở dạng thuốc sắc [33].

Thành phần hóa học: Cho đến nay, 93 hợp chất đã được xác định và làm sáng tỏ về mặt cấu trúc từ chiết xuất của Diệp hạ châu bao gồm 22 lignan, 16 tannin, 12 flavonoid, 21 phenolic, 13 terpenoid và các chất chuyển hóa thứ cấp khác [47].

Tác dụng dược lý:

** Tác dụng bảo vệ gan*

Chiết xuất methanol của toàn bộ cây Diệp hạ châu ức chế tổn thương gan cấp tính do CCl_4 gây ra thông qua điều hòa glutamate-pyruvate-

transaminase và glutathione peroxidase trong huyết thanh in vivo [48], [49].

Diệp hạ châu làm giảm độc tính đối với gan do CCl₄ gây ra bằng cách điều hòa L-carnitine, axit taurocholic và các quá trình chuyển hóa axit amin [50].

Chiết xuất ethanol của toàn bộ cây Diệp hạ châu làm giảm độc tính gan do acetaminophen gây ra và ức chế enzyme cytochrome P450 CYP2E1 ở chuột [51].

Chiết xuất Diệp hạ châu chứa corilagin, flavonoid và polysaccharides có tác dụng chống viêm gan nhiễm mỡ thông qua hoạt động chống viêm (giảm sản xuất TNF- α và IL-6 thông qua các con đường JNK và NF- κ B), gây ra quá trình oxy hóa axit béo (tăng cường CYP4a10 và ức chế C/EBP β) và đặc tính chống oxy hóa [52].

1.4.6. Cây Râu mèo

Tên khoa học: *Orthosiphon spiralis* (Lour.) Merr., họ Bạc hà (*Lamiaceae*) [29].



Hình 1.4. Cây Râu mèo

Bộ phận dùng: Dược liệu râu mèo (*Herba Orthosiphonis spiralis*) là thân cành mang lá, hoa đã phơi hoặc sấy khô của cây Râu mèo [33].

Tính vị quy kinh: Cam đậm, vị khô, lương. Vào các kinh thận, bàng quang.

Công năng, chủ trị: Thanh lợi thấp nhiệt, lợi tiểu. Chủ trị: Viêm thận, viêm bàng quang, sỏi thận, sỏi mật, viêm gan.

Liều dùng, cách dùng: Ngày dùng từ 5 g đến 6 g, dạng hầm hoặc sắc [33].

Thành phần hóa học:

Trong cây Râu mèo có một glucosid đắng gọi là orthosiphonin, ít tan trong rượu, tan nhiều trong nước.

Ngoài ra còn một ít tinh dầu, một ít chất béo, tanin (5-6%), đường, và một tỷ lệ khá cao muối vô cơ trong đó chủ yếu là muối kali.

Có tác giả nói còn lấy được một chất saponin tritecpenic gọi là sapophonin. Chất này thủy phân sẽ được sapogenin, arabinoza và hexoza. Nhưng gần đây có người không công nhận chất này.

Tác dụng dược lý:

Nước sắc hay nước pha lá Râu mèo làm tăng lượng nước tiểu, đồng thời tăng cả lượng clorua, lượng urê và lượng axit uric.

Còn có tác dụng chữa xung huyết gan, đường mật [30].

1.4.7. Nga Truật

Tên khoa học: *Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe, họ Gừng (*Zingiberaceae*).



Hình 1.5. Nga truật

Bộ phận dùng: Nga truật (*Rhizoma Curcumae zedoariae*) là thân rễ đã chế biến phơi hay sấy khô của cây Nga truật [33].

Tính vị quy kinh: Khổ, tân, ôn. Vào các kinh can, tỳ.

Công năng, chủ trị: Vị thuốc có tác dụng hành khí, phá huyết, chỉ thống và tiêu tích. Chủ trị các chứng kinh nguyệt có huyết khối, bế kinh, đau bụng kinh, cũng như đầy trướng, đau bụng do thực tích khí trệ.

Liều dùng, cách dùng: dùng từ 6 g đến 9 g trên ngày, ở dạng thuốc sắc hay hoàn tán. Thường phối cùng với các vị thuốc khác [33].

Thành phần hóa học: Trong Nga truật có khoảng 3,5% chất nhựa và chất nhầy; 1- 1,5% tinh dầu. Trong tinh dầu thành phần chủ yếu gồm có 48% secquitecpen; 35% zingiberen; 9,65 xineol và một chất có tinh thể. Tinh dầu có màu vàng xanh nhạt, sánh, tỷ trọng 0,982 mùi vị gần như mùi của long não [30].

Tác dụng dược lý:

Chiết xuất acetone 80% trong nước của *Zedoariae Rhizoma* được phát hiện có tác dụng bảo vệ chống lại tổn thương gan cấp tính do D-galactosamine (D-GalN)/ lipopolysaccharide gây ra ở chuột. Để làm rõ các hợp chất hoạt tính, các thành phần chính đã được kiểm tra và 11 sesquiterpene (furanodiene, curdione, neocurdrione, dehydrocurdione, germacrone, 13-hydroxygermacrone, curcumenol, isocurcumenol, aerugidiol, zedoarondiol và curcumenone) và diarylheptanoid (curcumin) được phát hiện có tác dụng ức chế sự gia tăng aspartate aminotransaminase huyết thanh và alanine aminotransaminase ở liều 50 mg/kg uống phù hợp với các nghiên cứu trong ống nghiệm trước đây, ngoại trừ dehydrocurdione, aerugidiol và zedoarondiol. Đặc biệt, curdione, neocurdrione, curcumenol và isocurcumenol ức chế mạnh sự gia tăng ở liều 12,5 mg/kg po. Ngoài ra, tám sesquiterpen, furanodiene, curdione, neocurdrione, dehydrocurdione, germacrone, 13-hydroxygermacrone, curcumenol và curcumenone, cũng cho thấy tác dụng bảo vệ chống lại tổn thương gan do D-GalN/yếu tố hoại tử khối u alpha gây ra ở chuột ở liều 50 mg/kg [53].

1.5. Tổng quan về mô hình đánh giá độc tính cấp, bán trường diễn

1.5.1. Các phương pháp thử nghiệm độc tính cấp

1.5.1.1. Mục tiêu

Thử độc tính cấp được thực hiện nhằm cung cấp thông tin để xếp loại mức độ độc của thuốc, hỗ trợ trong điều trị ngộ độc cấp và xác định liều an toàn cho các nghiên cứu độc tính tiếp theo. Vì vậy, các phép thử độc tính cấp cần xác định rõ ràng các chỉ tiêu liên quan [54]:

- 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).

1.5.1.2. Mô hình thử

* Nguyên tắc lựa chọn:

Tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu, loại mẫu thử và các thông tin sẵn có, cần lựa chọn mô hình thử nghiệm phù hợp. Các loài động vật gặm nhấm thường được sử dụng là chuột nhắt và chuột cống, trong khi các loài không gặm nhấm có thể dùng là chó hoặc khỉ. Số nhóm và số lượng cá thể trong mỗi nhóm được xác định dựa trên mô hình áp dụng [54].

Thử nghiệm sơ bộ thường được áp dụng trong hầu hết các mô hình nghiên cứu, nhằm cung cấp dữ liệu để lựa chọn và bố trí thử nghiệm chính thức. Trong trường hợp thông tin cho thấy mẫu thử hoặc các chất liên quan ít độc hoặc không độc, thử nghiệm có thể tiến hành trên một loài động vật gặm nhấm. Đối với các chế phẩm có độc tính cao hoặc yêu cầu khoa học đặc biệt, cần tiến hành thử trên hai loài động vật thí nghiệm, bao gồm cả gặm nhấm và không gặm nhấm [54].

Khuyến cáo: Để giảm thiểu tác động lên động vật, nên ưu tiên lựa chọn các mô hình sử dụng số lượng động vật thí nghiệm ít nhất có thể [54].

Các mô hình thử phổ biến bao gồm: mô hình Litchfield–Wilcoxon, mô hình liều cố định, mô hình Tăng/Giảm và mô hình thử theo Behrens [54].

Mô hình Litchfield–Wilcoxon được đề xuất năm 1949 nhằm cải tiến và khắc phục những hạn chế của các phương pháp trước đó. Kết quả được thể hiện trên đồ thị log-probit và tính toán theo phương pháp toán đồ có hiệu chỉnh, nhờ đó cho độ chính xác cao hơn. Trước đây, phương pháp này thường được sử dụng để xác định giá trị LD_{50} của các chất có độc tính cao [54]. Do đó chúng tôi sử dụng mô hình theo Litchfield – Wilcoxon trong nghiên cứu này.

1.5.1.3. Các chỉ số theo dõi đánh giá

ĐVTN được theo dõi trong suốt 7 ngày sau khi dùng thuốc. Nếu các dấu hiệu ngộ độc đã hoàn toàn biến mất, thời gian theo dõi có thể được rút xuống còn 5 ngày; ngược lại, nếu biểu hiện ngộ độc chưa rõ ràng hoặc cần quan sát thêm tiến trình hồi phục, thời gian này có thể kéo dài tới 14 ngày. Mọi triệu chứng hoặc dấu hiệu bất thường xuất hiện ở ĐVTN, nếu có, đều phải được ghi nhận và mô tả một cách chi tiết.

Các chỉ tiêu cần quan sát bao gồm:

- Tình trạng hoạt động, khả năng tiêu thụ thức ăn, nước uống, tình trạng phân, nước tiểu
- Trọng lượng cơ thể: xác định trọng lượng trước khi kết thúc thí nghiệm
- Cần theo dõi các dấu hiệu độc tính cấp xảy ra ngay sau khi ĐVTN được dùng thuốc, bao gồm những bất thường về thần kinh và vận động như hành vi, dáng đi, cử động, hay co giật. Đồng thời, cần quan sát các chức năng hô hấp, tuần hoàn và tiêu hóa - chẳng hạn nhịp thở, nhịp tim, tình trạng nôn ói - cùng với phản xạ của các giác quan (mắt, mũi) và tình trạng bài tiết, lông... của ĐVTN. Đặc biệt lưu ý phân biệt các biểu hiện này với tác dụng dược lý vốn có của thuốc, như gây ngủ, an thần hoặc làm hạ huyết áp...

- Xác định số lượng ĐVTN có biểu hiện ngộ độc; thời gian bắt đầu thể hiện triệu chứng độc, thời gian kéo dài các triệu chứng, khả năng hồi phục.
- Số lượng ĐVTN bị chết (nếu có) thời gian chết ứng với mỗi mức liều đã thử.
- Chết tiên đoán. Những ĐVTN ở tình trạng suy kiệt, hấp hối kéo dài, không có khả năng sống sót (ĐVTN không thể ăn uống trong khoảng thời gian theo dõi, được tiên đoán là sẽ chết), thì được tính như là trường hợp ĐVTN bị chết [54].

1.5.2. Các phương pháp thử nghiệm độc tính bán trường diễn

1.5.2.1. Mục tiêu:

Thử độc tính dài ngày chỉ được thực hiện sau khi đã có dữ liệu về độc tính cấp trên động vật, đồng thời mẫu thử dự kiến sử dụng hoặc tiếp xúc lâu dài trên người.

Thử độc tính dài ngày nhằm đánh giá khả năng dung nạp của động vật thí nghiệm khi sử dụng mẫu thử nhiều lần. Qua đó, cần xác định các biểu hiện độc tính xuất hiện sau quá trình sử dụng kéo dài, bao gồm:

- Mức liều không hoặc có gây thay đổi đáng kể tới chức năng, cơ quan hoặc một số biểu hiện sống có thể quan sát được trên động vật thí nghiệm;
- Những độc tính có thể quan sát được trên động vật và khả năng hồi phục nếu có [54].

1.5.2.2. Lựa chọn mô hình thử

Dựa trên thông tin về mẫu thử và kết quả thử độc tính cấp, tiến hành thiết kế mô hình thử nghiệm và xác định mức liều phù hợp.

- Nếu mẫu thử ít độc hoặc không gây độc cấp, thử nghiệm có thể thực hiện trên một loài động vật gặm nhấm.
- Nếu mẫu thử có độc tính cấp cao hoặc liều gây độc gần với liều có tác dụng dược lý, cần tiến hành thử nghiệm trên hai loài động vật, bao gồm gặm nhấm và không gặm nhấm [54].

1.5.2.3. Thời gian thử

Thời gian thử nghiệm trên động vật được xác định dựa trên khoảng thời gian dự kiến sử dụng trên người hoặc theo các khoảng thời gian cụ thể đã định. Tuy nhiên, thời gian thử cũng phụ thuộc vào mục tiêu của nghiên cứu, nhằm cung cấp thông tin cho từng giai đoạn thử lâm sàng. Thời gian có thể ngắn (14-28 ngày) khi cần thông tin cho thử lâm sàng giai đoạn 1 hoặc 2; Khi mục tiêu là cung cấp dữ liệu cho thử lâm sàng giai đoạn 3, thời gian thử nghiệm trên động vật cần kéo dài hơn, thường từ 28 đến 90 ngày. Hiện nay, tài liệu hướng dẫn của các nước tham gia hòa hợp ICH giới thiệu tính thời gian thử độc tính theo 2 cách:

- Khoảng thời gian tiến hành thử nghiệm thuốc trên động vật thường được kéo dài gấp 3–4 lần so với thời gian dự định áp dụng cho người.

- Thời gian thử nghiệm có thể được xác định theo các khoảng cố định như 14, 28 hoặc 90 ngày, tùy thuộc vào đặc tính của mẫu thử và điều kiện thực hiện nghiên cứu.

Đánh giá mức độ độc được thực hiện dựa trên kết quả quan sát và ghi nhận ở từng khoảng thời gian thử nghiệm đã thiết lập [54].

1.5.2.4. Liều dùng

Mức liều thử cần được lựa chọn sao cho có ý nghĩa trong việc đánh giá khả năng an toàn và mức độ độc của mẫu thử khi sử dụng nhiều ngày trên động vật. Thông thường, mức liều dựa trên dữ liệu từ thử độc tính cấp và được quy đổi tương đương giữa các loài nếu áp dụng trên loài khác. Trong các nghiên cứu đầy đủ, thử nghiệm thường được thiết kế với ba mức liều, tương ứng với ba nhóm thử:

- Liều thấp: mức liều đủ để mẫu thử có tác dụng dược lý hoặc điều trị (tức là tương đương mức liều dự kiến dùng để điều trị cho người);

- Liều trung bình: mức liều có thể không gây những độc tính quan sát được hoặc gây ảnh hưởng không đáng kể;

- Liều cao: mức liều dự kiến sẽ quan sát được biểu hiện ngộ độc trên cơ

quan của ĐVTN hoặc đến mức thể tích giới hạn cao nhất mà ĐVTN có thể dùng được [54].

1.6. Tổng quan các mô hình đánh giá tác dụng bảo vệ gan

Gan đảm nhận nhiều chức năng khác nhau, nhưng khi mắc bệnh viêm gan, không phải tất cả các chức năng này đều bị ảnh hưởng như nhau. Do đó, cần tiến hành nhiều thí nghiệm khác nhau để đánh giá tác dụng của thuốc trên gan. Chức năng của gan có thể bao gồm nội tiết, như sản xuất các enzym tham gia tổng hợp và thoái giáng glycogen, prothrombin, cholesterol; ngoại tiết, như hình thành mật, muối mật và axit mật; cũng như chức năng chuyển hóa, bao gồm khử độc thuốc và miễn dịch [55].

Để đánh giá đầy đủ tác dụng bảo vệ gan của thuốc, cần thực hiện ít nhất các loại nghiệm pháp sau [55]:

- + Đối kháng với tác dụng gây tổn thương do các chất độc trên gan;
- + Tác dụng lợi mật và chống ứ mật;
- + Tác dụng điều hòa miễn dịch;
- + Tác dụng trên virus viêm gan.

Mỗi chất độc đối với gan thường tác động lên những chức năng nhất định của các cơ quan dưới tế bào gan, vì vậy đôi khi cần thử nghiệm thuốc trên nhiều loại chất độc khác nhau. Bên cạnh đó, để đánh giá mức độ tổn thương và khả năng phục hồi của các bào quan trong tế bào gan như ty thể, lysosome hay bào tương, cần nghiên cứu nhiều chỉ số hóa sinh khác nhau. Trên thế giới, các nghiên cứu thường sử dụng đa dạng chất độc và dựa vào các chỉ số về gan và huyết thanh để đánh giá kết quả [55].

Các nghiên cứu có thể sử dụng động vật lớn như chó, lợn... Ưu điểm của việc dùng các động vật này là ngoài việc đánh giá các chỉ số chức năng gan, còn có thể quan sát thêm nhiều thông số sinh lý khác, bao gồm áp lực nội sọ, cung lượng tim, sức cản mạch máu toàn thân và mức độ methaemoglobin trong máu [56],[57]. Tuy nhiên, các loài động vật nhỏ như chuột nhắt, chuột cống... thường được ưu tiên sử dụng trong nghiên cứu do chi phí thấp, có thể

dùng số lượng mẫu lớn và cơ chế tổn thương gan ở chúng được nghiên cứu khá rõ ràng [56].

