



Đánh giá độc tính cấp và tác dụng chống viêm của bài thuốc viêm họng mạn tính HV trên động vật thực nghiệm

EVALUATE THE ACUTE TOXICITY AND ANTI - INFLAMMATORY EFFECTS OF "VIEM HONG MAN TINH HV" REMEDY ON EXPERIMENTAL ANIMALS

Đoàn Quang Huy¹, Đào Xuân Kỳ¹, Nguyễn Thị Ngọc¹, Nguyễn Hoàng Ngân²

¹Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

²Học viện Quân y

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá độc tính cấp trên chuột nhắt trắng chủng Swiss và tác dụng chống viêm mạn trên chuột cống trắng chủng Wistar của bài thuốc "Viêm họng mạn tính HV".

Phương pháp: Độc tính cấp trên chuột nhắt trắng được đánh giá theo phương pháp Litchfield-Wilcoxon [2] và hướng dẫn của WHO [9]. Tác dụng chống viêm mạn của bài thuốc được đánh giá trên mô hình gây u hạt ở chuột cống trắng bằng hạt amian.

Kết quả: Chuột nhắt trắng uống "Viêm họng mạn tính HV" với 5 mức liều từ 83 g/kg đến 249 g/kg thể trọng, 0,2mL/10g/lần x 3 lần/ngày nhưng không có chuột nào chết hay có bất thường trong 7 ngày sau uống thuốc. Trên chuột cống trắng uống "Viêm họng mạn tính HV" liều 11,62 g/kg/ngày và 23,24 g/kg/ngày trong 6 ngày làm giảm khối lượng u hạt ($p < 0,05$) so với lô chứng gây bệnh không dùng thuốc, và tương đương so với Prednisolon liều 5mg/kg/ngày.

Kết luận: Độc tính cấp chưa xác định được LD50 của bài thuốc "Viêm họng mạn tính HV" trên chuột nhắt trắng, mặc dù chuột đã uống đến liều tối đa 249 g/kg/24h. "Viêm họng mạn tính HV" liều 11,62 g/kg/ngày và 23,24 g/kg/ngày có tác dụng chống viêm trên mô hình gây u hạt mạn tính bằng amian ở chuột cống trắng, tương đương với Prednisolon liều 5mg/kg/ngày.

Từ khóa: Viêm họng mạn tính HV, độc tính cấp, chống viêm.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the acute toxicity in Swiss mice and chronic anti-inflammatory effects on Wistar rats of the "Viem hong man tinh HV" remedy.

Methods: Acute toxicity in Swiss mice was assessed according to Litchfield – Wilcoxon method [2] and

Ngày nhận bài: 25/2/2021

Ngày phản biện: 26/2/2021

Ngày chấp nhận đăng: 26/2/2021

WHO guidelines [9]. Chronic anti-inflammatory effects of the remedy were evaluated on the amian pellet-induced granuloma models of inflammation in rats.

Results: Swiss mice were drank "Viem hong man tinh HV" with 5 doses from 83 g/kg to 249 g/kg body weight, 0.2mL/10g/time x 3 times/day, but no mice died or had any usually within 7 days after taking the drug. On Wistar rats drinking "Viem hong man tinh HV" with doses 11.62 g/kg/day and 23.24 g/kg/day during 6 days reduced the mass of granulomas ($p < 0.05$) compared to the group of diseases without using drugs.

Conclusions: The acute toxicity of "Viem hong man tinh HV" had not been identified the LD50 on mice although they were taken the highest dose of 249g herbal medicines/kg body weight. "Viem hong man tinh HV" with doses of 11.62 g/kg/day and 23.24 g/kg/day had anti-inflammatory effect on the amian pellet-induced granuloma models of inflammation in rats, equivalent to Prednisolon dose 5mg/kg/day.

Keywords: Viem hong man tinh HV, acute toxicity, anti-inflammatory.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lý viêm họng mạn tính đang ngày càng phổ biến tại nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam, nam nhiều hơn nữ do một số nguyên nhân thuận lợi: hút thuốc, uống rượu, hít thở không khí bụi hữu cơ, vô cơ, nóng khô, hơi hóa chất hay do biến chứng của viêm mũi, viêm xoang [6]. Viêm họng mạn tính không chỉ gây ảnh hưởng đến sức khỏe và sinh hoạt, công việc của bệnh nhân mà còn để lại biến chứng nguy hiểm nếu không điều trị đúng cách.

