

Độc tính cấp và ảnh hưởng đến chức năng tạo máu của viên nang Linh quế truật cam thang - Nhị trần thang gia giảm

ACUTE TOXICITY AND EFFECT IN HEMATOLOGIC FUNCTIONS OF LINH QUE TRUAT CAM THANG - NHI TRAN THANG CAPSULES

Tôn Mạnh Cường¹, Nguyễn Tuấn Bình¹, Trương Việt Bình², Nguyễn Hoàng Ngân³

¹Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

²Bệnh viện Y học cổ truyền Bộ Công an

³Học viện Quân y

TÓM TẮT

Để đảm bảo tính an toàn của bài thuốc khi tiến hành nghiên cứu hiệu quả của chế phẩm điều trị rối loạn chuyển hóa lipid máu, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm mục tiêu: Đánh giá độc tính cấp và ảnh hưởng lên chức năng tạo máu trên thực nghiệm của viên nang Linh quế truật cam thang - Nhị trần thang (LQTCT-NTT).

Kết quả và kết luận: Không có độc tính cấp của LQTCT-NTT khi dùng theo đường uống, với liều LQTCT-NTT cao nhất có thể đưa vào dạ dày chuột nhắt trắng là 12,0g/kg trong lượng cơ thể (gấp 25 lần liều dùng trên người) không gây chết chuột nhắt trắng thực nghiệm; LQTCT-NTT không ảnh hưởng lên chức năng tạo máu của động vật thực nghiệm ở hai liều 0,28g/kg TLCT và 0,84g/kg TLCT uống liên tục trong 90 ngày.

Từ khóa: Rối loạn chuyển hóa lipid máu, Viên nang Linh quế truật cam thang - Nhị trần thang.

SUMMARY

To ensure the safety of Linhquetruatcamthang-Nhitranthang before conducting effective studies of the formular for the treatment of dyslipidemia. We carried this study with aims: Evaluate acute toxicity and effect in hematologic functions in experimental animals of LQTCT-NTT.

Results and conclusions: LQTCT-NTT has not acute toxicity in the maximum dose of 12,0g in experiment (25 times higher than the clinical dose) and LQTCT-NTT has not impacts on hematologic functions of experimental animals at dose 0.28g/kg BW and dose 0.84g/kgBW, oral for 90 days.

Keywords: Dyslipidemia, Linh que truat cam thang - Nhi tran thang capsule.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Rối loạn chuyển hóa lipid là danh từ dùng để miêu tả một hội chứng bệnh mạn tính được đặc trưng bởi sự thay đổi các chỉ số lipid trong máu. Khi

hội chứng này xuất hiện đồng nghĩa với việc người bệnh phải gánh chịu rất nhiều yếu tố nguy cơ mắc các bệnh lý nguy hiểm như nhồi máu cơ tim, vữa xơ mạch máu.

Ngày nhận bài: 17/12/2020

Ngày phân biện: 23/12/2020

Ngày chấp nhận đăng: 23/12/2020



Thử độc tính tiền lâm sàng là một trong những nội dung quan trọng trong nghiên cứu phát triển dược phẩm. Thông tin về độc tính của thuốc cần được xác định trước khi thực hiện các bước nghiên cứu tiếp theo [1-5].

Bài thuốc Linh quế truật cam thang – Nhị trần thang có tác dụng hạ lipid máu và giảm cân Theo quy định nghiên cứu thuốc thảo dược, thông tin về độc tính của thuốc cần được xác định trước khi thực hiện các bước nghiên cứu tiếp theo [1-5]. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu: *Đánh giá độc tính cấp và ảnh hưởng lên chức năng tạo máu trên động vật thực nghiệm.*

CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chất liệu nghiên cứu, trang thiết bị

- Thuốc nghiên cứu

Thành phần bài thuốc: Phục linh, Quế chi, Bạch truật, Trần bì, Bán hạ chế, Cam thảo, Hoàng kỳ, Thương truật.

Viên nang LQTCT-NTT được sản xuất tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên

Dạng bào chế: viên nang cứng, hàm lượng 500mg.

Các dược liệu đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam IV; Cao khô dược liệu đạt tiêu chuẩn dược điển Việt Nam IV.