Nghiên cứu thuốc có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình thử nghiệm với các chất độc gây tổn thương gan có thể được thực hiện theo hai hướng: đánh giá tác dụng bảo vệ gan (thuốc thử nghiệm được dùng trước khi gây độc gan) hoặc đánh giá khả năng tăng phục hồi tổn thương gan (thuốc thử nghiệm được dùng sau khi gây độc gan). Trong số các nghiên cứu đã tiến hành, phương pháp đối kháng với tác dụng gây tổn thương gan được áp dụng rộng rãi, vì nó cho phép đánh giá trực tiếp hiệu quả điều trị của thuốc thử nghiệm và phản ánh gần thực tiễn lâm sàng. Hiện nay, nhiều chất được sử dụng để gây tổn thương gan trong nghiên cứu thực nghiệm, bao gồm carbon tetrachlorid, PAR, aflatoxin B, D-galactosamin, concanavalin A, rượu...[58],[59], Tuy nhiên, hai chất thường được sử dụng nhất là CCl_4 và PAR, nhờ vào khả năng gây tổn thương gan điển hình, hiệu quả gây độc gan đã được chứng minh trên thực nghiệm, quy trình thực hiện đơn giản, đồng thời tần suất gây tổn thương gan trong thực tế cũng rất cao [60].

Bảng 1.1. Các chất độc với gan được dùng để gây tổn thương gan thực nghiệm ở chuột cống trắng [55].

Các chất độc với gan	Liều dùng/ 1 kg	Đường dùng	Giết chuột sau (ngày)
Aflatoxin B	7 mg	uống	4
Amanita phalloides	50 mg	uống	10
Carbon tetrachlorid	0,7ml x 6 lần	ip	2
D-Galactosamin	8 mg	ip	1
Lanthanum	4 mg	iv	4
Monocrotalin	120 mg	uống	12
PAR	2g	uống	2
Thioacetamid	100mg	sc	2

** Mô hình nghiên cứu gây độc gan bằng CCl₄*

Mô hình gây độc gan cấp bằng CCl₄ được xem là phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất trong các nghiên cứu nhằm thẩm định tác dụng bảo vệ gan và khả năng phục hồi các tổn thương gan của thuốc [61]. Nguyên nhân là vì tổn thương gan do CCl₄ gây ra thể hiện sự tương đồng ở nhiều loài động vật như chuột nhắt, chuột cống hay thỏ so với các dạng tổn thương gan gặp ở người [62].

** Cơ chế gây độc gan của CCl₄:*

Trong cơ thể, CCl₄ được chuyển hóa chủ yếu bởi CYP2E1 và ở mức độ thấp hơn bởi các enzym CYP2B1, CYP2B2 và CYP3A4, tạo ra gốc tự do trichlorometyl (CCl₃*) [63]. Gốc tự do này gây tổn thương gan thông qua hai cơ chế chính: haloalkyl hóa và peroxy hóa lipid, tương ứng với việc hình thành liên kết cộng hóa trị trực tiếp với các phân tử thiết yếu và quá trình peroxy hóa lipid. [64], [65]. Các cơ chế trên đều gây ra tổn thương tế bào gan và dẫn đến chết tế bào gan.

** Sử dụng CCl₄ gây độc gan trong nghiên cứu thực nghiệm:*

Gây độc gan bằng CCl₄ là mô hình đã được thực hiện trên nhiều động vật thí nghiệm như thỏ [66], chuột nhắt [67], chuột cống [68]. Trong đó, động vật thí nghiệm thường được sử dụng là chuột nhắt và chuột cống.

Tổn thương gan có thể được gây ra qua các đường tiêm phúc mạc, tiêm dưới da hoặc đường uống, với liều từ 0,02- 2 ml/kg, dùng một liều hoặc nhiều liều tùy mô hình nghiên cứu [66].

CHƯƠNG 2

CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chất liệu nghiên cứu

2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu

Cao GM Tuệ Tĩnh là sản phẩm cao khô được chiết xuất từ các dược liệu: Diệp hạ châu, Giảo cổ lam, Cà gai leo, Nga truật, Râu mèo. Sản phẩm do Viện nghiên cứu – Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam nghiên cứu. Sản phẩm nghiên cứu được sản xuất ngày 15/12/2024.

Thành phần 100g cao chiết xuất từ các dược liệu:

Bảng 2.1. Thành phần 100g Cao GM Tuệ Tĩnh

Thành phần	Tên dược liệu	Hàm lượng
Diệp hạ châu	<i>Herba Phyllanthi urinariae</i>	255g
Giảo cổ lam	<i>Herba Gynostemmae</i>	255g
Cà gai leo	<i>Herba Solani procumbensis</i>	170g
Nga truật	<i>Rhizoma Curcumae zedoariae</i>	102g
Râu mèo	<i>Herba Orthosiphonis spiralis</i>	68g

Cơ sở chọn liều trong nghiên cứu: Dựa vào kinh nghiệm dân gian, kinh nghiệm lâm sàng và liều dùng của từng loại dược liệu trong dược điển mà đưa ra liều dùng của cao dự kiến trên người là 10g/ngày. Tính liều theo kg thể trọng cho người trưởng thành là 50 kg thì liều cao khô trên người là 0,2g/kg/ngày, liều ngoại suy tương đương sang chuột nhắt trắng tính được là 2,4 g/kg/ngày (tính hệ số ngoại suy trên chuột nhắt là 12), còn liều ngoại suy tương đương sang chuột cống trắng là 1,2 g/kg/ngày (với hệ số ngoại suy trên chuột cống là 6).

2.1.2. Thuốc, hoá chất dùng trong nghiên cứu

- Silymarin viên nang 140 mg, biệt dược Legalon, do Công ty Madaus GmbH, Đức sản xuất.

- Carbon tetrachlorid (CCl_4), acid thiobarbituric, acid trichloroacetic, acid acetic, natri dodecyl sulfat, dầu oliu, nước cất tinh khiết.
- Dung dịch CMC 0,5% (dung môi pha silymarin).
- Kít định lượng các enzym và chất chuyển hóa trong máu: AST (aspartat aminotransferase), ALT (alanin aminotransferase), albumin, bilirubin toàn phần, cholesterol toàn phần, creatinin của hãng Erba (Đức).
- Thiopental lọ bột pha tiêm 1g của Đức.
- Để xác định hàm lượng MDA trong gan cần có các hóa chất: Acid ascorbic, acid trichloroacetic, acid thiobarbituric, kali clorid, muối Mohr,...
- Để xác định hàm lượng GSH cần các hoạt chất: Glutathione, acid nitrobenzoic, acid sulfosalicylic, phosphate buffer saline,...
- Hóa chất để làm tiêu bản mô bệnh học gồm: Hematoxylin, Oxit thủy ngân (đỏ), Eosin, Alun (ammonium hay potassium), cồn (ethanol) tuyệt đối.

2.1.3. Máy móc và dụng cụ dùng trong nghiên cứu

- Máy xét nghiệm sinh hóa Screen-Master của hãng Hospitex Diagnostic, Italy
- Máy xét nghiệm huyết học 30TS, CH Đức
- Máy đo quang phổ tử ngoại khả kiến Specord210 (AnalytikJena, Đức)
- Cân phân tích của Nhật, độ chính xác 10^{-4} gam
- Kim đầu tù cho chuột uống, cốc chia vạch, bơm kim tiêm 1ml.
- Kính hiển vi quang học, tử sắc.
- Dụng cụ dùng cho nhuộm mô bệnh học: máy đúc khối parafin), bể nhuộm, khuôn nhựa, bể dãn bệnh phẩm, máy cắt lát mỏng (microtome, giá đựng tiêu bản, phiên kính, lá kính...

2.2. Động vật nghiên cứu

2.2.1. Động vật nghiên cứu độc tính cấp và bảo vệ gan

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, cả 2 giống, khỏe mạnh, trọng lượng 18 - 22g được cung cấp bởi Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.

Chuột được nuôi bằng thức ăn chuẩn dành riêng cho chuột trước khi nghiên cứu trong phòng thí nghiệm 5-10 ngày và trong suốt thời gian nghiên cứu, uống nước tự do.

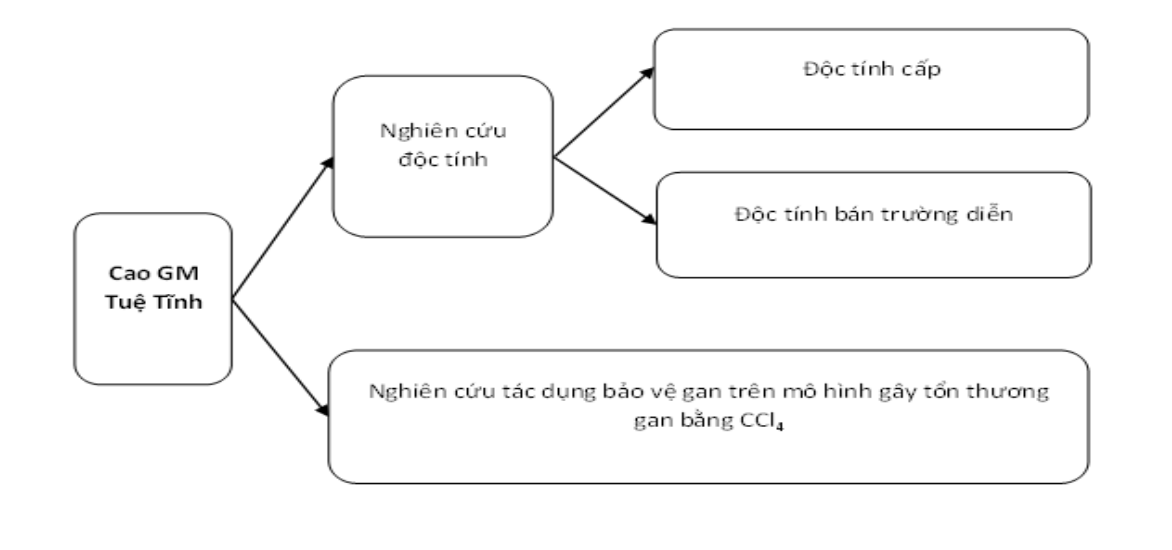
2.2.2. Động vật nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Chuột cống trắng chủng Wistar, cả hai giống, khỏe mạnh, cân nặng 200 ± 20 g. Chuột được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm với đầy đủ thức ăn và nước uống tại Viện nghiên cứu Y Dược học cổ truyền Tuệ Tĩnh.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Sơ đồ nghiên cứu

Dựa theo mục tiêu nghiên cứu, các thí nghiệm được tiến hành theo sơ đồ sau:



Hình 2.1: Sơ đồ nghiên cứu

2.3.2. Thiết kế nghiên cứu

Về các phương pháp nghiên cứu liên quan đến các nội dung thực hiện:

- Nghiên cứu thực nghiệm có đối chứng
- Sử dụng các quy trình chiết xuất trên lý thuyết để tìm ra quy trình chiết xuất phù hợp với nguyên liệu

Cỡ mẫu nghiên cứu: Theo hướng dẫn của Bộ Y tế và tổ chức Y tế thế giới (WHO).

2.3.3. Phương pháp nghiên cứu đánh giá độc tính cấp của Cao GM Tuệ Tĩnh

Nghiên cứu độc tính cấp được thực hiện theo các hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới cũng như theo quy định của Bộ Y tế Việt Nam liên quan đến thử nghiệm thuốc có nguồn gốc dược liệu [69],[70]. Tiến hành xác định LD₅₀ của mẫu thử trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon [71].

Trước khi bắt đầu nghiên cứu, chuột được cho nhịn ăn qua đêm. Ba lô chuột nhắt trắng, mỗi lô gồm 10 con, được phân bố để sử dụng các mức liều tăng dần của mẫu thuốc nghiên cứu. Qua quá trình theo dõi 72 giờ, ghi nhận tình trạng chung và số lượng chuột chết ở từng lô nhằm xác định liều cao nhất không gây chết (0%), liều thấp nhất gây chết hoàn toàn (100%) cùng các mức liều trung gian. Những dữ liệu này được dùng để thiết lập đồ thị tuyến tính phục vụ ước tính LD₅₀ của mẫu thử. Sau đó, việc quan sát diễn biến sức khỏe của chuột tiếp tục được duy trì đến hết ngày thứ bảy sau khi nhận mẫu nghiên cứu.

2.3.4. Phương pháp nghiên cứu đánh giá độc tính bán trường diễn của Cao GM Tuệ Tĩnh

- Nghiên cứu độc tính bán trường diễn qua đường uống trên chuột cống trắng được thực hiện theo các hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới đối với thuốc có nguồn gốc từ dược liệu [69].

- Chuột cống trắng được chia làm 3 lô, mỗi lô 10 con:

+ Lô 1 (chứng sinh học) (n = 10): uống nước cất 10ml/kg/ngày.

+ Lô trị 1 (n = 10): uống thể tích tương tự với hàm lượng cao chiết của Cao GM Tuệ Tĩnh liều 1,2g cao/kg thể trọng chuột/ngày (tương đương với liều lâm sàng).

+ Lô trị 2 (n = 10): uống thể tích tương tự với hàm lượng cao chiết của Cao GM Tuệ Tĩnh liều 3,6g cao/kg thể trọng chuột/ngày (tương đương liều gấp 3 liều lâm sàng).

- Chuột được uống nước hoặc thuốc thử trong 12 tuần liên tục, mỗi ngày một lần vào buổi sáng.

Các chỉ tiêu theo dõi trước và trong quá trình nghiên cứu:

- Tình trạng chung, thể trọng của chuột.
- Đánh giá chức phận tạo máu thông qua số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hàm lượng hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu.
- Đánh giá mức độ tổn thương gan và chức năng gan thông qua các hội chứng:
 - + Hội chứng hủy hoại tế bào gan thông qua định lượng hoạt độ các enzym trong máu: ALT, AST.
 - + Hội chứng ứ mật thông qua định lượng bilirubin toàn phần.
 - + Hội chứng suy tế bào gan thông qua định lượng albumin và cholesterol toàn phần.
- Đánh giá chức năng lọc cầu thận thông qua định lượng nồng độ creatinin huyết thanh.

Các thông số theo dõi được kiểm tra vào trước lúc uống mẫu thử, sau 4 tuần, sau 8 tuần, sau 12 tuần uống mẫu thử và sau 2 tuần ngừng uống mẫu thử.

- Giải phẫu bệnh: Sau 12 tuần uống mẫu thử và 2 tuần ngừng uống mẫu thử, chuột được mổ để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan. Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, thận của 30% số chuột ở mỗi lô. Các xét nghiệm vi thể được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu và phát hiện sớm ung thư (do PGS.TS. Lê Đình Roanh đọc kết quả vi thể).

2.3.5. Phương pháp nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ của Cao GM Tuệ Tĩnh

Nghiên cứu được tiến hành mô hình gây tổn thương gan bằng Carbon tetrachlorid (CCl₄) trên chuột nhắt trắng:

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con:

- Lô 1 (đối chứng): uống nước cất 0,2 ml/con/ngày

- Lô 2 (mô hình): uống nước cất 0,2 ml/con/ngày + CCl₄ với liều 0,5 ml/kg khối lượng cơ thể/ngày.

- Lô 3 (chứng dương): CCl₄ với liều 0,5 ml/kg khối lượng cơ thể/ngày + uống silymarin với liều 70 mg/kg khối lượng cơ thể/ngày

- Lô 4: uống Cao GM Tuệ Tĩnh liều 2,4g cao dược liệu/kg thể trọng chuột/ngày (liều tương đương lâm sàng, hệ số ngoại suy 12) + CCl₄ với liều 0,5 ml/kg thể trọng chuột/ngày

- Lô 5: uống Cao GM Tuệ Tĩnh liều 7,2g cao dược liệu/kg thể trọng chuột/ngày (liều gấp 3 lâm sàng) + CCl₄ với liều 0,5 ml/kg thể trọng chuột/ngày.

Sau 14 ngày, tiến hành đánh giá các chỉ số xét nghiệm.

* Các chỉ tiêu xét nghiệm:

- Lấy máu động mạch cảnh để định lượng các enzym AST, ALT và chỉ số gan.
- Lấy gan để xác định trọng lượng, quan sát hình ảnh tổn thương đại thể.
- Định lượng MDA (malondialdehyd), GSH (Glutathione) ở dịch đồng thể gan chuột ở tất cả các lô nghiên cứu.

- Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể của 30% số gan chuột mỗi lô, đánh giá tổn thương giải phẫu bệnh theo bảng điểm:

Bảng 2.2. Bảng điểm đánh giá tổn thương vi thể gan chuột

Điểm	Tổn thương
0	Bình thường, không hoại tử tế bào gan
1	Tổn thương tối thiểu đến nhẹ. 1 ổ tổn thương, giới hạn trong vùng trung tâm tiểu thùy. Dưới ¼ số tiểu thùy bị hoại tử
2	Tổn thương nhẹ đến trung bình. 1 hoặc nhiều ổ tổn thương, ở trung tâm và lân cận. ½ số tiểu thùy bị hoại tử.
3	Tổn thương trung bình đến nặng. Nhiều ổ tổn thương. Số tiểu thùy bị hoại tử < ¾ và > ½
4	Tổn thương nặng. Nhiều ổ tổn thương. Số tiểu thùy bị hoại tử > ¾
5	Tổn thương rất nặng (toàn bộ tiểu thùy). Mất tế bào gan từ tĩnh mạch trung tâm đến ranh giới với tiểu thùy lân cận.