Y học hiện đại điều trị viêm họng mạn tính chủ yếu điều trị triệu chứng hoặc điều trị tại chỗ, kết hợp điều trị các nguyên nhân bệnh lý toàn thân [6]. Mặc dù dùng các nhóm thuốc nay có tác dụng làm giảm viêm, giảm phù nề nhưng cũng có nhiều tác dụng phụ, đặc biệt khi dùng kéo dài [6].

Y học cổ truyền quy viêm họng mạn tính thuộc chứng hầu tý [5]. Nhiều vị thuốc, bài thuốc điều trị ho, viêm họng nói chung cũng như viêm họng mạn tính nói riêng đạt kết quả tốt. Bài thuốc "Viêm họng mạn tính HV" dựa trên kinh nghiệm điều trị của PGS.TS. Đoàn Quang Huy, gồm 8 vị dược liệu: Tạo giác thích, Bạc hà, Liên kiều, Hạ khô thảo, Trầu không, Bán hạ chế, Tò ngạch, Xạ can. Theo lý luận y học cổ truyền, bài thuốc có tác dụng tư dưỡng phế âm, giáng hỏa lợi hầu, hành khí, hoạt huyết,

thanh nhiệt, hóa đàm, khai âm. Theo kinh nghiệm điều trị, bài thuốc có tác dụng sát khuẩn cổ họng, giảm ho hen, làm giảm cơn đau rát ở họng, thông mắt cổ họng, tiêu viêm, giải độc, tiêu mủ, cải thiện vùng niêm mạc hầu họng, làm xẹp các hạt tự nhiên. Để có cơ sở khoa học về tính an toàn và tác dụng của bài thuốc, nghiên cứu được tiến hành để đánh giá độc tính cấp và tác dụng chống viêm mạn tính của bài thuốc "Viêm họng mạn tính HV" trên động vật thực nghiệm.

CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chất liệu, đối tượng và thiết bị nghiên cứu

Thuốc nghiên cứu

Dịch chiết nước bài thuốc "Viêm họng mạn tính HV"

- Công thức bài thuốc: Tạo giác thích (*Spina Gleditschae*) 06g, Bạc hà (*Herba Mentha*) 10g, Liên kiều (*Fructus Forsythia*) 15g, Hạ khô thảo (*Spica Prunellae*) 15g, Trầu không (*Piper betle* L) 06g, Bán hạ chế (*Rhizoma Pinelliae*) 15g, Tò ngạch (*Caulis Perillae Fructescentis*) 10g, Xạ can (*Rhizoma Belamacndae*) 06g. Tất cả các vị thuốc trong bài thuốc đều đạt tiêu chuẩn trong Dược điển Việt Nam V [1]. Thuốc được chiết với dung môi là nước, bằng máy sắc thuốc tự động Hàn Quốc. Dịch



chiết thu được sau khi sắc có tỷ lệ 1:1 (100ml dịch chiết tương đương 100g dược liệu). Cao lỏng này sau đó được cô đặc bằng máy cô quay chân không thành cao đặc 4:1. Cao đặc được pha với nước cất với các tỷ lệ thích hợp để cho chuột uống với liều lượng và thể tích thích hợp. Liều dùng của thuốc được tính theo gam dược liệu. Tổng bài thuốc là 83g, được sử dụng trên người mỗi ngày 1 thang (83g), hay $83\text{g}/50\text{kg}/24\text{h} = 1,66\text{g}/\text{kg}/24\text{h}$. Quy đổi ra liều trên chuột cống (hệ số 7) [2] là $11,62\text{g}/\text{kg}/24\text{h}$, trên chuột nhắt trắng (hệ số 12) là $19,92\text{g}/\text{kg}/\text{ngày}$.

Đối tượng nghiên cứu

Chuột nhắt trắng chủng Swiss trưởng thành, cả hai giống, cân nặng 18-22g. Chuột cống trắng chủng Wistar trưởng thành, khỏe mạnh, cả hai giống, cân nặng 180g-220g. Động vật do Ban động vật Học viện Quân y cấp, nuôi dưỡng theo tiêu chuẩn động vật nghiên cứu.

Thiết bị, hóa chất

Cân phân tích Sartorius độ chính xác 10-4 g (Đức); kim cong đầu tù dùng cho chuột uống thuốc (Nhật Bản); Tủ sấy (Trung Quốc); prednisolon viên nén 5mg (Hà Nội Pharma JSC).