Viên nang cứng 500mg, với nguyên liệu là cao khô dược liệu, thuốc đạt tiêu chuẩn cơ sở dựa trên tiêu chuẩn cao thuốc trong Dược điển Việt Nam IV.

Dung môi dùng làm chứng là nước cất.

Máy xét nghiệm huyết học tự động Humancout 30TS hãng Human (Đức) hóa chất của hãng.

Đối tượng nghiên cứu

Thử độc tính cấp: 100 chuột nhắt trắng Mus musculus chủng Swiss cả đực và cái, 6 tuần tuổi, thuần chủng, trọng lượng 18,0-22,0g.

Đánh giá ảnh hưởng lên chức năng tạo máu: 30 chuột cống trắng trưởng thành, dòng Wistar, không phân biệt giống, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, cân nặng mỗi con tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm là 160 - 180g.

Cả hai loài chuột được cung cấp bởi Trung tâm Động vật thí nghiệm Học viện Quân y.

Tất cả chuột được nuôi trong điều kiện chuẩn tại phòng chăn nuôi thực nghiệm của Bộ môn Dược lý - Học viện Quân y với cùng điều kiện về nhiệt độ, độ ẩm, tỷ lệ thời gian sáng tối là 12/12, nước uống sạch, thức ăn do Trung tâm Động vật thí nghiệm Học viện Quân y cung cấp.

Phương pháp nghiên cứu

Chỉ tiêu nghiên cứu

Xác định độc tính cấp.

Chức năng tạo máu: số lượng hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, số lượng và công thức bạch cầu.

Tiến hành nghiên cứu

a) Độc tính cấp

Được xác định trên các nhóm chuột nhắt trắng theo đường uống, bằng phương pháp Litchfield-Wilcoxon theo quy định của Tổ chức Y tế thế giới, OECD, quy chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực thuốc cổ truyền của Bộ Y tế Việt Nam. Tính liều LD_{50} theo phương pháp Behrens - Karber.

Chuột được chia thành 8 lô, mỗi lô 10 con.

Cách pha thuốc: thuốc được pha trong nước tinh khiết tạo thành dung dịch, độ đậm đặc tăng dần đạt đến khi không bơm được qua kim đầu tù thì dừng lại.

Chuột được cho ăn vào 16 giờ ngày hôm trước, vào 8 giờ sáng ngày hôm sau cho uống thuốc bằng kim đầu tù với các liều khác nhau tăng dần từ liều cao nhất không gây chết (g/kg) đến liều thấp nhất gây chết 100% chuột, trong cùng một thể tích là 0,2 ml dung dịch thuốc/10g trọng

lượng cơ thể (TLCT) chuột, 1-2-3 lần trong 24 giờ, khoảng cách giữa hai lần uống thuốc là 2h, chuột được cho ăn sau khi uống thuốc lần cuối. Chuột được theo dõi tình trạng chung trong suốt 7 ngày và tỷ lệ chết trong 72 giờ của từng nhóm để xác định liều LD₅₀.

b) Chức năng tạo máu

Được thực hiện trên chuột cống trắng cả hai giống đực và cái

Vì viên nang đã được sử dụng trên người, nên liều thuốc nghiên cứu được ngoại suy từ liều trên người [6], có tham khảo liều chết 50%.

Chuột cống được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 10 con.

Lô chứng: uống nước cất; Lô thử 1: uống thuốc LQTCT-NTT, liều 0,28g/kg/ngày (tương đương với liều dùng trên người); Lô thử 2: uống thuốc

LQTCT-NTT, liều 0,84g/kg/ngày (gấp 12 lần liều dùng trên người).

Nước cất và thuốc thử được đưa thẳng vào dạ dày chuột bằng kim công đầu tù vào các buổi sáng từ 8-10 giờ, 1 lần/ngày với cùng thể tích 0,2ml/10g thể trọng, uống liên tục trong 30, 60, 90 ngày.

Các thông số theo dõi được kiểm tra vào trước uống thuốc, sau 30, 60, 90 ngày uống thuốc.

Địa điểm nghiên cứu

Đề tài được thực hiện tại Bộ môn Dược lý - Học viện Quân y.

Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu thực nghiệm được xử lý bằng phần mềm...