2.4. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 1 năm 2025 đến tháng 7 năm 2025
- Địa điểm nghiên cứu: Viện nghiên cứu Y- Dược cổ truyền Tuệ Tĩnh

2.5. Xử lý và phân tích số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp t - test Student và test “trước - sau” (Avant - Après).

Số liệu được biểu diễn dưới dạng: $X \pm SD$

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

2.6. Đạo đức trong nghiên cứu

Đề cương nghiên cứu đã được Hội đồng của Học viện Y – Dược học Cổ truyền Việt Nam thông qua và chấp thuận.

Nghiên cứu sử dụng chuột cống trắng và chuột nhắt trắng, với số lượng động vật trong các mô hình thí nghiệm được giới hạn ở mức tối thiểu, vừa đủ để đảm bảo kết quả thu được có độ tin cậy và có thể thực hiện các phân tích thống kê.

Các trường hợp chuột tử vong trong quá trình thí nghiệm (nếu có) cũng như toàn bộ số chuột sau khi kết thúc nghiên cứu đều được xử lý đúng theo quy định hiện hành [70], [72].

Việc chọn lựa động vật thí nghiệm, cùng với điều kiện nuôi dưỡng, chăm sóc và sử dụng, đều được thực hiện nghiêm ngặt theo các quy định chung trong nghiên cứu y sinh học [70], [72].

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của Cao GM Tuệ Tĩnh (ký hiệu là Cao GM)

Chuột nhắt trắng uống Cao GM với liều từ thấp nhất đến cao nhất. Lô chuột đã uống đến liều 0,25 ml/10 g, uống 3 lần trong 24 giờ dung dịch đậm đặc, theo dõi trong 72 giờ sau uống thuốc thử liều cao Cao GM không thấy có biểu hiện hay xuất hiện triệu chứng bất thường nào.

Theo dõi kết quả lô chuột được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1: Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của Cao GM

Lô chuột	n	Liều (ml dung dịch đậm đặc/kg)	Liều (gam cao/kg)	Tỷ lệ chết (%)	Dấu hiệu bất thường
Lô 1	10	40	15,0	0	không
Lô 2	10	55	20,63	0	không
Lô 3	10	70	26,25	0	không

Nhận xét: Các lô chuột uống Cao GM liều từ 40 ml dung dịch đậm đặc/kg (tương đương 15gam/kg) đến liều tối đa 70 ml/kg (tương đương 26,25 gam/kg), không ghi nhận bất kỳ biểu hiện độc tính cấp nào.

Từ bảng trên tính được liều dung nạp tối đa (Luôn nhỏ hơn liều chết 50%) của Cao GM là: 26,25 gam/kg.

3.2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao GM Tuệ Tĩnh

3.2.1. Tình trạng chung

Trong suốt thời gian thí nghiệm, cả chuột ở lô chứng và lô Cao GM ở hai mức liều đều có hoạt động bình thường, mắt sáng, nhanh nhẹn, lông bóng mượt, ăn uống đầy đủ và phân khô.

3.2.2. Sự thay đổi thể trọng chuột

Bảng 3.2: Ảnh hưởng của Cao GM đến thể trọng chuột

Thời gian	Trọng lượng (g) ($\bar{X} \pm SD$)			p (so với chứng)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống	158,0 ± 48,6	157,3 ± 20,2	147,5 ± 7,6	> 0,05
Sau uống 4 tuần	177,0 ± 40,4	163,5 ± 31,4	175,7 ± 21,7	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	< 0,05	
Sau uống 8 tuần	225,0 ± 55,6	186,4 ± 28,7	200,8 ± 31,0	> 0,05
p (test trước - sau)	< 0,05	< 0,05	< 0,05	
Sau uống 12 tuần	248,0 ± 61,8	206,3 ± 29,0	225,1 ± 33,0	> 0,05
p (test trước - sau)	< 0,05	< 0,05	< 0,05	

Nhận xét: Sau 8 và 12 tuần, trọng lượng chuột ở lô chứng sinh học, lô trị 1 và lô trị 2 đều tăng đáng kể so với trước khi uống mẫu thử, có ý nghĩa thống kê với ($p < 0,05$).

Không ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về trọng lượng chuột giữa các lô sử dụng mẫu thử và lô chứng sinh học ở tất cả các thời điểm khảo sát ($p > 0,05$).

3.2.3. Đánh giá chức năng tạo máu

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của Cao GM đến số lượng hồng cầu trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Số lượng hồng cầu (T/L) ($\bar{X} \pm SD$)			p (so với chứng)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống	10,5 ± 1,1	10,1 ± 0,8	10,7 ± 1,1	> 0,05
Sau uống 4 tuần	10,8 ± 1,4	10,8 ± 1,3	11,0 ± 1,3	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 8 tuần	10,1 ± 0,6	9,8 ± 0,5	9,9 ± 0,8	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 12 tuần	10,2 ± 1,1	10,1 ± 0,9	9,8 ± 1,3	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Sau 4, 8 và 12 tuần sử dụng mẫu thử, số lượng hồng cầu ở lô trị 1 và lô trị 2 không có khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh các thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của Cao GM đến hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Số lượng huyết sắc tố (g/dL) ($\bar{X} \pm SD$)			p (so với chứng)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống	13,2 ± 0,5	13,4 ± 1,0	13,6 ± 2,2	> 0,05
Sau uống 4 tuần	13,1 ± 1,1	12,3 ± 1,5	12,4 ± 1,2	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 8 tuần	13,0 ± 1,2	12,8 ± 0,6	12,7 ± 1,6	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 12 tuần	13,7 ± 1,4	13,8 ± 1,1	13,6 ± 1,5	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Sau 4, 8 và 12 tuần uống mẫu thử, ở lô trị 1 và lô trị 2, số lượng huyết sắc tố không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của Cao GM đến hàm lượng Hematocrit trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Hematocrit (%) ($\bar{X} \pm SD$)			p (so với chứng)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống	47,5 ± 3,1	50,1 ± 3,2	48,5 ± 6,0	> 0,05
Sau uống 4 tuần	48,6 ± 4,5	51,8 ± 3,4	51,6 ± 7,2	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 8 tuần	45,3 ± 3,6	48,3 ± 3,2	45,1 ± 3,6	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 12 tuần	46,8 ± 6,1	47,8 ± 4,6	47,8 ± 7,1	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Sau 4, 8 và 12 tuần uống mẫu thử, ở lô trị 1 và lô trị 2, hematocrit không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của Cao GM đến thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Thể tích trung bình hồng cầu (fL) ($\bar{X} \pm SD$)			p (so với chứng)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống	48,8 ± 4,2	50,1 ± 4,5	49,6 ± 4,4	> 0,05
Sau uống 4 tuần	49,7 ± 2,8	50,4 ± 2,1	50,8 ± 2,3	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 8 tuần	48,6 ± 3,0	47,3 ± 1,4	47,8 ± 2,9	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 12 tuần	47,6 ± 4,0	47,5 ± 1,9	48,5 ± 4,5	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Sau 4, 8 và 12 tuần uống mẫu thử, ở cả lô trị 1 và lô trị 2, thể tích trung bình hồng cầu không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của Cao GM đến số lượng bạch cầu trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Số lượng bạch cầu (G/L) ($\bar{X} \pm SD$)			p (so với chứng)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống	9,3 ± 1,7	9,4 ± 1,8	9,7 ± 1,9	> 0,05
Sau uống 4 tuần	9,3 ± 0,9	10,1 ± 2,1	9,5 ± 2,0	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 8 tuần	9,8 ± 1,9	10,1 ± 3,0	10,7 ± 1,8	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 12 tuần	10,1 ± 1,7	10,6 ± 1,8	9,7 ± 2,1	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Sau 4, 8 và 12 tuần uống mẫu thử, ở lô trị 1 và lô trị 2, số lượng bạch cầu không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của Cao GM đến công thức bạch cầu trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Công thức bạch cầu ($\bar{X} \pm SD$)					
	Lô chứng (n = 10)		Lô trị 1 (n = 10)		Lô trị 2 (n = 10)	
	Lympho (%)	Trung tính (%)	Lympho (%)	Trung tính (%)	Lympho (%)	Trung tính (%)
Trước uống	68,6 $\pm$ 5,2	17,1 $\pm$ 5,0	71,1 $\pm$ 5,2	15,4 $\pm$ 2,6	68,3 $\pm$ 5,8	17,1 $\pm$ 4,8
Sau 4 tuần	65,4 $\pm$ 7,5	16,7 $\pm$ 3,4	71,1 $\pm$ 5,6	16,1 $\pm$ 4,5	70,9 $\pm$ 4,8	15,8 $\pm$ 3,8
p (test trước-sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 8 tuần	69,5 $\pm$ 4,5	15,5 $\pm$ 3,4	72,6 $\pm$ 3,8	14,6 $\pm$ 3,4	70,2 $\pm$ 5,3	15,4 $\pm$ 3,9
p (test trước-sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 12 tuần	70,9 $\pm$ 2,9	14,6 $\pm$ 3,8	73,2 $\pm$ 5,6	14,9 $\pm$ 4,6	71,5 $\pm$ 4,2	14,5 $\pm$ 4,1
p (test trước-sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Nhận xét: Sau 4, 8 và 12 tuần uống mẫu thử, ở lô trị 1 và lô trị 2, công thức bạch cầu (phần trăm bạch cầu lympho và bạch cầu trung tính) không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so với trước khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của Cao GM đến Tiểu cầu trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Số lượng tiểu cầu (G/L) ($\bar{X} \pm SD$)			p (so với chứng)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống	556,4 ± 91,8	581,1 ± 100,8	578,4 ± 98,9	> 0,05
Sau uống 4 tuần	575,9 ± 73,3	615,7 ± 99,1	606,0 ± 97,2	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 8 tuần	559,8 ± 63,8	618,5 ± 95,3	587,8 ± 73,4	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 12 tuần	554,2 ± 73,5	583,0 ± 107,2	572,6 ± 78,1	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Sau 4 tuần, 8 tuần và 12 tuần uống mẫu thử, ở lô trị 1 và lô trị 2, số lượng tiểu cầu không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

3.2.4. Đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của Cao GM đến hoạt độ AST (GOT) trong máu

Thời gian	Hoạt độ AST (UI/L) ($\bar{X} \pm SD$)			p (so với chứng)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống	80,1 ± 5,2	83,1 ± 9,3	81,4 ± 6,8	> 0,05
Sau uống 4 tuần	77,8 ± 8,4	87,9 ± 10,7	83,8 ± 8,8	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 8 tuần	80,3 ± 11,5	90,6 ± 20,1	83,1 ± 9,3	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 12 tuần	79,3 ± 4,4	111,4 ± 15,8	112,6 ± 20,2	< 0,001
p (test trước - sau)	> 0,05	< 0,001	< 0,001	

Nhận xét: Sau 4 và 8 tuần, ở lô trị 1 và lô trị 2, hoạt độ AST không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

Sau 12 tuần, ở lô trị 1 và lô trị 2, hoạt độ AST tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p < 0,001$). Tuy nhiên, giá trị AST bình thường ở chuột công dao động từ 50 đến 150 IU/L[73] [74]. Như vậy sau 12 tuần, giá trị AST ở lô trị 1 và lô trị 2 vẫn nằm trong giới hạn bình thường đối với chuột công.

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của Cao GM đến hoạt độ ALT (GPT) trong máu

Thời gian	Hoạt độ ALT (UI/L) ($\bar{X} \pm SD$)			p (so với chứng)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống	35,0 $\pm$ 5,1	34,6 $\pm$ 3,1	37,1 $\pm$ 4,7	> 0,05
Sau uống 4 tuần	30,4 $\pm$ 5,1	32,6 $\pm$ 4,4	35,8 $\pm$ 5,1	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 8 tuần	36,1 $\pm$ 6,3	39,2 $\pm$ 5,7	32,5 $\pm$ 6,1	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 12 tuần	32,6 $\pm$ 5,3	36,5 $\pm$ 4,5	43,2 $\pm$ 11,0	p _{1-chứng} > 0,05 p _{2-chứng} < 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Sau 4, 8 tuần, ở lô trị 1 và lô trị 2, hoạt độ ALT không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

Sau 12 tuần:

- Ở lô trị 1, Hoạt độ ALT không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

- Ở lô trị 2, Hoạt độ ALT tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$) nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với trước khi uống mẫu thử. Tuy nhiên, giá trị ALT bình thường ở chuột cống dao động từ 10 đến 40 IU/L [73] [74]. Như vậy ở lô trị 2, giá trị trung bình ALT chỉ tăng hơn 1 chút so với giới hạn trên của mức bình thường ở chuột cống trắng.

3.2.5. Đánh giá chức năng gan

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của Cao GM đến Bilirubin toàn phần trong máu chuột

Thời gian	Nồng độ bilirubin toàn phần (mmol/L) ($\bar{X} \pm SD$)			p (so với chứng)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống	9,3 $\pm$ 0,7	9,5 $\pm$ 0,8	9,3 $\pm$ 0,7	> 0,05
Sau uống 4 tuần	9,3 $\pm$ 0,7	9,6 $\pm$ 0,8	9,4 $\pm$ 0,7	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 8 tuần	8,9 $\pm$ 0,2	9,1 $\pm$ 0,4	9,2 $\pm$ 0,5	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 12 tuần	9,2 $\pm$ 0,4	9,3 $\pm$ 0,8	9,3 $\pm$ 0,7	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Sau 4, 8 và 12 tuần uống mẫu thử, ở lô trị 1 và lô trị 2 nồng độ bilirubin toàn phần không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của Cao GM đến Albumin trong máu chuột

Thời gian	Nồng độ albumin (g/dL) ($\bar{X} \pm SD$)			p (so với chứng)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống	3,6 $\pm$ 0,3	3,4 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 0,2	> 0,05
Sau uống 4 tuần	3,4 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,2	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 8 tuần	3,4 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,2	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 12 tuần	3,4 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,3	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Sau 4, 8 và 12 tuần uống mẫu thử, ở lô trị 1 và lô trị 2 nồng độ albumin không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của Cao GM đến nồng độ Cholesterol toàn phần trong máu chuột

Thời gian	Nồng độ cholesterol toàn phần (mg/dL) ($\bar{X} \pm SD$)			p (so với chứng)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống	52,8 $\pm$ 10,0	53,8 $\pm$ 7,5	58,4 $\pm$ 11,0	> 0,05
Sau uống 4 tuần	59,8 $\pm$ 9,3	59,7 $\pm$ 9,5	60,1 $\pm$ 11,1	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 8 tuần	53,2 $\pm$ 5,1	56,8 $\pm$ 6,5	57,5 $\pm$ 6,5	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 12 tuần	55,4 $\pm$ 5,7	55,7 $\pm$ 6,5	53,0 $\pm$ 7,6	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Sau 4, 8 và 12 tuần uống mẫu thử, ở lô trị 1 và lô trị 2 nồng độ cholesterol toàn phần không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

3.2.6. Đánh giá chức năng thận

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của Cao GM đến Creatinin trong máu chuột

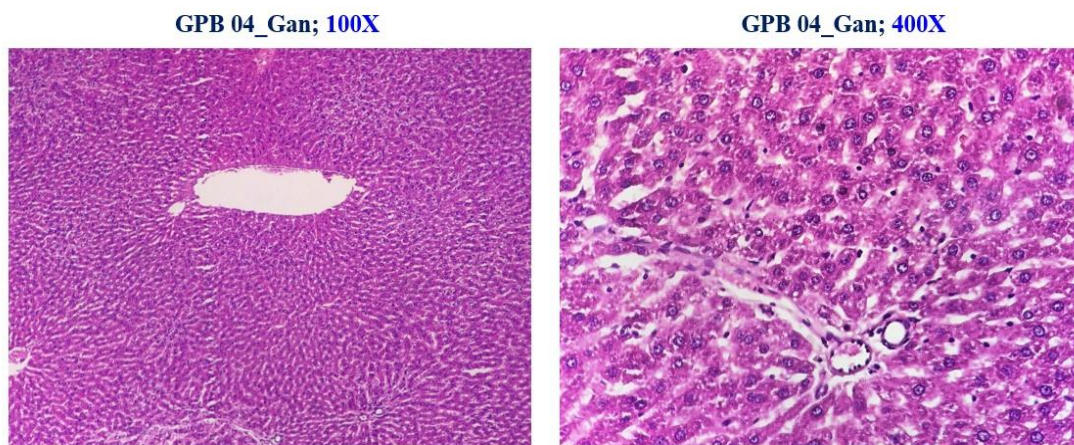
Thời gian	Nồng độ creatinin (mg/dL) ($\bar{X} \pm SD$)			P (so với chứng)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống	77,6 $\pm$ 5,1	77,4 $\pm$ 7,0	78,0 $\pm$ 7,1	> 0,05
Sau uống 4 tuần	73,7 $\pm$ 6,1	75,7 $\pm$ 6,5	78,4 $\pm$ 9,1	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 8 tuần	74,8 $\pm$ 6,6	71,9 $\pm$ 6,8	73,7 $\pm$ 7,0	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau uống 12 tuần	73,2 $\pm$ 5,5	76,6 $\pm$ 7,4	75,4 $\pm$ 7,4	> 0,05
p (test trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Sau 4, 8 và 12 tuần uống mẫu thử, ở cả lô trị 1 (uống mẫu Cao GM liều 1,2g/kg/ngày) và lô trị 2 (uống mẫu Cao GM liều 3,6g/kg/ngày), thấy nồng độ creatinin trong máu chuột không có sự thay đổi khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

3.2.7. Đánh giá hình thái và cấu trúc vi thể gan, thận của chuột:

* **Hình thái đại thể của gan và thận:** Ở tất cả các chuột thực nghiệm, bao gồm cả lô chứng và hai lô trị, không phát hiện bất kỳ thay đổi bệnh lý nào về đại thể ở gan và thận.