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu độc tính cấp trên chuột nhắt trắng:

Xác định LD50 của bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon [2] và hướng dẫn của WHO [9]. Chuột nhắt được chia thành các lô, mỗi lô 10 con, được uống mẫu thuốc nghiên cứu 3 lần/24h theo liều tăng dần từ $90\text{g}/\text{kg}/24\text{h}$ đến $240\text{g}/\text{kg}/24\text{h}$ (liều tối đa chuột có thể dung nạp được). Theo dõi tình trạng chung và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ. Tiếp tục theo dõi tình trạng của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống thuốc thử lần đầu. Xác định % số chuột chết theo liều dùng trong 72 giờ sau uống

thuốc thử lần đầu tiên, từ đó xác định liều chết 50% (nếu có).

Nghiên cứu tác dụng chống viêm mạn của bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” trên chuột cống trắng

Theo phương pháp nghiên cứu của Ducrot, Julon và cs (1963) [8] và phương pháp nghiên cứu của Meier và cs (1950) [7]. Chuột Wistar được chia ngẫu nhiên làm 4 lô, mỗi lô 10 con:

- Lô 1 (lô chứng): gây u hạt + uống nước cất.

+ Lô 2 (lô tham chiếu): gây u hạt + uống Prednisolon $5\text{mg}/\text{kg}/\text{ngày}$.

+ Lô 3 (lô trị 1): gây u hạt + uống “Viêm họng mạn tính HV” $11,62\text{g}/\text{kg}/\text{ngày}$.

+ Lô 4 (lô trị 2): gây u hạt + uống “Viêm họng mạn tính HV” $23,24\text{g}/\text{kg}/\text{ngày}$.

Gây viêm mạn bằng cách cấy hạt amian vô khuẩn ($30 \pm 0,1\text{mg}$) đã tiệt trùng (sấy 120°C trong 1 giờ) vào dưới da lưng hai bên của chuột.

Sau khi cấy u hạt, các chuột được uống nước cất hoặc thuốc thử (theo phân lô) liên tục trong 6 ngày. Ngày thứ 7 tiến hành giết chuột bằng cloroform, phẫu thuật bóc tách lấy u hạt bao bọc quanh hạt amian, cân bằng cân phân tích chính xác đến 10-4 g và xác khối lượng thực của u hạt sau khi trừ đi khối lượng của hạt amian (tính theo $\text{mg}/100\text{g}$ cân nặng chuột). Sau đó sấy khô đến trọng lượng không đổi (sấy khô ở nhiệt độ 56°C trong 18 giờ) rồi cân lần 2. So sánh khối lượng trung bình của u hạt (cả tươi và khô) giữa các lô chuột để đánh giá tác dụng ức chế viêm mạn.

Xử lý số liệu

Số liệu được trình bày dưới dạng $\text{MEAN} \pm \text{SD}$. Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 16.0, sử dụng thuật toán ONE - WAY ANOVA hậu kiểm bằng LSD test để so sánh giá trị trung bình. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Độc tính cấp

Sau khi cho các lô chuột uống thuốc thử theo liều tăng dần từ 83g/kg/24h đến 249g/kg/24h chuột, không phát hiện ngộ độc nào trên chuột thí nghiệm trong thời gian theo dõi, chuột hoạt động bình thường, các biểu hiện sinh lý bình thường. Sau 72 giờ cũng như theo dõi tiếp 7 ngày

sau uống thuốc, các lô thí nghiệm đều không có chuột chết. Vì vậy chưa xác định được liều chết 50% (LD50).

Tác dụng chống viêm mạn của bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV”

Kết quả đánh giá trọng lượng u hạt trước khi sấy khô

Kết quả được trình bày ở bảng 1

Bảng 1. Tác dụng giảm trọng lượng u hạt tươi (mg/100g) của bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” (n = 10, Mean ± SD).

Lô		Trọng lượng trung bình u hạt tươi (trước khi sấy khô)	Phần trăm giảm cân nặng u hạt tươi so với lô chứng (%)	P
Lô chứng	(1)	106,38 ± 12,45	0 %	p ₁ < 0,05
Lô tham chiếu	(2)	83,42 ± 9,46	21,58 %	
Lô trị 1	(3)	85,26 ± 8,66	19,85 %	
Lô trị 2	(4)	82,92 ± 8,32	22,05 %	

Nhận xét: Cả prednisolon và bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” ở 2 mức liều đều làm giảm khối lượng u hạt tươi (trước khi sấy khô) so với lô chứng sinh lý (p < 0,05). Trọng lượng trung bình u hạt tươi ở lô dùng bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” liều cao dường như giảm hơn so với ở lô dùng liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt này chưa

có ý nghĩa thống kê (p > 0,05). So sánh giữa các lô dùng bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” và prednisolon, tác dụng làm giảm khối lượng u hạt tươi ở các lô này khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05).