KẾT QUẢ

Độc tính cấp

Bảng 1. Độc tính cấp theo đường uống của viên nang LQTCT – NTT trên chuột nhắt trắng

Lô chuột	Số chuột thí nghiệm	Liều dùng(g/kg thể trọng)	Thể tích cho uống	Số chuột sống/ chết sau 72 giờ	Số chuột sống/ chết sau 7 ngày
Lô 1	10	3,6	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0	10/0
Lô 2	10	4,8	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0	10/0
Lô 3	10	6,0	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0	10/0
Lô 4	10	7,2	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0	10/0
Lô 5	10	8,4	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0	10/0
Lô 6	10	9,6	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0	10/0
Lô 7	10	10,8	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0	10/0
Lô 8	10	12,0	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0	10/0

Nhận xét: Chưa tìm thấy LD₅₀ của viên nang LQTCT- NTT theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong 24h là 12,0g/kg thể trọng không xuất hiện độc tính cấp.

Ảnh hưởng của viên nang LQTCT- NTT đối với một số chỉ tiêu huyết học của chuột

Bảng 2. Ảnh hưởng của viên nang LQTCT- NTT lên số lượng hồng cầu chuột ($\times 10^{12}/g/l$) ($n = 10, \bar{X} \pm SD$)

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	P _{so sánh giữa các lô}
Trước thí nghiệm (a)	7,28 ± 1,10	7,16 ± 0,77	7,15 ± 0,65	P ₂₋₁ > 0,05
Sau 30 ngày (b)	7,02 ± 3,26	7,21 ± 0,89	7,19 ± 0,33	P ₃₋₂ > 0,05 P ₃₋₁ > 0,05



Sau 60 ngày (c)	7,03 ± 2,93	7,24 ± 1,13	7,14 ± 0,90	P ₂₋₁ > 0,05 P ₃₋₂ > 0,05 P ₃₋₁ > 0,05
Sau 90 ngày (d)	7,32 ± 0,60	6,86 ± 0,58	7,24 ± 0,73	
P _{so sánh trong cùng lô}	P _{b,c,d-a} > 0,05; P _{c,d-b} > 0,05; P _{d-c} > 0,05			

Nhận xét: Viên nang LQTCT- NTT với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên các chỉ tiêu về số lượng hồng cầu trong máu chuột.

Bảng 3. Ảnh hưởng của viên nang LQTCT- NTT lên hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột (g/dL) (n = 10, $\bar{X} \pm SD$)

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	P _{so sánh giữa các lô}
Trước thí nghiệm (a)	13,29 ± 1,76	13,02 ± 0,93	13,11 ± 1,45	P ₂₋₁ > 0,05 P ₃₋₂ > 0,05 P ₃₋₁ > 0,05
Sau 30 ngày (b)	13,15 ± 1,21	13,21 ± 1,39	13,19 ± 0,95	
Sau 60 ngày (c)	13,21 ± 1,51	13,10 ± 1,13	13,25 ± 1,53	
Sau 90 ngày (d)	13,18 ± 1,07	12,41 ± 0,76	13,18 ± 1,42	
P _{so sánh trong cùng lô}	P _{b,c,d-a} > 0,05; P _{c,d-b} > 0,05; P _{d-c} > 0,05			-

Nhận xét: Viên nang LQTCT- NTT với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột

Bảng 4. Ảnh hưởng của viên nang LQTCT- NTT lên số lượng bạch cầu chuột (G/l) (n = 10, $\bar{X} \pm SD$)

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	P _{so sánh giữa các lô}
Trước thí nghiệm (a)	7,07 ± 1,32	6,92 ± 3,00	6,92 ± 3,22	P ₂₋₁ > 0,05 P ₃₋₂ > 0,05 P ₃₋₁ > 0,05
Sau 30 ngày (b)	7,02 ± 3,26	6,95 ± 2,36	6,97 ± 3,48	
Sau 60 ngày (c)	7,03 ± 2,93	6,97 ± 1,28	7,02 ± 3,78	
Sau 90 ngày (d)	7,06 ± 2,10	6,49 ± 1,45	7,05 ± 1,22	
P _{so sánh trong cùng lô}	P _{b,c,d-a} > 0,05; P _{c,d-b} > 0,05; P _{d-c} > 0,05			-

Nhận xét: Viên nang LQTCT- NTT với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên các chỉ tiêu về số lượng bạch cầu chuột thực nghiệm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của viên nang LQTCT- NTT lên số lượng tiểu cầu trong máu chuột (G/l) (n = 10, $\bar{X} \pm SD$)