* **Hình thái vi thể gan:**



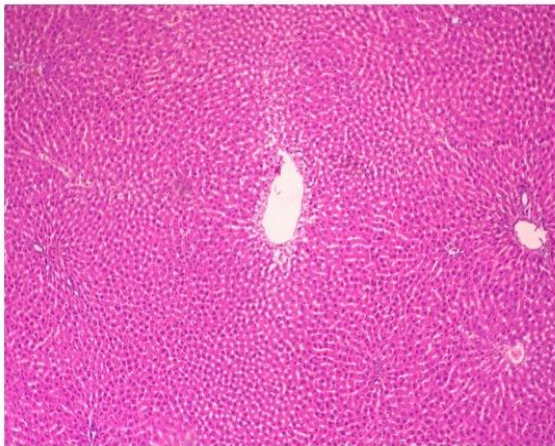
Hình 3.1: Hình thái vi thể gan ở chuột lô chứng

(HE x 100 và HE x 400)

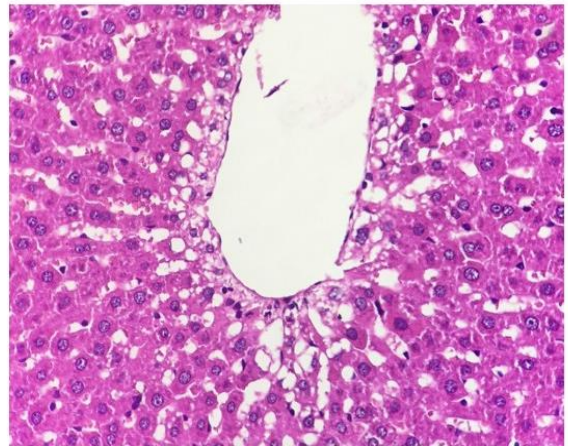
(HE x 100: Nhuộm Hematoxylin - Eosin, độ phóng đại 100 lần)

HE x 400: Nhuộm Hematoxylin - Eosin, độ phóng đại 400 lần)

GPB 25_Gan; 100X

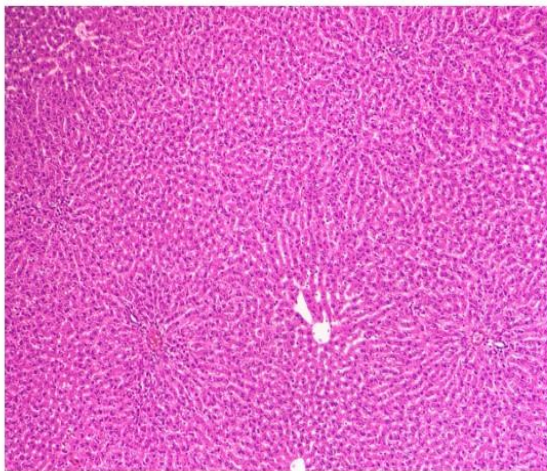


GPB 25_Gan; 400X

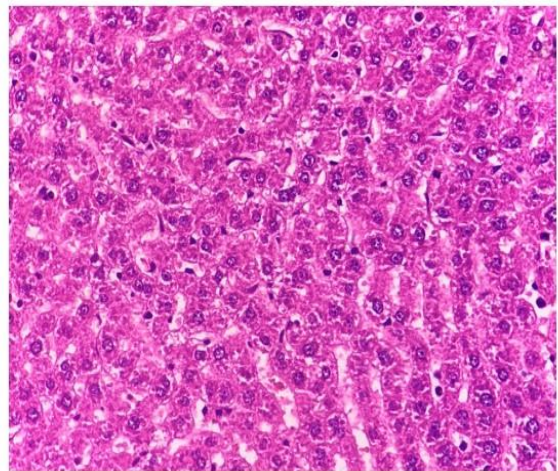


Hình 3.2: Hình thái vi thể gan chuột lô trị 1 sau 12 tuần uống mẫu thử
(HE x 100 và HE x 400)

GPB 23_Gan; 100X



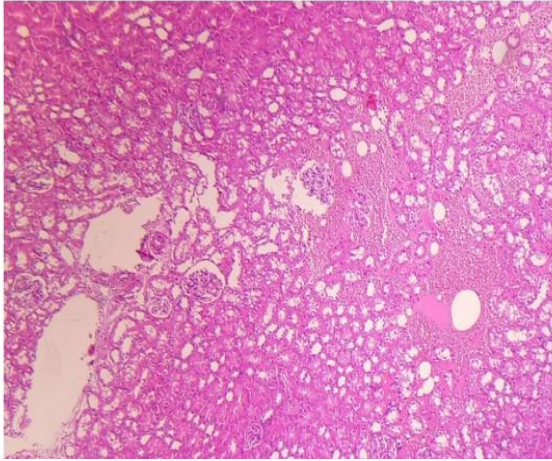
GPB 23_Gan; 400X



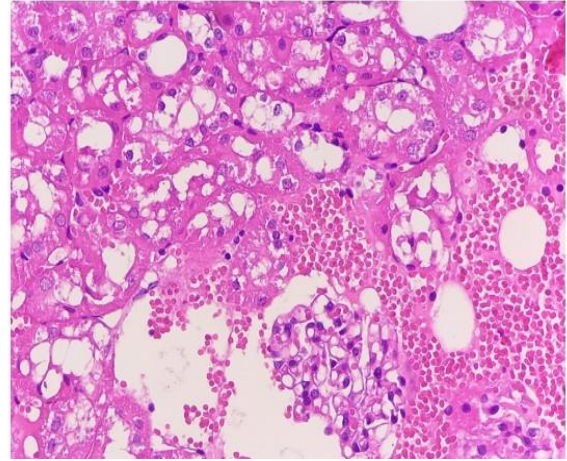
Hình 3.3: Hình thái vi thể gan chuột lô trị 2 sau 12 tuần uống mẫu thử
(HE x 100 và HE x 400)

*** Hình thái vi thể thận:**

GPB 04_Thận; 100X

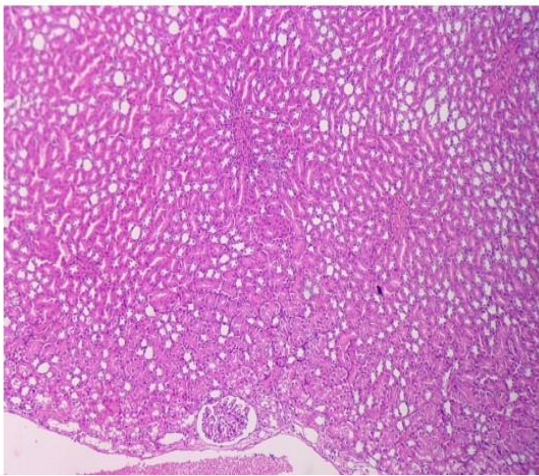


GPB 04_Thận; 400X

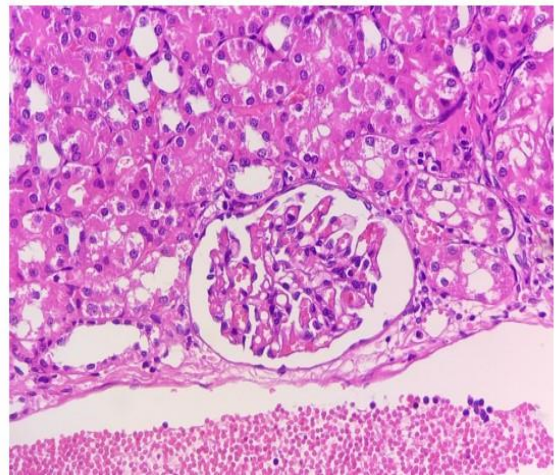


Hình 3.4: Hình thái vi thể thận chuột lô chứng
(HE x 100 và HE x 400)

GPB 25_Thận; 100X



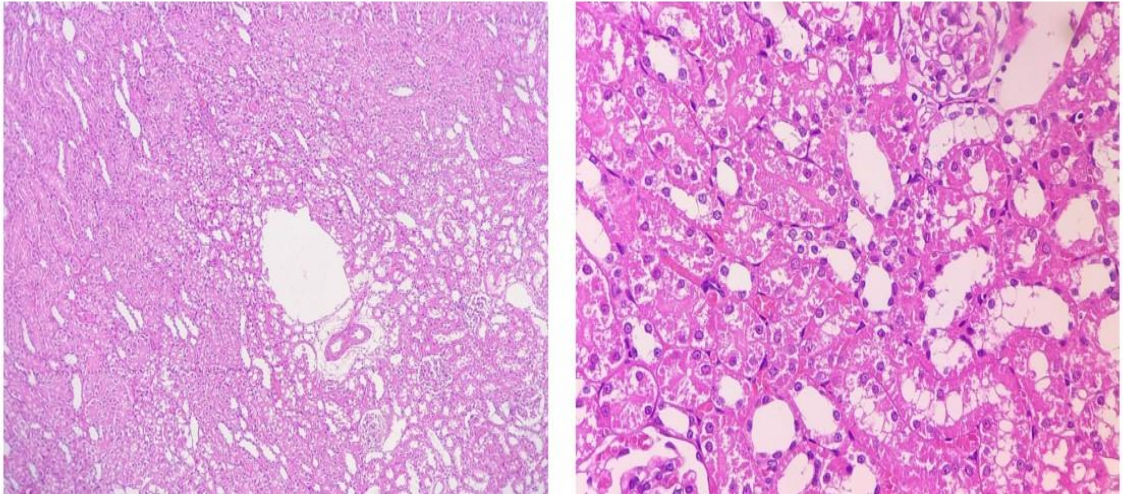
GPB 25_Thận; 400X



Hình 3.5: Hình thái vi thể thận chuột lô trị 1 sau 12 tuần uống mẫu thử
(HE x 100 và HE x 400)

GPB 18_Thận; 100X

GPB 18_Thận; 400X



Hình 3.6: Hình thái vi thể thận chuột lô trị 2 sau 12 tuần uống mẫu thử
(HE x 100 và HE x 400)

Kết luận về giải phẫu bệnh: Sau 12 tuần uống mẫu thử, ở lô trị 1 và lô trị 2, cấu trúc vi thể gan và thận không có sự khác biệt so với lô chứng sinh học.

3.3. Kết quả đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cao GM Tuệ Tĩnh

3.3.1. Ảnh hưởng của cao dược liệu Cao GM lên hoạt độ các enzym AST, ALT và chỉ số gan

Kết quả được trình bày ở bảng 3.16; 3.17

Bảng 3.16. Hoạt độ AST và ALT ở các lô nghiên cứu

Lô	n	Hoạt độ AST (IU/l)	% giảm so với (2)	Hoạt độ ALT (IU/l)	% giảm so với (2)
1: Chứng sinh lý	10	42 ± 74		57 ± 16	
2: Chứng bệnh lý	10	1232 ± 261		1065 ± 121	
3: Uống silymarin 70mg/kg	10	861 ± 121	30,11	554 ± 170	47,97
4: Uống Cao GM liều thấp (2,4g/kg/ngày)	10	1045 ± 214	15,18	922 ± 202	13,43
5: Uống Cao GM liều cao (7,2g/kg/ngày)	10	788 ± 148	36,06	497 ± 246	53,33
p	p _{2,3,4,5-1} < 0,05; p _{3,4,5-2} < 0,05 ; p ₃₋₄ < 0,05, p ₃₋₅ > 0,05, p ₄₋₅ < 0,05				

Kết quả ở bảng 3.16 cho thấy:

- Hoạt độ enzym ở tất cả các lô có gây độc đều tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh lý ($p < 0,05$).
- Hoạt độ enzym AST và ALT ở 2 lô dùng Cao GM đều giảm so với lô chứng bệnh lý, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.
- Giữa lô Cao GM liều thấp và cao thấy, ở liều cao hoạt độ enzym giảm rõ rệt so với liều thấp, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.
- So với silymarin liều 70 mg/kg, Cao GM liều thấp có tác dụng yếu hơn ($p < 0,05$), còn Cao GM liều cao có tác dụng tương tự.

Bảng 3.17. Chỉ số gan ở các lô nghiên cứu

Lô	n	Chỉ số gan (%)
1: Chứng sinh lý	10	$4,02 \pm 0,42$
2: Chứng bệnh lý	10	$3,99 \pm 0,51$
3: Uống silymarin 70mg/kg	10	$4,39 \pm 0,39$
4: Uống Cao GM liều thấp (2,4g/kg/ngày)	10	$4,64 \pm 0,32$
5: Uống Cao GM liều cao (7,2g/kg/ngày)	10	$4,19 \pm 0,44$
p		$P > 0,05$

Kết quả ở bảng 3.17 cho thấy:

Sự thay đổi về chỉ số gan giữa các lô không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

3.3.2. Ảnh hưởng của Cao GM lên nồng độ MDA, GSH trong dịch đồng thể gan chuột gây độc bằng CCl₄

Kết quả định lượng nồng độ MDA và GSH được trình bày ở bảng 3.18.

Bảng 3.18. Nồng độ MDA và GSH dịch đồng thể gan ở các lô nghiên cứu

Lô	n	MDA (mmol/g tổ chức)	GSH (mg/g tổ chức)
1: Chứng sinh lý	10	15,00 ± 1,10	1,01 ± 0,02
2: Chứng bệnh lý	10	24,89 ± 3,24	0,65 ± 0,18
3: Uống silymarin 70mg/kg	10	17,94 ± 4,02	0,89 ± 3,47
4: Uống Cao GM liều thấp (2,4g/kg/ngày)	10	19,51 ± 3,50	0,87 ± 0,19
5: Uống Cao GM liều cao (7,2g/kg/ngày)	10	18,65 ± 2,79	0,93 ± 0,09
p	p _{2,3,4,5-1} < 0,01; p _{3,4,5-2} < 0,05 ; p ₃₋₄ > 0,05, p ₃₋₅ > 0,05, p ₄₋₅ > 0,05		

Kết quả ở bảng 3.18 cho thấy:

- Các lô gây độc, nồng độ MDA tăng mạnh, đồng thời nồng độ GSH giảm mạnh so với lô chứng sinh lý. Sự khác biệt giữa có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.
- Các lô dùng Cao GM hoặc silymarin trước khi gây độc nồng độ MDA giảm và nồng độ GSH tăng so với lô chứng bệnh lý không dùng thuốc. Tuy nhiên, nồng độ MDA và GSH chưa đạt bằng lô chứng sinh lý. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.
- So sánh giữa lô dùng silymarin liều 70mg/kg và lô dùng Cao GM liều thấp và cao không thấy có sự khác biệt ($p > 0,05$).

3.3.3. Ảnh hưởng của Cao GM đến hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột được gây độc bằng CCl_4

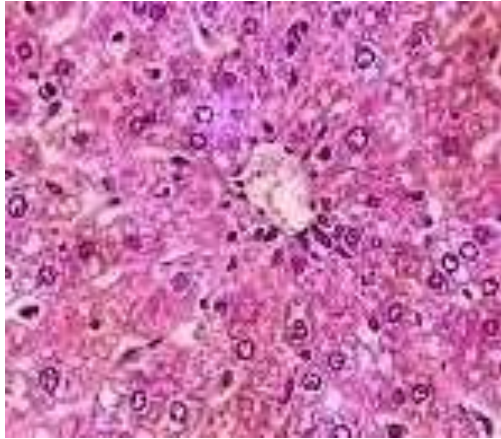
Bảng 3.19. Đặc điểm mô bệnh học đại thể của gan chuột

Lô nghiên cứu	Hình ảnh đại thể
1: Chứng sinh lý	Gan màu đỏ, mật độ mềm, mặt nhẵn, không phù nề, không sung huyết.
2: Chứng bệnh lý	Gan bị bạc màu rõ, phù nề sung huyết, bề mặt sần sùi, có các chấm sung huyết, có nhiều điểm tổn thương trên bề mặt.
3: Silymarin 70mg/kg	Gan màu đỏ, ít bạc màu hơn, bề mặt ít sần sùi rải rác, có điểm tổn thương và sung huyết nhẹ.
4: Uống Cao GM liều thấp (2,4g/kg/ngày)	Gan màu đỏ, ít bạc màu hơn, tuy nhiên vẫn còn có điểm tổn thương và sung huyết, bề mặt ít sần sùi
5: Uống Cao GM liều cao (7,2g/kg/ngày)	Gan màu đỏ, ít bạc màu, các điểm tổn thương giảm rõ, bề mặt ít sần sùi, chỉ còn ít điểm sung huyết.

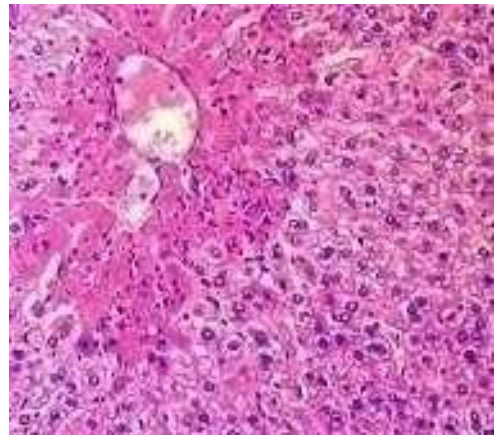
Nhận xét: Về mặt hình ảnh đại thể, so với lô chứng bệnh lý thì các lô dung lô Cao GM và Silymarin thấy biểu hiện tổn thương gan giảm (gan màu đỏ và mềm hơn, ít tổn thương và sung huyết hơn).

*** Hình ảnh vi thể gan chuột**

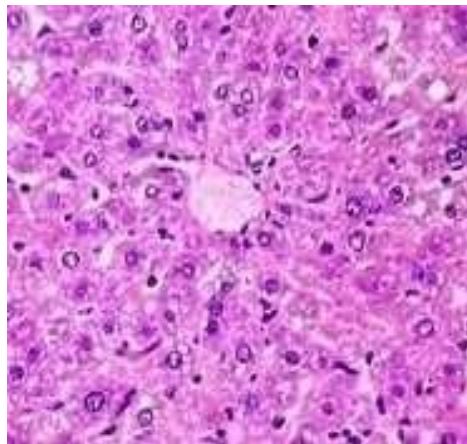
(HE x 100: Nhuộm Hematoxylin - Eosin, độ phóng đại 100 lần)



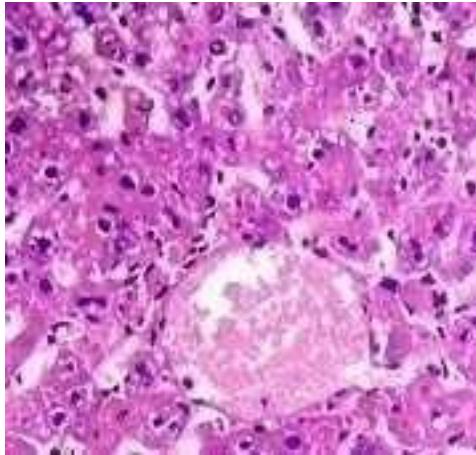
**Hình 3.7. Hình ảnh vi thể gan
lô chứng sinh lý (HE x100)**



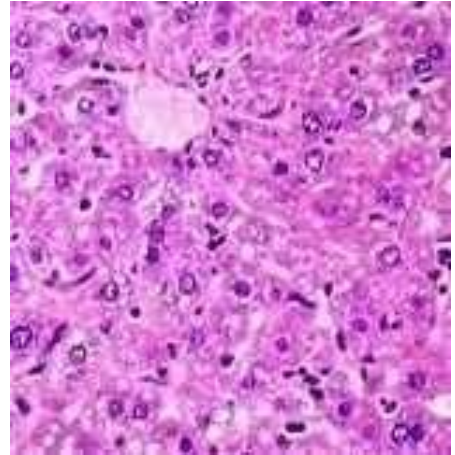
**Hình 3.8. Hình ảnh vi thể gan
lô chứng bệnh lý (HE x100)**



**Hình 3.9. Hình ảnh vi thể gan lô chứng
dương (HE x100)**



**Hình 3.10. Hình ảnh vi thể gan
lô Cao GM liều thấp (2,4g/kg/ngày)
(HE x100)**



**Hình 3.11. Hình ảnh vi thể gan
lô Cao GM liều cao (7,2g/kg/ngày)
(HE x100)**

Kết quả nghiên cứu hình ảnh vi phẫu tế bào gan giữa các lô cho thấy:

- Hình ảnh mô bệnh học gan bình thường, không có tổn thương thoái hóa tế bào gan, khoảng cửa bình thường ở lô chứng sinh lý
- Gan bị tổn thương rõ với hình ảnh nhiều tế bào gan bị hoại tử ở quanh khoảng cửa ở lô chứng bệnh lý không dùng silymarin hay Cao GM
- Hình ảnh vi thể được cải thiện rõ, mức độ hoại tử giảm, thoái hóa không hoại tử cũng giảm ở lô dùng silymarin hoặc Cao GM

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Bàn luận về độc tính của Cao GM Tuệ Tĩnh

4.1.1. Bàn luận về độc tính cấp của Cao GM Tuệ Tĩnh

Trước khi một loại thuốc mới được ứng dụng trong điều trị cho người bệnh, việc kiểm định tính an toàn của thuốc là yêu cầu tiên quyết. Cao GM Tuệ Tĩnh là chế phẩm dùng đường uống, có mục đích bảo vệ chức năng gan. Để có cơ sở khoa học cho việc sử dụng chế phẩm này trong điều trị, chúng tôi tiến hành thực hiện nghiên cứu độc tính cấp với mục tiêu đánh giá mức độ an toàn, cũng như khảo sát tác dụng dược lý (tác dụng bảo vệ gan) trên thực nghiệm.

Một bước quan trọng trong quá trình phát triển thuốc mới không thể thiếu đó là đánh giá độc tính trên động vật thực nghiệm, trong đó nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn thường được tiến hành song song. Kết quả từ các nghiên cứu này cung cấp bằng chứng khoa học về độ an toàn của thuốc trước khi thử nghiệm trên người, đồng thời là cơ sở để xác định liều dùng phù hợp trong lâm sàng.

Nghiên cứu độc tính cấp của Cao GM Tuệ Tĩnh được tiến hành bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon.

Đánh giá từ bảng 3.1 cho thấy các lô chuột uống Cao GM liều từ 40 ml dung dịch đậm đặc/kg (tương đương 15 gam/kg) đến liều tối đa 70 ml/kg (tương đương 26,25 gam/kg) không ghi nhận biểu hiện độc tính cấp nào. Từ đó tính được liều dung nạp tối đa (Luôn nhỏ hơn liều chết 50%) của Cao GM là 26,25 gam/kg (Tính người trưởng thành 50kg, hệ số ngoại suy trên chuột nhất là 12, liều dung nạp tối đa là 2,19 gam/kg). Trong vòng 72 giờ, với thể tích tối đa chuột có thể dung nạp nhưng không ghi nhận chuột có biểu hiện bất thường hay có chuột nào chết, do đó chưa xác định được liều chết 50% (LD_{50}) của Cao GM. Kết quả trên đã khẳng định tính an toàn của cao GM Tuệ Tĩnh.

4.1.2. Bàn luận về độc tính bán trường diễn của Cao GM Tuệ Tĩnh

Mặc dù kết quả về độc tính cấp cho thấy Cao GM không gây biểu hiện ngộ độc cấp tính, song chưa đủ cơ sở để loại trừ khả năng xuất hiện độc tính khi sử dụng kéo dài. Do đó, cần tiếp tục thực hiện nghiên cứu độc tính bán trường diễn để có thể đánh giá toàn diện tính an toàn. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của Cao GM Tuệ Tĩnh được tiến hành trên chuột cống trắng. Đánh giá kết quả độc tính bán trường diễn được biểu hiện qua theo dõi các chỉ số về toàn trạng chuột, hóa sinh máu, chỉ số huyết học, đánh giá chức năng gan, thận và đặc điểm giải phẫu bệnh của gan, thận. Các chỉ số theo dõi được kiểm tra vào trước lúc uống, sau 4, 8 và 12 tuần cho uống Cao GM.

4.1.2.1. Ảnh hưởng lên tình trạng chung, thể trọng của chuột.

Sau 8 và 12 tuần, lô trị 1 và lô trị 2, trọng lượng chuột ở lô chứng sinh học đều tăng, có ý nghĩa thống kê so với trước khi uống mẫu thử ($p < 0,05$). Chuột ở lô chứng và Cao GM cả 2 liều hoạt động bình thường, mắt sáng, nhanh nhẹn, lông mượt, ăn uống tốt, phân khô. Điều này phù hợp với sự sinh trưởng bình thường của chuột trong điều kiện nuôi nhốt.

4.1.2.2. Đánh giá chức phận tạo máu của chuột nghiên cứu

Máu là một tổ chức có vai trò đặc biệt quan trọng, vì nó liên quan mật thiết đến mọi cơ quan và hệ thống trong cơ thể. Về mặt bệnh lý, thành phần máu chịu ảnh hưởng của các cơ quan này, đồng thời cũng phản ánh tình trạng hoạt động của hệ tạo máu [75]. Do đó, khi thuốc hoặc chế phẩm có tác động đến cơ quan tạo máu, những thay đổi đầu tiên thường biểu hiện qua các chỉ số huyết học. Vì vậy, trong nghiên cứu này, các chỉ số như số lượng hồng cầu, thể tích trung bình hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit, số lượng và công thức bạch cầu, cùng số lượng tiểu cầu của chuột thí nghiệm đã được xác định nhằm đánh giá ảnh hưởng của thuốc đến hệ tạo máu.

Từ bảng từ 3.3 đến bảng 3.9 đều cho thấy sau 4, 8 và 12 tuần uống Cao GM, ở lô trị 1 và lô trị 2, các chỉ số không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

4.1.2.3. Đánh giá mức độ tổn thương gan của chuột nghiên cứu.

Gan là cơ quan nội tạng lớn nhất cơ thể và giữ vai trò quan trọng tiêu hóa, hấp thu, chuyển hóa các chất cũng như khử độc và đào thải các chất ra khỏi cơ thể. Do đảm nhiệm chức năng chuyển hóa là ngõ cửa của các chất vào cơ thể nên khi đưa thuốc vào cơ thể cơ thể sẽ gây độc cho gan, làm ảnh hưởng đến chức năng gan [75]. Do đó, khi đánh giá độc tính của thuốc, việc nghiên cứu tác động của thuốc lên chức năng gan là rất quan trọng. Để xác định mức độ tổn thương tế bào gan, người ta thường đo hoạt độ các enzym đặc trưng có nguồn gốc từ gan trong huyết thanh. Sự tăng nồng độ của các enzym này phản ánh tình trạng tổn thương ở tế bào gan.

Nồng độ 2 enzym ALT, AST trong tế bào gan là như nhau nhưng vị trí phân bố trong tế bào lại khác nhau. AST có trong tế bào chất và cả ty thể (70% ở trong ty thể) còn ALT thì chỉ có ở tế bào chất, mặt khác nửa đời sống của ALT (47 giờ) cao hơn AST (17 giờ). Do đó khi có tổn thương hủy hoại tế bào gan thì hoạt độ của ALT thường tăng cao hơn, trong trường hợp tổn thương tế bào gan ở mức độ dưới tế bào, AST trong ty thể được giải phóng ra, khi đó hoạt độ AST sẽ tăng cao hơn. Vì vậy trong viêm gan nói chung hoạt độ ALT luôn tăng cao hơn AST [76]. Trong nghiên cứu này, sau 4, 8 tuần uống CAO GM, hoạt độ ALT (bảng 3.11) và hoạt độ AST (bảng 3.10) trong máu chuột ở hai lô trị không thay đổi so với lô chứng và không đổi giữa trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$). Sau 12 tuần, ở lô trị 1 và lô trị 2, hoạt độ AST tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, cũng như so sánh giữa trước và sau khi uống mẫu thử ($p < 0,001$), tuy vậy, giá trị AST vẫn nằm

trong giới hạn bình thường ở chuột cống. Đối với hoạt độ ALT, ở lô 1 (liều 1,2 gam/kg/ngày) không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$), ở lô 2 (liều 3,6 gam/kg/ngày) thấy hoạt độ ALT tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$) nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với trước khi uống mẫu thử. Giá trị ALT bình thường ở chuột cống dao động từ 10 đến 40 IU/L. Như vậy giá trị trung bình ALT ở lô trị 2 chỉ tăng không đáng kể so với giới hạn trên của mức bình thường ở chuột cống trắng [73]. Như vậy ở lô trị 1 và lô trị 2, hoạt độ AST, ALT vẫn nằm trong giới hạn bình thường sau 12 tuần.

Đánh giá chức năng gan thông qua hàm lượng albumin, bilirubin toàn phần và cholesterol. Kết quả cho thấy, hàm lượng 3 chỉ số trên trong máu chuột không thay đổi sau 4, 8 và 12 tuần uống thuốc. Điều đó chứng tỏ khả năng tổng hợp, chuyển hóa protid, lipid và bài tiết mật của gan không bị ảnh hưởng khi uống Cao GM liên tục trong 12 tuần, vậy nên Cao GM liều 1,2 gam/ kg/ ngày và liều 3,6 gam/kg/ngày không ảnh hưởng tới chức năng gan.

4.1.2.4. Đánh giá chức năng thận của chuột nghiên cứu.

Thận là cơ quan thuộc hệ tiết niệu, có vai trò đặc biệt quan trọng trong việc duy trì hằng định nội môi của cơ thể thông qua chức năng lọc máu, bài tiết các chất chuyển hóa và điều hòa cân bằng nước – điện giải. Tuy nhiên, thận cũng là cơ quan dễ bị tổn thương do ảnh hưởng của các chất độc nội sinh và ngoại sinh. Việc sử dụng thuốc hoặc các chế phẩm hóa học có thể gây tổn thương thận, dẫn đến suy giảm hoặc rối loạn chức năng thận. Để đánh giá chức năng của thận, chúng ta định lượng nồng độ creatinin trong huyết thanh [75]. Creatinin là một sản phẩm chuyển hóa của creatin trong cơ, được xem là thành phần đậm có nồng độ ổn định nhất trong máu, hầu như không bị ảnh hưởng bởi chế độ ăn uống hay các thay đổi sinh lý thông thường, mà chủ yếu phụ thuộc vào khả năng lọc của cầu thận. Khi chức năng cầu thận bị tổn

thương, nồng độ creatinin huyết thanh tăng, do đó, định lượng creatinin huyết thanh hiện nay được xem là chỉ số đáng tin cậy và có giá trị hơn ure trong đánh giá chức năng thận.

Kết quả ở bảng 3.15 cho thấy, sau 4, 8 và 12 tuần uống mẫu thử, ở cả lô trị 1 (uống Cao GM liều 1,2g/kg/ngày) và lô trị 2 (uống Cao GM liều 3,6g/kg/ngày), nồng độ creatinin trong máu chuột không có sự thay đổi khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng, cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

4.2. Bàn luận về tác dụng bảo vệ gan của Cao GM Tuệ Tĩnh

Để gây tổn thương gan trên thực nghiệm, người ta dùng nhiều chất hóa học khác nhau như paracetamol, carbontetraclohid, D-galactosamin, ethanol erythromycin estolat, aflatoxin B, thioacetamid...[77]. Khi gây tổn thương tế bào gan, làm tăng hoạt độ AST, ALT trong huyết tương, làm tăng nồng độ MDA, giảm nồng độ GSH trong dịch đồng thể gan và làm biến đổi cấu trúc gan.

Để đánh giá mức độ hủy hoại tế bào gan, người ta thường định lượng hoạt độ của các enzym có nguồn gốc tại gan trong huyết thanh. AST (aspartat aminotransferase) và ALT (alanin aminotransferase) là 2 enzym được sử dụng rộng rãi trong đánh giá tổn thương tế bào gan. Khi thuốc gây độc tính hủy hoại tế bào gan, hoạt độ các enzym này sẽ tăng lên. ALT là enzym đặc hiệu trong tổn thương gan, chỉ có ở trong bào tương, đặc biệt là tế bào gan. Khác với ALT, AST còn khu trú nhiều trong ty thể và ít hơn ở ngoài bào tương. Khi tổn thương ở mức độ dưới tế bào, AST trong ty thể được giải phóng ra ngoài và tăng cao trong huyết thanh. Vì vậy, trong tổn thương gan, hoạt độ ALT thường tăng cao hơn AST [78].