Kết quả đánh giá trọng lượng u hạt sau khi sấy khô

Kết quả được trình bày ở bảng 2

Bảng 2. Tác dụng giảm trọng lượng u hạt khô (mg/100g) của bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” (n = 10, Mean ± SD).

Lô		Trọng lượng trung bình u hạt khô (sau khi sấy khô)	Phần trăm giảm cân nặng u hạt so với lô chứng (%)	P
Lô chứng	(1)	34,53 ± 3,62	0 %	p ₁ < 0,05
Lô tham chiếu	(2)	27,26 ± 3,59	21,05 %	
Lô trị 1	(3)	28,09 ± 2,54	18,65 %	
Lô trị 2	(4)	27,21 ± 3,20	21,20 %	

Nhận xét: Cả prednisolon và bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” ở 2 mức liều đều làm giảm khối lượng u hạt khô khi so với lô chứng (p < 0,05). Trọng lượng trung bình u hạt khô ở lô dùng bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” liều

cao dường như giảm hơn so với ở lô dùng liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê (p > 0,05). So sánh giữa các lô dùng bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” và prednisolon, tác dụng làm giảm khối lượng u hạt khô ở các lô



này khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

BÀN LUẬN

Về độc tính cấp của bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV”

Chuột nhắt trắng đã uống đến liều tối đa là 249g/kg/24h thể trọng chuột (so với liều dự kiến có tác dụng, liều tối đa trên gấp $249/19,92 = 12,5$ lần), mà không thấy xuất hiện dấu hiệu của độc tính. Vì không có chuột chết nên chưa xác định được LD50 của bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon. Kết quả này cho thấy dịch chiết bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” có tính an toàn cao trong thử nghiệm độc tính cấp, hay khoảng an toàn điều trị rộng [2], [9].

Về tác dụng chống viêm mạn của bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV”

Mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng amiant được Meier và cộng sự mô tả [7], áp dụng từ năm 1950 và được Ducrot, Julou phát triển hoàn thiện [8].

Các tác nhân gây viêm trở như bông, amiant... không có khả năng tiêu đi bởi quá trình viêm, cơ thể phản ứng bằng cách tập trung nhiều loại tế bào xung quanh dị vật và tạo thành u hạt. Khi những triệu chứng xuất hiện sớm của phản ứng viêm đã giảm đi, ổ kích ứng bị xâm nhiễm bởi những tế bào di động từ máu và mô liên kết ở kề bên tới, như những tế bào của mô lưới. Chúng tạo thành một khối tế bào non rất hoạt động và làm 2 nhiệm vụ: Nhiệm vụ thực bào và tập hợp xung quanh những vùng hoại tử và những vật lạ, rồi chúng gây nên sự tăng sinh nguyên bào sợi và sự tạo thành mô hạt.

Tác dụng chống viêm mạn được đánh giá trên mô hình gây u hạt ở chuột cống trắng. Toàn bộ các chuột được cấy hạt amiant vô khuẩn vào dưới da đều có hình thành tổ chức u hạt (granuloma tissue) bao quanh hạt aminant.

Mô hình gây u hạt thực nghiệm được xem là một mô hình tin cậy để đánh giá tác dụng trên sự suy giảm chức năng đại thực bào và sự hình thành u hạt, dùng cho đánh giá tác dụng của thuốc ức chế chống lại sự hoạt hóa (activation), thâm nhiễm (infiltration) và kết tập (aggregation) của đại thực bào, chống lại quá trình hình thành các tổ chức u hạt trong viêm mạn. Đây là những vấn đề có vai trò trung tâm trong việc hình thành, duy trì và phát triển u hạt trong nhiều tình trạng bệnh. Mô hình đánh giá trên cả u hạt tươi và u hạt khô. U hạt khô được xác định sau khi sấy u hạt tươi đến khối lượng không đổi, khi đó đã loại bỏ hoàn toàn các yếu tố dịch viêm trong tổ chức hạt, xác định chính xác khối lượng viêm xơ trong tổ chức hạt. U hạt tươi, ngoài khối lượng viêm xơ còn có các yếu tố dịch viêm trong tổ chức hạt, phản ánh phần nào sự hoạt hóa (activation), thâm nhiễm (infiltration) và kết tập (aggregation) của đại thực bào.