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	P _{so sánh giữa các lô}
Trước thí nghiệm (a)	523,50 ± 188,81	498,30 ± 151,20	503,80 ± 100,44	P ₂₋₁ > 0,05 P ₃₋₂ > 0,05 P ₃₋₁ > 0,05
Sau 30 ngày (b)	553,30 ± 135,84	494,90 ± 118,60	506,00 ± 111,38	
Sau 60 ngày (c)	506,50 ± 152,96	473,60 ± 124,82	489,50 ± 111,33	
Sau 90 ngày (d)	495,70 ± 84,19	491,60 ± 93,74	539,10 ± 99,76	
P _{so sánh trong cùng lô}	P _{b,c,d-a} > 0,05; P _{c,d-b} > 0,05; P _{d-c} > 0,05			-



Nhận xét: Viên nang LQTCT-NTT với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên các chỉ tiêu về số lượng tiểu cầu trong máu chuột.

BÀN LUẬN

LQTCT-NTT vẫn được các thầy thuốc lâm sàng dùng để chữa chứng rối loạn lipid máu ở người thừa cân, béo phì. Các vị thuốc được lựa chọn theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam IV và bào chế theo phương pháp Y học cổ truyền trước khi bào chế dưới dạng viên nang cứng.

Viên nang LQTCT-NTT được thử nghiệm độc tính cấp, tìm LD₅₀ tại Bộ môn Dược lý – Học viện Quân y. Kết quả theo dõi liên tục trong 72 giờ ở điều kiện phòng thí nghiệm tiêu chuẩn cho thấy: Tất cả chuột thí nghiệm đều ăn uống và sinh hoạt bình thường, ánh mắt linh hoạt, phân mềm không khô không nát, không có chuột nào biểu hiện ngộ độc dù liều thuốc lớn nhất trên chuột gấp 25 liều tương đương trên người (là thể tích tối đa mà chuột có thể dung nạp được). Do đó, thuốc không có độc tính cấp và không xác định được liều LD₅₀.

Đánh giá các số lượng hồng cầu, bạch cầu cùng định lượng hemoglobin chuột nghiên cứu trên ba

lô gồm lô chứng, lô thử nghiệm I và lô thử nghiệm II cùng một thời điểm tại các mốc thời gian trước nghiên cứu, sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày. Nghiên cứu này chỉ ra các chỉ số trên không có sự khác biệt khi so sánh từng cặp và so sánh ngẫu nhiên giữa các cặp. Kết quả nghiên cứu cho thấy các vị thuốc có nguồn gốc từ thảo mộc thường là an toàn và khẳng định thêm về sự an toàn của thuốc nghiên cứu.

KẾT LUẬN

- Không có độc tính cấp của viên nang LQTCT-NTT khi dùng theo đường uống. Với lượng cao nhất có thể đưa vào dạ dày chuột nhắt trắng là 12g/kg trong lượng cơ thể (gấp 25 liều dùng trên người) không gây chết chuột nhắt trắng thực nghiệm.

- Viên nang LQTCT-NTT không ảnh hưởng lên chức năng tạo máu của động vật thực nghiệm ở hai liều 0,28g/kg TLCT và 0,84g/kg TLCT uống trong 90 ngày.

KHUYẾN NGHỊ

Cần tiếp tục nghiên cứu độc tính của thuốc trên gan, thận và hiệu quả trên thực nghiệm trước khi thử nghiệm lâm sàng trên người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế - Cộng hoà Xã hội Chủ nghĩa Việt Nam (1996)**, Quy định về nghiên cứu dược lý các thuốc y học cổ truyền dân tộc, quyết định 371/QĐ-BYT.
- Abrham W.B. (1978)**: Techniques of Animal and Clinical Toxicology, Med. pub. Chicago, pp 55 - 68.
- WHO (1993)**: Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines, Manila, Philipin, pp 35 - 41.
- OECD (2001)**. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, acute oral toxicity. *Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment No 19*.
- World Health Organization (2000)**, Working group on the safety and efficacy of herbal medicine, Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization.
- Đỗ Trung Đàm (2006)**, Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo, NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, tr. 335- 42, 347-52, 355-368, 377-392.