Glutathione (GSH) là một tripeptide nội sinh có vai trò quan trọng trong hệ thống bảo vệ chống oxy hóa của tế bào gan. Trong điều kiện stress oxy hóa do các tác nhân gây độc như CCl_4 , nồng độ GSH trong gan thường giảm rõ rệt. Việc đánh giá nồng độ GSH cho phép phản ánh mức độ tổn thương gan và khả năng hồi phục chức năng chống oxy hóa nội sinh [79] [80].

Khi một thuốc nghiên cứu có tác dụng chống oxy hóa (dọn gốc tự do) có thể làm giảm hàm lượng MDA, góp phần bảo vệ tế bào trong đó có tế bào gan. Do vậy, MDA là một chỉ số để đánh giá tác dụng bảo vệ gan của thuốc thử [81].

4.2.1. Cao GM Tuệ Tĩnh liều 2,4gam/kg/ngày

Qua bảng 3.16 cho thấy, hoạt độ AST ở lô uống Cao GM liều 2,4 gam/kg/ngày giảm so với lô mô hình, giảm 15,18% so với mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$, tuy nhiên mức giảm thấp hơn so với silymarin liều 70mg/kg với mức giảm 30,11%. Hoạt độ ALT giảm so với lô mô hình, giảm 13,43% so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$, trong khi đó lô silymarin 70mg/kg giảm nhiều hơn, giảm 47,97% so với lô mô hình. Như vậy so với liều silymarin liều 70mg/kg, Cao GM liều thấp có tác dụng yếu hơn ($p < 0,05$).

Qua bảng 3.18 cho thấy, so với lô chứng bệnh lý không dùng thuốc, các lô dùng Cao GM liều thấp hoặc silymarin trước khi gây độc nồng độ MDA giảm và nồng độ GSH tăng. Tuy nhiên, nồng độ MDA và GSH chưa đạt bằng lô chứng sinh lý. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. So với lô dùng silymarin thì lô dùng Cao GM liều thấp không có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Về hình ảnh đại thể của gan, với những chuột gây độc bằng CCl_4 kết hợp dùng Cao GM liều 2,4gam/kg/ngày thì gan màu đỏ, ít bạc màu hơn, rải rác có điểm tổn thương và sung huyết nhẹ, bề mặt ít sần sùi. Có sự thay đổi so với lô mô hình: Gan bị bạc màu rõ, phù nề sung huyết, bề mặt sần sùi, có các chấm sung huyết, có nhiều điểm tổn thương trên bề mặt. Với hình ảnh vi thể gan, ở lô dùng Cao GM hay silymarin, hình ảnh vi thể được cải thiện rõ, mức độ hoại tử giảm, thoái hóa không hoại tử cũng giảm.

Chế phẩm Cao GM Tuệ Tĩnh khi phối hợp bởi 5 loại dược liệu Diệp hạ châu, Giảo cổ lam, Cà Gai leo, Râu mèo, Nga truật thấy có tác dụng bảo vệ gan với liều thấp là 2,4 gam/kg/ngày.

4.2.2. Cao GM Tuệ Tĩnh liều 7,2 gam/kg/ngày

Qua bảng 3.16 cho thấy, hoạt độ AST ở lô uống Cao GM liều 7,2 gam/kg/ngày giảm so với lô mô hình, giảm 36,06% so với mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$, mức giảm cao hơn so với silymarin liều 70mg/kg với mức giảm 30,11%. Hoạt độ ALT giảm so với lô mô hình, giảm 53,33% so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$, trong khi đó lô silymarin 70mg/kg giảm nhiều hơn, giảm 47,97% so với lô mô hình. Như vậy so với liều silymarin liều 70mg/kg, Cao GM liều thấp có tác dụng tương tự ($p < 0,05$).

Qua bảng 3.18 cho thấy, so với lô chứng bệnh lý không dùng thuốc, các lô dùng Cao GM liều cao trước khi gây độc nồng độ MDA giảm và nồng độ GSH tăng. Tuy nhiên, nồng độ MDA và GSH chưa đạt bằng lô chứng sinh lý. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. So với lô dùng silymarin thì lô dùng Cao GM liều cao không có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Đối với hình ảnh đại thể gan, so với lô mô hình thì lô uống Cao GM liều cao có sự thay đổi rõ nét hơn: Gan màu đỏ, ít bạc màu, các điểm tổn thương giảm rõ, chỉ còn ít điểm sung huyết, bề mặt ít sần sùi. Đối với hình ảnh vi thể được cải thiện rõ, mức độ hoại tử giảm, thoái hóa không hoại tử cũng giảm.

Từ kết quả nghiên cứu về tác dụng bảo vệ gan của Cao GM Tuệ Tĩnh thấy khi phối hợp 5 loại dược liệu Diệp hạ châu, Giảo cổ lam, Cà Gai leo, Râu mèo, Nga truật có tác dụng bảo vệ gan tốt hơn khi dùng từng loại đơn độc, kết quả được so sánh với một số công trình khoa học trước đó của các tác giả khi nghiên cứu đơn độc tác dụng của từng loại.

Đề tài ‘Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cây cà gai leo trên mô hình gây tổn thương gan bằng Paracetamol ở chuột nhắt trắng’ của Trương Thị Thu Hiền và Hoàng Anh Tuấn (Học viện Quân Y) cho thấy cây cà gai leo ở

liều 10 g dược liệu khô/kg thể trọng/ngày có khả năng bảo vệ gan. Tác dụng này được thể hiện qua việc làm giảm hoạt tính AST, ALT và giảm một phần tổn thương gan do paracetamol gây ra trên mô hình chuột nhắt trắng. Đặc biệt, cao methanol của cây cà gai leo ở liều 10 g/kg thể trọng có tác dụng bảo vệ gan tương đương với chất đối chứng tham khảo là silymarin ở liều 50 mg/kg thể trọng [82].

Công trình nghiên cứu tại Viện Dược liệu - Việt Nam (1987 - 2000) cho thấy khi dùng liều 10 - 50g/kg, Diệp hạ châu có tác dụng trên chuột thí nghiệm [30].

Đề tài “*Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan, chống oxy hóa của saponin chiết xuất từ giảo cổ lam trên mô hình gây độc tế bào gan chuột bằng paracetamol*” của tác giả Thân Kiều My, Phạm Thanh Tùng, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Trọng Thông đã chứng minh với liều 200 mg/kg và 600 mg/kg có tác dụng hạn chế tổn thương tế bào gan thông qua hạn chế trọng lượng gan tương đối và hoạt độ AST, ALT, làm giảm nồng độ MDA trong dịch đồng thể gan. Tác dụng này của saponin ở liều 200 mg/kg tốt hơn liều 600 mg/kg và tương đương với silymarin liều 70 mg/kg [83].

Bài báo “*Thử nghiệm tác dụng bảo vệ gan của cao chiết râu mèo và nghệ lông dày trên mô hình gan chuột bị nhiễm độc CCl₄ mãn tính*” của tác giả Nguyễn Ngọc Hồng, Huỳnh Ngọc Thụy (Đại học Y dược thành phố Hồ Chí Minh) đã chứng minh với cùng liều 16mg/kg, dịch chiết cây râu mèo đã làm giảm 55% hoạt tính ALT trong huyết tương so với chứng độc [84].

Cao GM Tuệ Tĩnh liều 7,2 gam/kg/ngày có tác dụng bảo vệ gan tốt hơn so với liều thấp là 2,4 gam/kg/ngày.

4.2.3. Bàn luận về “Cao GM Tuệ Tĩnh” theo lý luận YHCT

Bài thuốc được chiết xuất từ các loại dược liệu Diệp hạ châu, Giảo cổ lam, Cà gai leo, Nga truyệt, Râu mèo có tác dụng bảo vệ gan.

Diệp hạ châu vị đắng, tính mát nổi bật có tác dụng thanh nhiệt, giải độc, tiêu viêm, hỗ trợ tái tạo tế bào gan làm Quân. Cà gai leo, Giảo cổ lam là vị Thân, có vai trò thanh nhiệt, giải độc, hóa ứ, tiêu viêm, bảo vệ tế bào gan, hỗ trợ điều trị xơ gan và viêm gan, hỗ trợ và tăng cường tác dụng thanh nhiệt, giải độc, bảo vệ gan của vị Quân. Nga truật có tác dụng hành khí, phá huyết, hóa ứ, tiêu trệ giúp tăng cường lưu thông khí huyết, giảm ứ trệ gây tổn thương gan. Râu mèo có tác dụng lợi tiểu, thanh nhiệt, tiêu thũng giúp hỗ trợ bài tiết độc tố qua đường tiểu, giảm gánh nặng giải độc cho gan. Nga truật và Râu mèo có vai trò là vị Tá. Ngoài ra, Giảo cổ lam và Râu mèo còn dẫn thuốc vào kinh Can, Thân giúp hỗ trợ tăng hiệu quả tác dụng của bài thuốc. tác dụng chính của bài thuốc là bảo vệ gan thông qua cơ chế thanh nhiệt, giải độc, hóa ứ, lợi tiểu, đồng thời hỗ trợ phục hồi chức năng gan và ngăn ngừa tổn thương tế bào gan.

Dựa vào tính vị quy kinh và tác dụng của bài thuốc có thể đưa ra các lưu ý khi sử dụng bài thuốc này. Bài thuốc có vị khô, tính hàn khi sử dụng có thể gây ra rối loạn tiêu hóa, nên khi người bệnh xuất hiện các triệu chứng như người mệt mỏi, uể oải, đại tiện phân lỏng,... thì dừng thuốc. Bài thuốc còn có tác dụng hạ huyết áp, lợi tiểu nên khi sử dụng cũng nên chú ý với bệnh nhân huyết áp thấp. Bài thuốc nhiều vị khô, tính hàn, chủ yếu tác dụng vào tạng can, nên đối với bệnh nhân có tình trạng can hàn thì không nên sử dụng trên bệnh nhân này. Ngoài ra bài thuốc có vị Nga truật là thuốc phá huyết, nên khi sử dụng mà bệnh nhân xuất hiện các triệu chứng của xuất huyết thì dừng thuốc.

KẾT LUẬN

- Kết luận về độc tính cấp: Cao GM Tuệ Tĩnh không gây độc tính cấp trên chuột nhắt trắng ở liều tối đa 26,25 g/kg/ngày (gấp 11 lần liều điều trị dự kiến trên người), chưa xác định được LD₅₀, chứng tỏ cao có mức độ an toàn cao khi dùng đường uống.

- Kết luận về độc tính bán trường diễn: Sau khi sử dụng liên tục trong 4–8 tuần, Cao GM Tuệ Tĩnh không gây độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng; tuy nhiên sau 12 tuần có xu hướng tăng nhẹ hoạt độ AST, ALT, cần được theo dõi trong các nghiên cứu dài hạn hơn.

- Kết luận về tác dụng bảo vệ gan: Cao GM Tuệ Tĩnh ở liều 2,4 g/kg/ngày và 7,2 g/kg/ngày có tác dụng bảo vệ gan rõ rệt trên mô hình gây tổn thương gan bằng CCl₄, thể hiện qua việc giảm AST, ALT, MDA, tăng GSH và cải thiện tổn thương mô học gan.

KHUYẾN NGHỊ

Để có thể tiếp tục phát triển Cao GM Tuệ Tĩnh, chúng tôi xin đề xuất một số khuyến nghị sau:

+ Tiếp tục triển khai các nghiên cứu lâm sàng nhằm đánh giá toàn diện hơn tác dụng bảo vệ gan ở người bệnh viêm gan.

+ Phát triển sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe có nguồn gốc từ cao chiết của bài thuốc, với mục tiêu hỗ trợ chức năng gan, tăng cường khả năng giải độc và chống oxy hóa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J., & Kamath, P. S.** (2019). Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*, 70(1), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>
2. **WHO** (2018). World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals, 26/12/2021.
3. **Gish, R. G., Bui, T. D., Nguyen, C. T., Nguyen, D. T., Tran, H. V., Tran, D. M., Trinh, H. N.,** (2012). *Liver disease in Viet Nam: screening, surveillance, management and education: a 5-year plan and call to action. Journal of gastroenterology and hepatology*, 27(2), 238–247.
4. **Sharma, A., & Nagalli, S.** (2024). Chronic Liver Disease. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554597/>
5. **Wang, G., & Duan, Z.** (2021). Guidelines for Prevention and Treatment of Chronic Hepatitis B. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 9(5), 769–791. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00209>
6. **Nsibirwa, S., Anguzu, G., Kamukama, S., Ocama, P., & Nankya-Mutyoba, J.** (2020). Herbal medicine use among patients with viral and non-viral Hepatitis in Uganda: Prevalence, patterns and related factors. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02959-8>
7. **Tung, B. T., Nhung, N. H., Hang, T. T. T., & Linh, V. K.** (2021). Herbal Medicine and Its Bioactive Compounds for Treatment of Hepatitis B. In *Enhancing the Therapeutic Efficacy of Herbal Formulations* (pp. 186–206). IGI Global. <https://www.igi-global.com/chapter/herbal-medicine-and-its-bioactive-compounds-for-treatment-of-hepatitis-b/271865>

8. **Rahman, M. A., Ueda, K., & Honda, T.** (2020). A Traditional Chinese Medicine, Maoto, Suppresses Hepatitis B Virus Production. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 581345. [https://doi.org/ 10.3389/fcimb.2020.581345](https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.581345)
9. **Mai Phương Thảo (Ed.).** (2024). *Sinh lý học y khoa*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, tr 309-331.
10. **Vũ Bằng Đình, Đặng Kim Thanh** (2005). Viêm gan virus và những hậu quả, Nhà xuất bản Y học, 382 - 400.
11. **Vũ Bằng Đình, Đặng Kim Thanh.** (2005). *Viêm gan virus và những hậu quả*. Nhà xuất bản Y học.
12. Trường Đại học Y Hà Nội, *Bệnh học Nội khoa*, Tập 2 (2020). Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, 10-11.
13. **Hyun, J., et al.** (2021). Pathophysiological aspects of alcohol metabolism in the liver. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5717.
14. **Lieber, C. S.** (1990). Mechanism of ethanol induced hepatic injury. *Pharmacology & Therapeutics*, 46(1), 1–41. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90032-W](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90032-W)
15. **Teschke R, Eickhoff A, Schulze J, Danan G.** (2021). *Alcoholic liver disease and the co-triggering role of MEOS with its CYP 2E1 catalytic cycle and ROS*. *Arch Gastroenterol Res*;2(1):9-25.
16. **Chalasani, N., Maddur, H., Russo, M., & Wong, R. J.** (2021). *Drug-induced liver injury: Highlights and controversies in 2021*. *Hepatology Communications*, 5(8), 1363–1379.
17. **Hoofnagle, J. H., & Björnsson, E. S.** (2019). *Drug-induced liver injury – types and phenotypes*. *New England Journal of Medicine*, 381(3), 264–273.
18. **Lee, W. M.** (2003). Drug-Induced Hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine*, 349(5), 474–485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra021844>
19. **Hernández-Macedo DG, Silva-Palacios A, Buelna-Chontal M,**

- Tapia-Rojas C, Pedraza-Chaverri J.** Oxidative stress: signaling pathways, biological functions, and disease. *Compr Physiol.* 2024;14(1):1–44. doi:10.1002/cphy.c230021.
20. **Sharma P, Nandave M, Nandave D, et al.** Reactive oxygen species (ROS)-mediated oxidative stress in chronic liver diseases and its mitigation by medicinal plants. *Am J Transl Res.* 2023;15(11):6321–6341.
21. **Kumar S, Srivastava VK, Kaushik S, et al.** Free radicals, mitochondrial dysfunction and sepsis-induced organ dysfunction: a mechanistic insight. *Curr Pharm Des.* 2024;30(3):161–168. doi:10.2174/.
22. **Nguyễn Thị Hà** (1999). *Gốc tự do và các chất chống oxy hóa, những vấn đề hóa sinh học hiện đại*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
23. **Cheeseman, K. H., & Slater, T. F.** (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625>
24. **Burton, G. J., & Jauniaux, E.** (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
25. **Li, D., & Friedman, S. L.** (1999). Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: New insights and prospects for therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14(7), 618–633. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.1999.01928.x>
26. **Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N.** (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
27. Học viện Quân y (2012). *Bệnh học Y học cổ truyền (Dùng cho sau đại*

- học). Nhà xuất bản Y học. (pp. 235–246).
28. Khoa Y học cổ truyền, Trường Đại học Y Hà Nội (2017), Bệnh học nội Khoa Y học cổ truyền, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 412– 421.
 29. **Hải Thượng Lãn Ông - Lê Hữu Trác** (2012). Hải Thượng y tông tâm lĩnh. Nhà xuất bản Y học Hà Nội.
 30. **Đỗ Tất Lợi** (2022). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học.
 31. **Nguyễn Thị Tuyết Mai** (2006). *Nghiên cứu tác dụng bảo vệ và phục hồi tổn thương gan cấp của curcuminoid trên thực nghiệm* [PhD Thesis]. Luận văn Thạc sỹ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
 32. Viện Dược Liệu. (2016). *Danh lục cây thuốc Việt Nam* (p. 326). Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật.
 33. Bộ Y tế (2017). *Dược điển Việt Nam V*. Nhà xuất bản Y học.
 34. **Nguyễn Thị Bích Thu** (2002). Nghiên cứu cây cà gai leo làm thuốc chống viêm gan và ức chế xơ gan, Luận án tiến sỹ, Viện Dược liệu.
 35. **Nguyễn Xuân Hải, Nguyễn Trung Nhân, Nguyễn Thị Thanh Mai** (2018). Thành phần hóa học của cây cà gai leo (*Solanum procumbens*). Tạp chí phát triển khoa học và công nghệ, 2(6): 134 – 138.
 36. **Nguyễn Minh Khai** (1994). *Nghiên cứu tác dụng của cà gai leo và LH1 trên xơ gan thực nghiệm*. Kỷ yếu công trình khoa học Y dược học. Đại học dược Hà Nội 1988, 31 – 35.
 37. **Su, C., Li, N., Ren, R., Wang, Y., Su, X., Lu, F., Zong, R., Yang, L., & Ma, X.** (2021). Progress in the Medicinal Value, Bioactive Compounds, and Pharmacological Activities of *Gynostemma pentaphyllum*. *Molecules*, 26(20), 6249. <https://doi.org/10.3390/molecules26206249>
 38. **Wang, J., Li, C.-H., Farimani, M. M., & Yang, J.-L.** (2019). Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* and their potential anti-AD activity. *Phytochemistry Letters*, 31, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.03.022>

39. **Zhou, W. C.** (2015). Research on extraction and anti-inflammatory activity of new saponins from *Gynostemma pentaphyllum* seeds. *Yunnan Chem. Technol*, 45, 34–37.
40. **Lou, Y. Y., Mou, L., Huang, Y. P., Zhang, J., Yin, Z. Q., & Pan, K.** (2021). A new cucurbitane-type saponin from *Gynostemma pentaphyllum*. *Chin. Tradit. Herb. Drugs*, 52, 1872–1876.
41. **Xue, J. J., Gao, J. D., Chen, Z. J., Jing, M., Qiao, J., & Liu, X.** (2018). Chemical composition and pharmacological action of *Gynostemma pentaphyllum*. *J. Gansu Univ. Chin. Med*, 35, 86–89.
42. **Ling, Y., Lei, Z., Xinying Li, Yan, X., Siying Wang, Yang, W., Nie, Q., Zhang, Q., Hai'ou Bao, Yu, J., & Jin, H.** (2020). Characterization and Identification of the Chemical Constituents of *Gynostemma pentaphyllum* Using High Performance Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS/MS). *Analytical Letters*, 53(5), 760–773. <https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1675075>
43. **Shen, Z. L., Wang, Z. B., Hou, H. F., Zhang, L., & Huang, J. J.** (2020). New progress in research on chemical constituents, pharmacological effects and application of *Gynostemma pentaphyllum*. *Ginseng Res*, 32, 59–64.
44. **Thân Thị Kiều My** (2010). *Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hoá học và một số tác dụng sinh học của hai loài Giảo Cổ Lam Gynostemma SP. tại Việt Nam* [Luận văn tốt nghiệp Dược sỹ - Đại học Dược Hà Nội]. <http://lib.yhn.edu.vn/handle/YHN/11445>
45. **Zhang, C.** (2013). Protective effect of *Gynostemma Pentaphyllum* polysaccharide on liver injury by carbon tetrachloride in rats. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 19(1), 244–247.
46. **Song, S. L., Xiao, Z. P., Liang, H., Wang, Y. S., & Ji, A. G.** (2013). Protective Effects of *Gynostemma pentaphyllum* Makino Polysaccharide on Alcoholic Hepatic Injuries. *Advanced Materials Research*, 781–784, 668–673. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.781-784.668>

47. **Geethangili, M., & Ding, S.-T.** (2018). A Review of the Phytochemistry and Pharmacology of *Phyllanthus urinaria* L. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1109. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01109>
48. **Lee, C.-Y., Peng, W.-H., Cheng, H.-Y., Chen, F.-N., Lai, M.-T., & Chiu, T.-H.** (2006). Hepatoprotective effect of *Phyllanthus* in Taiwan on acute liver damage induced by carbon tetrachloride. *The American Journal of Chinese Medicine*, 34(3), 471–482. <https://doi.org/10.1142/S0192415X06004004>
49. *Phytotherapy Research | Medicinal Chemistry Journal | Wiley Online Library*. (n.d.). Retrieved October 3, 2024, from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.2650090813>
50. **Guo, Q., Zhang, Q.-Q., Chen, J.-Q., Zhang, W., Qiu, H.-C., Zhang, Z.-J., Liu, B.-M., & Xu, F.-G.** (2017). Liver metabolomics study reveals protective function of *Phyllanthus urinaria* against CCl₄-induced liver injury. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(7), 525–533. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(17\)30078-X](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(17)30078-X)
51. **Hau, D. K. P., Gambari, R., Wong, R. S. M., Yuen, M. C. W., Cheng, G. Y. M., Tong, C. S. W., Zhu, G. Y., Leung, A. K. M., Lai, P. B. S., Lau, F. Y., Chan, A. K. W., Wong, W. Y., Kok, S. H. L., Cheng, C. H., Kan, C. W., Chan, A. S. C., Chui, C. H., Tang, J. C. O., & Fong, D. W. F.** (2009). *Phyllanthus urinaria* extract attenuates acetaminophen induced hepatotoxicity: Involvement of cytochrome P450 CYP2E1. *Phytomedicine*, 16(8), 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.01.008>
52. **Shen, B., Yu, J., Wang, S., Chu, E. S. H., Wong, V. W. S., Zhou, X., Lin, G., Sung, J. J. Y., & Chan, H. L. Y.** (2008). *Phyllanthus urinaria* ameliorates the severity of nutritional steatohepatitis both in vitro and in vivo. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 47(2), 473–483. <https://doi.org/10.1002/hep.22039>

53. **Morikawa, T., Matsuda, H., Ninomiya, K., & Yoshikawa, M.** (2002). Medicinal foodstuffs. XXIX. Potent protective effects of sesquiterpenes and curcumin from *Zedoariae Rhizoma* on liver injury induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide or tumor necrosis factor- α . *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25(5), 627–631. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.627>
54. Bộ Y tế-, & Công nghệ và Đào tạo. (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*.
55. **Nguyễn Thượng Dong và cộng sự.** (2006). *Phương pháp nghiên cứu tác dụng của thuốc từ dược thảo*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
56. **Mossanen, J. C., & Tacke, F.** (2015). Acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *Laboratory Animals*, 49(1 Suppl), 30–36. <https://doi.org/10.1177/0023677215570992>
57. **Newsome, P. N., Henderson, N. C., Nelson, L. J., Dabos, C., Filippi, C., Bellamy, C., Howie, F., Clutton, R. E., King, T., Lee, A., Hayes, P. C., & Plevris, J. N.** (2010). Development of an invasively monitored porcine model of acetaminophen-induced acute liver failure. *BMC Gastroenterology*, 10, 34. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-10-34>
58. **Rahman, T. M., & Hodgson, H. J.** (2000). Animal models of acute hepatic failure. *International Journal of Experimental Pathology*, 81(2), 145–157. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2000.00144.x>
59. **Maes, M., Vinken, M., & Jaeschke, H.** (2016). Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 290, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.11.016>
60. **Ichai, P., & Samuel, D.** (2011). Epidemiology of liver failure. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 35(10), 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2011.03.010>

61. **Ingawale, D. K., Mandlik, S. K., & Naik, S. R.** (2014). Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(1), 118–133. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.08.015>
62. **Yanguas, S. C., Cogliati, B., Willebrords, J., Maes, M., Colle, I., van den Bossche, B., de Oliveira, C. P. M. S., Andraus, W., Alves, V. A. F., Leclercq, I., & Vinken, M.** (2016). Experimental models of liver fibrosis. *Archives of Toxicology*, 90(5), 1025–1048. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1543-4>
63. **Zangar, R. C., Benson, J. M., Burnett, V. L., & Springer, D. L.** (2000). Cytochrome P450 2E1 is the primary enzyme responsible for low-dose carbon tetrachloride metabolism in human liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions*, 125(3), 233–243. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(00\)00149-6](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(00)00149-6)
64. **Weber, L. W. D., Boll, M., & Stampfl, A.** (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*, 33(2), 105–136. <https://doi.org/10.1080/713611034>
65. **Basu, S.** (2003). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: Eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1–2), 113–127. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00157-4](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00157-4)
66. **Zamzami, M. A., Baothman, O. A. S., Samy, F., & Abo-Golayel, M. K.** (2019). Amelioration of CCl₄-Induced Hepatotoxicity in Rabbits by *Lepidium sativum* Seeds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2019, 5947234. <https://doi.org/10.1155/2019/5947234>
67. **Lee, Y.-S., Cho, I. J., Kim, J. W., Lee, M.-K., Ku, S. K., Choi, J.-S.,**

- & Lee, H.-J.** (2019). Hepatoprotective effects of blue honeysuckle on CCl₄-induced acute liver damaged mice. *Food Science & Nutrition*, 7(1), 322–338. <https://doi.org/10.1002/fsn3.893>
68. **Nirmala, M., Girija, K., Lakshman, K., & Divya, T.** (2012). Hepatoprotective activity of *Musa paradisiaca* on experimental animal models. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), 11–15. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60181-0](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60181-0)
69. **Organization, W. H.** (2000). Working group on the safety and efficacy of herbal medicine. *Report of Regional Office for the Western Pacific of the World Health Organization*, 200.
70. Bộ Y Tế (2015). Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y và thuốc từ dược liệu. *Quyết Định Số 141/QĐ-K2ĐT Ngày 27 Tháng 10 Năm 2015 Của Cục Khoa Học Công Nghệ và Đào Tạo Bộ Y Tế*.
71. **Đỗ Trung Đàm** (2014). Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc. *Nhà Xuất Bản Y Học. Hà Nội*, 101–112.
72. Thuvienphapluat.vn. (2024, March 4). *Thông tư 03/2012/TT-BYT hướng dẫn thử thuốc trên lâm sàng*. THƯ VIỆN PHÁP LUẬT. <https://thuvienphapluat.vn/van-ban/The-thao-Y-te/Thong-tu-03-2012-TT-BYT-huong-dan-thu-thuoc-tren-lam-sang-134441.aspx>
73. **WHO** (1993), “Working group on the safety and efficacy of herbal medicine,” em Report of regional office for the western pacific of the WHO, March, pp. pp. 33-51.
74. **Nguyễn Thế Khánh** (2001), Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng, NXB Y học, pp. tr 36-41.
75. **Trường ĐH Y Hà Nội -Bộ môn Hoá sinh** (2020), Hoá sinh, NXB Y học, pp. 363-392.
76. **Trường ĐH Y dược thành phố Hồ Chí Minh- Bộ môn Hóa sinh** (2010), Hóa sinh lâm sàng, NXB Y học, pp. 102.

77. **Hock FJ.** Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. Fourth edition, Springer Reference; 2015.
78. **Tạ Thành Văn.** Hóa sinh lâm sàng. Trường Đại học Y Hà Nội. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội; 2013
79. **Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND.** *Glutathione metabolism and its implications for health.* J Nutr. 2004;134(3):489–492.
80. **Yan H, Wang H, Gao L, et al.** *Protective effects of flavonoids on CCl₄-induced acute liver injury through activation of antioxidant enzymes and inhibition of lipid peroxidation.* Biomed Pharmacother. 2021;133:110993. doi:10.1016/j.biopha.2020.110993.
81. **Vũ Đình h Vinh.** Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hoá. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội; 2001.
82. **Trương Thị Thu Hiền, Hoàng Anh Tuấn, Ngô Thị Tuyết Mai và cộng sự** (2018). Tác dụng bảo vệ gan của cây cà gai leo (*Solanum procumbens* Lour.) trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol ở chuột nhắt trắng, Tạp chí y dược học quân sự, 6, 14-21.
83. **My T. K., Tùng P. T., Kỳ P. T., and Thông N. T.,** “Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan, chống oxy hoá của saponin chiết xuất từ giáo cổ lam,” *Tạp Chí Dược Học Nay Là Tạp Chí Dược Học*, vol. 54, no. 4, pp. 45–48, May 2014, Accessed: Oct. 11, 2025. [Online]. Available: <https://vjol.info.vn/index.php/tcdh/article/view/15868>
84. **Nguyễn Ngọc Hồng, Huỳnh Ngọc Thụy,** “Tác dụng bảo vệ gan của cao chiết ethyl acetate từ cây nghệ lông dày (*polygonum tomentosum* willd.) và râu mèo (*orthosiphon aristatus* (blume) miq.) trên mô hình gan chuột bị gây độc mãn tính bằng carbon tetrachloride. Tài liệu, Luận văn.” Accessed: Oct. 11, 2025. [Online]. Available: <https://www.tuvientailieulong-da-y-polygonum-tomentosum-willd-va-rau-meo-orthosiphon-52759>

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

HỌC VIỆN YDHCT VIỆT NAM	Cao khô GM Tuệ Tĩnh <i>Extractum</i>	TC-08-CK
VIỆN NCYDCT TUỆ TĨNH		Có hiệu lực kể từ ngày kí Bản lưu hành nội bộ

***Nguồn gốc:** Cao khô bài thuốc: Diệp hạ châu, Giảo cổ lam, Cà gai leo, Nga truật, Râu mèo, theo công thức dưới đây:

Bảng 2.1. Thành phần 100g Cao GM Tuệ Tĩnh

Thành phần	Tên dược liệu	Đơn vị
Diệp hạ châu	<i>Herba Phyllanthi urinariae</i>	255g
Giảo cổ lam	<i>Herba Gynostemmae</i>	255g
Cà gai leo	<i>Herba Solani procumbensis</i>	170g
Nga truật	<i>Rhizoma Curcumae zedoariae</i>	102g
Râu mèo	<i>Herba Orthosiphonis spiralis</i>	68g
Tổng		850g

*** Ghi chú:** Trong 100g gam cao khô tương đương với lượng các dược liệu như trong bảng.

I. YÊU CẦU KỸ THUẬT

1.1. Tính chất: Khối bột khô tơi, đồng nhất, màu vàng nhạt, dễ hút ẩm, có mùi thơm đặc trưng của các vị thuốc, không có mùi nấm mốc, vị ngọt nhẹ.

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

1.3. Độ mịn: Không ít hơn 95 % phần tử qua được rây số 180 và không quá 40 % qua được rây số 125.

1.4. Độ đồng nhất: Chế phẩm phải đồng nhất, không được có màu lốm đốm.

1.5. Tro sulfat: Không quá 4,0 %.

1.6. Định tính:

Phản ứng hóa học: Cao phải thể hiện phép thử định tính của nhóm chất Flavonoid

1.7. Kim loại nặng: Không được quá 10 phần triệu.

II. PHƯƠNG PHÁP THỬ

2.1. Tính chất: Bằng cảm quan, chế phẩm phải có những đặc điểm đã nêu.

2.2. Mất khối lượng do làm khô: Thử theo Dược Điển Việt Nam V - Phụ lục 9.6 - Xác định mất khối lượng do làm khô (1 g, 100 °C, 5 h).



2.3. Độ mịn: Thử theo Dược Điển Việt Nam V - Phụ lục 3.5 - Cỡ bột và rây.

Lấy 20 g cao cho qua rây số 180 và rây 125. Không ít hơn 95 % phần tử qua được rây số 180 và không quá 40 % qua được rây số 125.

2.4. Độ đồng nhất:

Lấy 20 g cao cho vào tờ giấy trắng đặt trong khay men, dùng một thìa nhấn ấn nhẹ trên mặt lớp bột, thành một vệt lõm. Quan sát vị trí vệt, màu của chế phẩm phải đồng nhất, không được có màu lốm đốm.

2.5. Tro sulfat: Thử theo Dược Điển Việt Nam V - Phụ lục 9.9 - Xác định tro sulfat

Nung một chén nung sứ hoặc platin ở $600\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 30 min, để nguội trong bình hút ẩm rồi cân. Cho vào chén nung khoảng 2g cao khô và cân. Làm ẩm mẫu bằng một lượng nhỏ acid sulfuric (TT) (khoảng 1 ml), đốt nóng ở mức độ nhẹ nhất có thể đến khi mẫu hóa tro hoàn toàn. Để nguội, làm ẩm cân bằng một lượng nhỏ acid sulfuric (TT), đốt nóng nhẹ đến khi bay hết khói trắng và nung ở $600\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến khi cân thành tro hoàn toàn. Trong khi đốt và nung không được để tạo thành ngọn lửa. Để nguội trong bình hút ẩm, cân và tính khối lượng của cân. Nếu khối lượng cân vượt ngoài giới hạn cho phép thì lại làm ẩm cân bằng acid sulfuric (TT) và nung như trên đến khối lượng không đổi.

2.6. Định tính

Phản ứng hóa học: Định tính Flavonoid là nhóm chất chính trong cao khô

Lấy khoảng 2g bột cao, thêm 10ml ethanol 90%. Đun sôi trong 3 phút, để nguội, lọc. Lấy 2ml dịch lọc, pha loãng với 10ml ethanol 90% rồi chia vào 3 ống nghiệm để làm các phản ứng sau:

- Ống 1 (Phản ứng Cyanidin): Thêm 5 giọt acid hydrocloric đậm đặc (TT) và ít bột magnesi, dung dịch chuyển dần từ màu vàng nhạt sang màu tím đỏ.
- Ống 2 (Phản ứng với kiềm): Thêm 2 giọt dung dịch natri hydroxyl 20% (TT), xuất hiện màu vàng đậm.
- Ống 3 (Phản ứng với Fe^{3+}): Thêm 2 giọt dung dịch sắt (III) clorid 5% (TT), dung dịch có màu nâu tím.

2.7. Kim loại nặng: Thử theo Dược điển Việt Nam V - Phụ lục 9.4.8, phương pháp 3 - Xác định giới hạn kim loại nặng.

- **Dung dịch thử:** Lấy 1,0 g cao khô cho vào một chén nung sứ. Thêm 4 ml dung dịch magnesi sulfat 25 % trong acid sulfuric 1 M (TT). Trộn đều bằng một đũa thủy tinh nhỏ rồi đun nóng cẩn thận. Nếu hỗn hợp là một chất lỏng thì làm bay hơi từ từ trên cách thủy đến khô. Đốt dần dần để chế phẩm cháy hết và tiếp tục đốt cho đến khi thu được cặn có màu gần trắng hay ít nhất là xám nhạt. Tiến hành nung ở nhiệt độ không quá $800\text{ }^{\circ}\text{C}$. Để nguội. Làm ẩm cân bằng vài giọt dung dịch acid sulfuric 1M (TT). Bốc hơi, nung lại và để nguội. Toàn bộ thời gian nung không được quá 2h. Hòa tan cặn trong dung dịch acid hydrocloric 2 M (TT) 2 lần, mỗi lần dùng 5 ml. Thêm 0,1 ml dung dịch phenolphthalein (TT), cho từng giọt amoniac (TT) đến khi có màu hồng. Để nguội, thêm acid acetic bằng



(TT) đến khi dung dịch mất màu và thêm thừa 0,5 ml nữa. Lọc nếu cần và pha loãng dung dịch với nước thành 20 ml.

- *Dung dịch đối chiếu*: Tiến hành theo chỉ dẫn ở phần dung dịch thử, dùng 1ml dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT). Thêm 2 ml dung dịch thử vào 10 ml dung dịch thu được.
- *Dung dịch kiểm tra*: Tiến hành theo chỉ dẫn ở phần dung dịch thử, dùng lượng chế phẩm như lượng dùng để chuẩn bị dung dịch thử và thể tích dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT) như thể tích dùng để chuẩn bị dung dịch đối chiếu. Thêm 2 ml dung dịch thử vào 10 ml dung dịch thu được.
- *Dung dịch mẫu trắng*: Hỗn hợp gồm 10 ml nước và 2 ml dung dịch thử.
- Lấy 12 ml của mỗi dung dịch trên, thêm 2 ml dung dịch đệm acetat pH 3,5 (TT). Lắc đều và thêm dung dịch thu được vào 1,2 ml dung dịch thioacetamid (TT), lắc đều ngay. Quan sát các dung dịch sau 2 min.
- *Đánh giá kết quả*:
 - + Dung dịch đối chiếu phải có màu nâu nhạt khi so sánh với dung dịch mẫu trắng và dung dịch kiểm tra phải có màu ít nhất là đậm bằng màu của dung dịch đối chiếu.
 - + Màu nâu của dung dịch thử, nếu có, không được đậm hơn màu của dung dịch đối chiếu.

3. ĐÓNG GÓI, BẢO QUẢN

- Đựng trong bao bì kín, tránh ánh sáng.
- Nhãn trình bày rõ ràng, đúng quy chế.
- Bảo quản nơi khô ráo, thoáng mát.

Hà Nội, ngày 1 tháng 11 năm 2024

VIỆN NGHIÊN CỨU Y DƯỢC CỔ TRUYỀN TUỆ TĨNH



Vũ Đức Lợi



	QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT CAO KHÔ BÀI THUỐC	Phiên bản : 1 lưu hành nội bộ Ngày ban hành : 3/12/2024 Tổng số trang : 5
---	---	---

I. CÔNG THỨC CHO 01 LÔ SẢN XUẤT (1 kg cao khô bài thuốc)

1.1. Công thức bài thuốc:

Diệp hạ châu	<i>Herba Phyllanthi urinariae</i>	255g
Giảo cổ lam	<i>Herba Gynostemmae</i>	255g
Cà gai leo	<i>Herba Solani procumbensis</i>	170g
Nga truyệt	<i>Rhizoma Curcumae zedoariae</i>	102g
Râu mèo	<i>Herba Orthosiphonis spiralis</i>	68g
Tổng:		850g

1.2. Công thức cho 1 lô sản xuất 1kg cao khô:

STT	Nguyên liệu	Khối lượng	Dung tích nồi chiết
1	Các dược liệu theo tỷ lệ	8,5 kg	100 lít
2	Nước tinh khiết (*)	Vừa đủ theo quy trình	

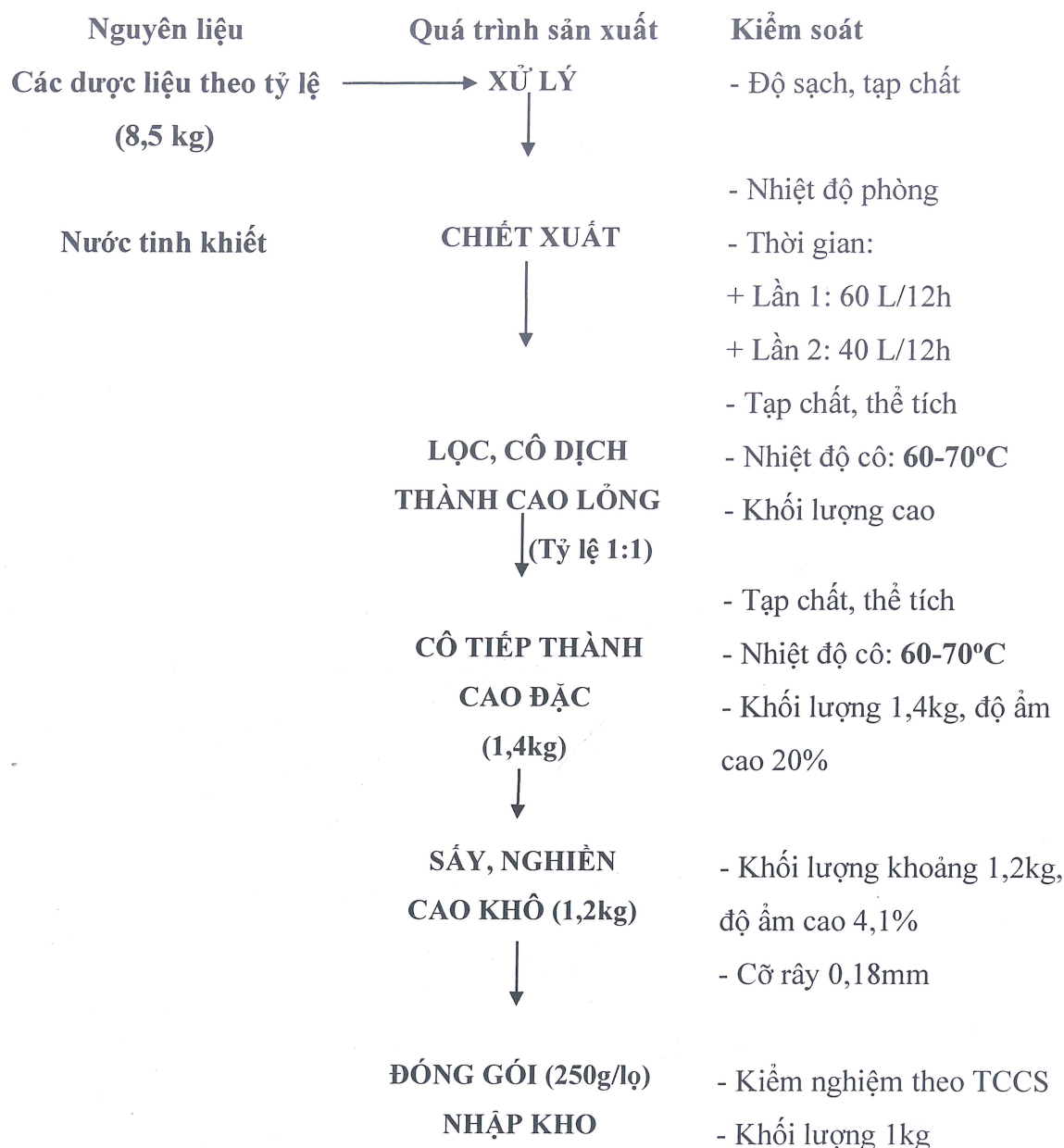
(*) Tả dược bay hơi, thu hồi trong quá trình sản xuất

II.ĐẶC ĐIỂM NGUYÊN PHỤ LIỆU

Nguyên liệu	Tên khoa học	Tiêu chuẩn (*)
Diệp hạ châu	<i>Herba Phyllanthi urinariae</i>	ĐĐVN
Giảo cổ lam	<i>Herba Gynostemmae</i>	ĐĐVN
Cà gai leo	<i>Herba Solani procumbensis</i>	ĐĐVN
Nga truyệt	<i>Rhizoma Curcumae zedoariae</i>	ĐĐVN
Râu mèo	<i>Herba Orthosiphonis spiralis</i>	ĐĐVN
Nước tinh khiết	<i>Aqua purificata</i>	ĐĐVN

(*) Dược điển phiên bản hiện hành

III. SƠ ĐỒ CÁC GIAI ĐOẠN SẢN XUẤT



IV. MÔ TẢ QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT

❖ Chuẩn bị nguyên, phụ liệu

* Chuẩn bị sản xuất:

- Nguyên liệu, dung môi: Được bảo quản trong các thùng đựng kín, tránh bay hơi, tránh lửa, không để bẩn, mất vệ sinh.
- Vệ sinh dụng cụ sản xuất: Các thùng chứa, xô nhựa, khay inox phải được rửa sạch, sấy khô trước khi dùng cho sản xuất. Máy móc thiết bị phải được vệ sinh sạch sẽ trước và sau khi sử dụng. Phải khử trùng trước khi sản xuất.
- Kiểm tra độ an toàn của máy móc thiết bị: Trước khi vận hành phải kiểm tra độ an toàn của các máy móc thiết bị để phòng chống cháy nổ, tai nạn xảy ra.
- Các vị thuốc: loại tạp chất, rửa sạch, cắt ngắn 2-3 cm.

❖ Chiết xuất với dung môi ethanol

- Thiết bị sử dụng: Nồi chiết xuất 100 lít.
- Phương pháp chiết xuất: Chiết ở 70°C (khoảng nhiệt độ sôi của dung môi)
- Khối lượng dược liệu: Phù hợp nồi chiết (khoảng 10kg/nồi).
- Dung môi: Nước tinh khiết
- Tỷ lệ dược liệu với dung môi: lần 1 = 1:5; lần 2 = 1:4
- Thời gian chiết: lần 1: 12 giờ; lần 2: 12 giờ
- Tiến hành: Nạp dược liệu vào nồi chiết. Gia nhiệt và tính theo thời gian quy định trên (thời gian chiết được tính từ khi dung môi đạt nhiệt độ sôi). Định kỳ 1 giờ khuấy, đảo dịch trong bình chiết bằng máy bơm dung môi.

❖ Lọc, cô dịch thành cao lỏng

- Dịch chiết được lọc qua hệ thống lọc của thiết bị, cô thu hồi bằng hệ thống cô tuần hoàn dung môi ở nhiệt độ 60-70°C dưới áp suất giảm, đến cao lỏng (2kg bài thuốc ~ 1 kg cao lỏng), thu được khoảng 5kg cao lỏng.
- Chuyển cao lỏng vào máy cô cầu áp suất giảm để cô tiếp, cô đến khi cao có độ ẩm 20% (khối lượng thu được khoảng 1,4 kg).

❖ Sấy, nghiền cao khô

- Cao đặc (độ ẩm khoảng 20%) được cho ra từng khay ở tủ sấy tĩnh, sấy ở nhiệt độ không quá 60°C đến khi thu được cao khô (độ ẩm 3-5%, khối lượng cao khoảng 1,1-1,2kg) thì tắt gia nhiệt của tủ sấy, để cao nguội trong tủ khoảng 1 giờ đồng hồ.
- Cao bán thành phẩm tiến hành kiểm nghiệm theo TCCS, nếu đạt thì tiến hành nghiền, rây qua máy nghiền đa năng kích thước rây 0,18 mm và tiến hành đóng gói.

Người sản xuất, IPC phải ghi chép hồ sơ lô theo quy định.

❖ Đóng gói và bảo quản

- Tiến hành kiểm nghiệm, kiểm tra các chỉ tiêu chất lượng trong suốt quá trình; cao thành phẩm thu được phải đạt yêu cầu chất lượng theo TCCS đã được phê duyệt.
- Cao khô hỗn hợp dược liệu được đựng trong 2 lần túi polyethylen buộc kín, hoặc trong lọ nhựa kín, quy cách 250g/túi hoặc lọ
- Ghi nhãn rõ ràng, đúng quy chế.
- Bảo quản nơi khô, mát, tránh ánh sáng, nhiệt độ dưới 30°C.

Lưu ý: Quá trình sản xuất có sử dụng ethanol nên cần tuyệt đối đảm bảo an toàn cháy nổ, thực hiện đúng các SOP đã ban hành.

V. DANH MỤC TRANG THIẾT BỊ VÀ DỤNG CỤ

TT	Tên thiết bị	Số lượng	Thông số kỹ thuật	Mục đích
1	Cân (5 kg ; 20 kg)	02		
2	Hệ thống chiết 2 nồi và cô thu hồi tuần hoàn 30 lít	01	100 kg/ mẻ	Chiết xuất, cô cao lỏng
3	Thiết bị cô đặc áp suất giảm có cánh khuấy	01	Tốc độ bay hơi 1 kg nước/ giờ	Cô dịch chiết
4	Tủ sấy chân không	01		Sấy cao khô
5	Máy nghiền, rây	01		Nghiền
6	Thiết bị lọc chân không Inox	01		Lọc dịch
7	Hệ thống nổi hơi và đường ống dẫn hơi	01	7,5kg hơi/ giờ	Cung cấp nhiệt
8	Máy đóng gói	01		
9	Máy đo hàm ẩm nhanh	01		Kiểm tra độ ẩm nhanh

VI. KỸ THUẬT AN TOÀN LAO ĐỘNG VÀ VỆ SINH

1. An toàn lao động:

- Thực hiện đúng nội quy, quy chế về an toàn lao động, phòng cháy chữa cháy và an toàn nổi hơi.
- Sử dụng máy móc đúng nội quy.
- Người làm việc ở khâu bụi phải mang khẩu trang ướt.

2. Vệ sinh:

- Vệ sinh cá nhân: Người làm việc phải đeo khẩu trang. Tay tiếp xúc với thuốc phải tiết trùng bằng cồn 70 %. Người mắc bệnh truyền nhiễm không được tham gia sản xuất.
- Vệ sinh cơ sở pha chế: Dụng cụ pha chế phải được tiết trùng, khô sạch. Phòng pha chế phải tiết trùng. Phòng đóng gói, sơ chế dược liệu phải riêng biệt, tránh bụi, kiến, chuột, và nấm mốc.

VII. PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT VÀ KIỂM NGHIỆM

1. Phương pháp kiểm soát:

TT	Đối tượng	Giai đoạn	Nội dung	Phương pháp	Người thực hiện
1	Nguyên	Chuẩn bị	Đạt tiêu chuẩn quy	ĐDVN V	Phòng QC,

	liệu	SX	định, có phiếu KN	TCCS	Kho
2	Dược liệu	Chiết xuất	Tỷ lệ dung môi, thời gian, số lần chiết	Cảm quan; đồng hồ đo	Người SX, IPC
3	Dịch chiết	Cô cao	Độ ẩm, nhiệt độ, thời gian cô cao	Cảm quan; dụng cụ đo	Người SX, IPC
4	Cao lỏng	Sấy cao	Thời gian, nhiệt độ sấy; độ ẩm cao khô	Cảm quan, đo độ ẩm	Người SX, IPC
5	Cao khô	Nghiền, rây	Thời gian nghiền; Kích thước rây	Cảm quan; đo độ mịn	Người SX, IPC
6	Thành phẩm	Đóng gói	Khối lượng, nhãn đúng quy chế	Cảm quan, TCCS	Người SX, IPC, QC

2. Phương pháp kiểm nghiệm: Sản phẩm được kiểm nghiệm theo TCCS Cao khô GM Tuệ Tĩnh đã ban hành.

VIỆN NGHIÊN CỨU Y DƯỢC CỔ TRUYỀN TUỆ TĨNH
PHỤ TRÁCH VIỆN



Vũ Đức Lợi