Nhóm nghiên cứu chọn prednisolon là thuốc tham chiếu. Đây là một glucocorticoid có tác dụng chống viêm thông qua các cơ chế: làm giảm số lượng các tế bào lympho, bạch cầu ái toan, bạch cầu đơn nhân trong máu ngoại biên và giảm sự di chuyển vào vùng bị viêm, ức chế chức năng của các tế bào lympho, đại thực bào và các mô. Ngoài ra, prednisolon còn giảm đáp ứng viêm do giảm tổng hợp prostaglandin vì ức chế phospholipase A2, tăng nồng độ lipocortin, giảm tính thấm mao mạch.

Kết quả thực nghiệm cho thấy cao chiết nước bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” liều 11,62 g/kg/ngày (liều dự kiến có tác dụng) và liều 23,24 g/kg/ngày (gấp đôi liều 1) đều làm giảm khối lượng u hạt khi so với lô chứng ($p < 0,05$), tương đương so với lô dùng prednisolon liều 5 mg/kg/ngày. Trọng lượng trung bình u hạt ở lô dùng bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” liều 2 giảm hơn so với lô dùng bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” liều 1 chứng



tỏ thuốc có xu hướng tác dụng tăng theo mức liều, tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) và cần được nghiên cứu đánh giá thêm. Kết quả này cho thấy cao chiết nước bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” liều 11,62 g/kg/ngày và liều 23,24 g/kg/ngày có tác dụng trong ức chế sự phát triển u hạt tương đương với prednisolon liều 5mg/kg/ngày ($p > 0,05$). Kết quả này phù hợp với đặc tính chống viêm của các vị thuốc thành phần, và được xem là kết quả của sự phối kết hợp hợp lý của các vị thuốc thành phần để tạo ra được tác dụng tác dụng chống viêm với hiệu quả rõ rệt.

Một số nghiên cứu của các tác giả đã công bố cũng đã khẳng định tác dụng chống viêm của các dược liệu thành phần. Tectorigenin tách chiết từ thân rễ Xạ can có tác dụng giảm đau rõ rệt nhất ở liều 100 mg/kg cân nặng chuột nhắt. Với liều 60 mg/kg cân nặng chuột cống, tectorigenin có tác dụng chống viêm cấp và mạn [4]. Trấu không là vị thuốc được dân gian dùng để sát trùng, chống lở loét, chống viêm nhiễm...[3]. Trong nghiên cứu này, tác dụng chống viêm tập trung vào đánh giá

tác dụng chống viêm mạn, thể hiện thông qua tác dụng làm tăng khả năng ức chế tạo u hạt ở chuột, với mục tiêu đánh giá tác dụng liên quan trên lâm sàng là điều trị viêm họng mạn tính. Các biểu hiện chống viêm khác của bài thuốc cũng cần được nghiên cứu sâu hơn.

KẾT LUẬN

- Chưa xác định được LD50 của bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” trên chuột nhắt trắng, mặc dù chuột đã uống đến liều tối đa 249g dược liệu/kg trong 1 ngày, gấp 12,5 lần liều dự kiến có tác dụng.

- Dịch chiết nước của bài thuốc “Viêm họng mạn tính HV” liều 11,62g dược liệu/kg/ngày, và liều 23,24g dược liệu/kg/ngày thể hiện tác dụng chống viêm mạn trên mô hình gây viêm mạn ở chuột cống trắng bằng amian, giảm khối lượng u hạt khi cân tươi cũng như sau khi sấy khô, có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với lô chứng gây bệnh không dùng thuốc, và tương đương so với Prednisolon liều 5mg/kg/ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2018). *Dược điển Việt Nam, lần xuất bản thứ năm, tập 2, tr 1063 – 1405*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Đỗ Trung Đàm (2014). *Phương pháp xác định độc tính của thuốc, tr 101-112*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
3. Đỗ Tất Lợi (2015). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, tr 654, 730, 882*. Nhà Xuất Bản Y học.
4. Đỗ Thị Thanh Huyền (2016), *Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của hai loài sâm đại hành (Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb) và Xạ can (Belamcanda chinensis (L.) DC.)*, Luận án tiến sỹ hóa học, Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST.
5. Nguyễn Nhược Kim (2011), *Lý luận Y học cổ truyền*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
6. Nguyễn Thị Ngọc Dinh (2006), *Cẩm nang về chữa các chứng bệnh tai mũi họng*, NXB Y học.
7. H.Gerhard Vogel (2008). *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. Springer.
8. Turner A. (1965): *Screening methods in pharmacology*, Academic Press, New York and London, pp 60 - 68.
9. World Health Organization (2000), *Working group on the safety and efficacy of herbal medicine, p19-35*, Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization.