

Nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn của cao lỏng Actiso trên thực nghiệm

STUDY OF SEMI-PERMANENT TOXICITY OF ACTISO EXTRACT ON EXPERIMENT

Phạm Thị Vân Anh¹, Vũ Việt Hằng¹, Phạm Văn Tú²
Trần Quang Minh², Nguyễn Duy Thuần³, Đinh Thị Thu Hằng¹

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Văn phòng HDND.T. Hà Giang, Ủy ban KTTU Hà Giang

³Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá độc tính bán trường diễn của cao lỏng Actiso theo đường uống trên động vật thực nghiệm. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn theo hướng dẫn của WHO, chuột cống được uống liên tục cao lỏng Actiso với mức liều 0,2 g/kg/ngày và 1,0 g/kg/ngày trong vòng 4 tuần liên tục. Kết quả cho thấy cao lỏng Actiso khi dùng đường uống liều 0,2 g/kg/ngày và 1,0 g/kg/ngày liên tục trong 4 tuần không ảnh hưởng đến tình trạng chung, thể trọng, các chỉ số huyết học, chức năng gan, thận và mô bệnh học gan, thận trên chuột cống trắng. Như vậy cao lỏng Actiso không gây độc tính bán trường diễn trên động vật thực nghiệm.

Từ khóa: Actiso, bán trường diễn, động vật thực nghiệm.

SUMMARY

Objectives: The research evaluated the sub-chronic toxicities of artichoke (*Cynara scolymus* L.) liquid extract through oral administration in experimental animals.

Methods: The sub-chronic toxicity study was conducted by the recommendation of WHO in rats with oral doses of 0.2 g/kg/day and 1.0 g/kg/day in 4 consecutive weeks. As a result, oral administration of *Cynara scolymus* L. liquid extract at the doses of 0.2 g/kg/day and 1.0 g/kg/day had no effect on general condition, body weight, hepato-renal functions and histopathological structures of liver and kidney. In conclusion, *Cynara scolymus* L. extract does not appear to produce sub-chronic toxicities in experimental animals.

Key words: artichoke (*Cynara scolymus* L.), sub-chronic toxicity, experimental animals.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, việc nghiên cứu các thuốc có nguồn gốc tự nhiên đã và đang ngày càng phát triển mạnh mẽ. Chúng thường có ưu điểm hơn về giá thành

cũng như an toàn hơn cho người sử dụng [1].

Actiso được sử dụng từ lâu đời trong điều trị các bệnh rối loạn mỡ máu, đái tháo đường, ... [2]. Actiso là loài thực vật có chứa các chất chống

Ngày nhận bài: 3/5/2021

Ngày phản biện: 4/5/2021

Ngày chấp nhận đăng: 7/5/2021



oxy hoá tự nhiên như acid clorogenic, flavonoid (luteolin và apigenin),... [3]. Do vậy, actiso đã thể hiện hoạt tính kháng ung thư, chống viêm, chống loét, tăng lực, hạ đường huyết, hạ cholesterol và bảo vệ gan trong nhiều nghiên cứu trên thực nghiệm cũng như trên lâm sàng [4].

Tuy nhiên, trên thế giới cũng như ở Việt Nam cho đến nay chưa có công trình nghiên cứu đầy đủ về tính an toàn của Actiso trên thực nghiệm. Do đó, nhằm tạo tiền đề cho việc nghiên cứu tính an toàn và tác dụng của cao lỏng Actiso trên lâm sàng, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu nhằm đánh giá độc tính bán trường diễn của cao lỏng Actiso trên thực nghiệm.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chất liệu nghiên cứu

- Cao lỏng Actiso do do Hợp tác xã Chế biến Nông sản Hà Giang cung cấp, thuộc giống Actiso bản địa, quy hoạch trồng trên vùng núi thuộc huyện Quán Bạ, tỉnh Hà Giang theo tiêu chuẩn Vietgap.

- Cách bào chế:

+ Nguyên liệu đầu vào: 40 kg actiso tươi (70% lá và 30% hoa).

+ Nguyên liệu được làm sạch và nấu trong hệ thống dây truyền lò hơi khép kín với nhiều công đoạn trong thời gian 5 ngày, thu được cao lỏng actiso vị thơm, đắng ngọt.

Máy móc, hóa chất phục vụ nghiên cứu

Cân điện tử của Nhật, độ chính xác 0,001 g. Kit định lượng các enzym và chất chuyển hoá trong máu: ALT, AST, bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol toàn phần và creatinin của hãng Hospitex Diagnostics (Italy) và hãng DIALAB GmbH (Áo), định lượng trên máy sinh hóa bán tự động Erba của Ấn Độ. Các dung dịch xét nghiệm máu của hãng Exigo, định lượng trên máy Exigo - Boule Medical AB của Thụy Điển. Các hoá chất xét

nghiệm và làm tiêu bản mô học.

Đối tượng nghiên cứu

Chuột cống trắng chủng Wistar, cân nặng 180 ± 20 g do Trung tâm cung cấp động vật thí nghiệm Đan Phượng – Hà Nội cung cấp.

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

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao lỏng Actiso

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng theo đường uống theo hướng dẫn của WHO [5]:

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

- Lô chứng: Uống nước cất với thể tích 1 mL/100 g/ngày.

- Lô trị 1: Uống cao lỏng Actiso liều 0,2 g/kg/ngày với thể tích 1 mL/100 g/ngày

- Lô trị 2: Uống cao lỏng Actiso liều 1,0 g/kg/ngày (gấp 5 lần lô trị 1) với thể tích 1 mL/100 g/ngày.

Chuột được uống nước hoặc thuốc thử trong 4 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, thể tích trung bình hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu; đánh giá chức năng gan thông qua định lượng chất chuyển hoá trong máu: bilirubin toàn phần, albumin và cholesterol toàn phần, đánh giá mức độ hủy hoại tế bào gan thông qua định lượng hoạt độ enzym trong máu: ALT, AST; đánh giá chức năng thận thông qua định lượng nồng độ creatinin huyết thanh.

Các thông số theo dõi được kiểm tra vào trước lúc uống thuốc, sau 2 tuần uống thuốc, sau 4 tuần uống thuốc.

- Mô bệnh học: Sau 4 tuần uống thuốc, 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).

Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp t-test Student, test t trước-sau, bằng

phần mềm Excel 2010.

Số liệu được biểu diễn dưới dạng : $\bar{X} \pm SD$. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

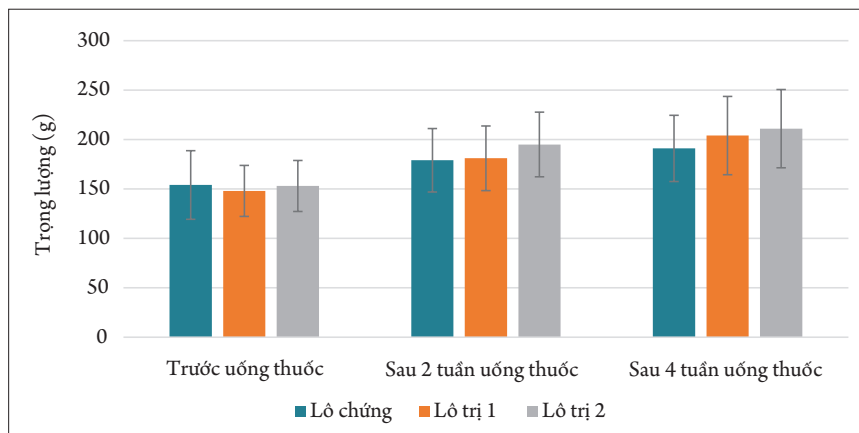
KẾT QUẢ

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao lỏng Actiso

Ảnh hưởng của cao lỏng Actiso lên tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng của chuột

* *Tình trạng chung*: Trong thời gian thí nghiệm, chuột ở cả 3 lô hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, phân khô.

* *Sự thay đổi thể trọng chuột*:



Biểu đồ 1. Ảnh hưởng của cao lỏng Actiso đến thể trọng chuột

Chú thích: ***,***: Khác biệt so với thời điểm “Trước uống thuốc” với $p < 0,05$, $p < 0,01$ và $p < 0,001$.

Kết quả ở biểu đồ 1 cho thấy: Sau 2 tuần và 4 tuần nghiên cứu, trọng lượng chuột ở 2 lô uống cao lỏng Actiso đều tăng có ý nghĩa thống kê so

với trước khi nghiên cứu. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về trọng lượng chuột giữa các lô dùng thuốc thử với lô chứng sinh học ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của cao lỏng Actiso tới chức năng tạo máu

Bảng 1. Ảnh hưởng của cao lỏng Actiso đến một số chỉ tiêu huyết học trong máu chuột

Chỉ tiêu	Nhóm nghiên cứu	Trước uống thuốc	Sau 2 tuần uống thuốc	Sau 4 tuần uống thuốc
Số lượng hồng cầu (T/l)	Lô chứng	8,53 ± 0,74	8,73 ± 1,08	8,78 ± 1,17
	Lô trị 1	7,72 ± 0,99	8,72 ± 1,15	8,09 ± 0,97
	Lô trị 2	7,79 ± 0,85	8,62 ± 0,91	8,66 ± 1,25
	p	> 0,05	> 0,05	> 0,05



Hàm lượng huyết sắc tố (g/dl)	Lò chứng	12,54 ± 1,02	11,75 ± 1,15	11,28 ± 1,62
	Lò trị 1	11,50 ± 1,20	12,24 ± 1,11	10,79 ± 1,04
	Lò trị 2	11,44 ± 1,33	11,94 ± 1,39	11,19 ± 1,80
	p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Hematocrit (%)	Lò chứng	46,26 ± 3,87	44,78 ± 4,97	42,72 ± 6,36
	Lò trị 1	42,39 ± 4,44	46,34 ± 5,06	40,12 ± 4,55
	Lò trị 2	42,55 ± 4,16	45,23 ± 5,78	42,26 ± 6,80
	p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Tiểu cầu (G/l)	Lò chứng	664,20 ± 70,10	623,20 ± 156,75	699,10 ± 113,47
	Lò trị 1	593,80 ± 84,88	680,80 ± 104,26	674,50 ± 90,21
	Lò trị 2	618,00 ± 83,06	712,90 ± 118,13	664,50 ± 111,57
	p	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 1 cho thấy: Sau 2 tuần và 4 tuần uống cao lỏng Actiso, số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit và số lượng tiểu cầu ở cả lò trị 1 và lò trị 2 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lò chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

Bảng 2. Ảnh hưởng của cao lỏng Actiso đến công thức bạch cầu trong máu chuột

Chỉ tiêu	Nhóm nghiên cứu	Trước uống thuốc	Sau 2 tuần uống thuốc	Sau 4 tuần uống thuốc
Số lượng bạch cầu (G/l)	Lò chứng	8,30 ± 1,60	9,13 ± 2,14	9,74 ± 1,50
	Lò trị 1	8,39 ± 2,51	9,52 ± 1,99	9,63 ± 2,43
	Lò trị 2	8,88 ± 1,49	9,10 ± 2,16	9,61 ± 1,58
	p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Số lượng bạch cầu lympho (%)	Lò chứng	75,60 ± 8,06	68,30 ± 7,65	68,91 ± 7,02
	Lò trị 1	69,40 ± 5,17	72,47 ± 6,62	66,63 ± 2,60
	Lò trị 2	72,34 ± 3,90	71,00 ± 4,70	67,93 ± 9,52
	p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Số lượng bạch cầu trung tính (%)	Lò chứng	10,43 ± 4,84	12,16 ± 3,21	14,18 ± 4,73
	Lò trị 1	14,16 ± 3,73	10,88 ± 3,31	16,58 ± 2,24
	Lò trị 2	13,01 ± 4,34	13,07 ± 4,05	15,93 ± 7,29
	p	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Sau 2 tuần và 4 tuần uống cao lỏng Actiso, số lượng bạch cầu và công thức bạch cầu ở cả lò trị 1 và lò trị 2 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lò chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$) (Bảng 2).

Ảnh hưởng của cao lỏng Actiso đến chức năng gan

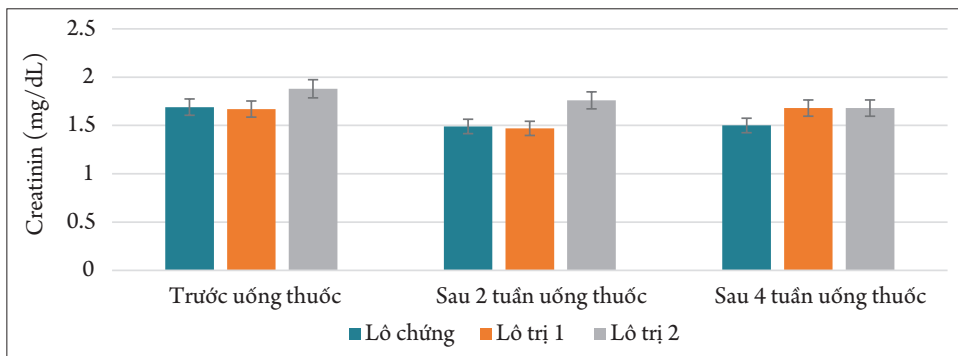
Bảng 3. Ảnh hưởng của cao lỏng Actiso đến chức năng gan chuột

Chỉ tiêu	Nhóm nghiên cứu	Trước uống thuốc	Sau 2 tuần uống thuốc	Sau 4 tuần uống thuốc
Hoạt độ AST (UI/l)	Lô chứng	99,10 ± 16,34	97,70 ± 12,43	84,70 ± 18,63
	Lô trị 1	84,50 ± 22,76	107,40 ± 27,45	93,70 ± 24,01
	Lô trị 2	103,10 ± 29,54	116,40 ± 26,36	86,30 ± 19,64
	p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Hoạt độ ALT (UI/l)	Lô chứng	45,40 ± 13,70	42,70 ± 9,51	41,00 ± 19,45
	Lô trị 1	35,40 ± 6,50	39,30 ± 11,39	36,50 ± 9,76
	Lô trị 2	40,20 ± 9,82	45,90 ± 8,36	33,20 ± 5,92
	p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Bilirubin toàn phần (mmol/l)	Lô chứng	13,20 ± 0,77	13,43 ± 0,22	13,36 ± 0,44
	Lô trị 1	13,56 ± 0,59	13,33 ± 0,31	13,37 ± 0,31
	Lô trị 2	13,53 ± 0,61	13,57 ± 0,30	13,36 ± 0,21
	p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Albumin (g/dl)	Lô chứng	3,14 ± 0,31	3,43 ± 0,36	3,04 ± 0,31
	Lô trị 1	2,92 ± 0,30	3,06 ± 0,46	2,84 ± 0,13
	Lô trị 2	2,89 ± 0,47	3,07 ± 0,42	3,11 ± 0,25
	p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Cholesterol (mmol/l)	Lô chứng	1,69 ± 0,20	1,49 ± 0,34	1,50 ± 0,23
	Lô trị 1	1,67 ± 0,18	1,47 ± 0,31	1,68 ± 0,27
	Lô trị 2	1,88 ± 0,21	1,76 ± 0,22	1,68 ± 0,22
	p	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3 cho thấy: Sau 2 tuần và 4 tuần uống cao lỏng Actiso, hoạt độ AST, ALT, albumin, cholesterol toàn phần, bilirubin toàn phần trong máu chuột cống trắng cả lô trị 1 và lô trị 2 đều

không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của cao lỏng Actiso lên chức năng thận



Biểu đồ 2. Ảnh hưởng của cao lỏng Actiso đến nồng độ creatinin trong máu chuột

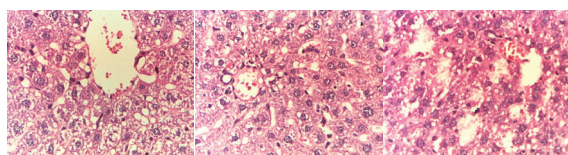


Sau 2 tuần và 4 tuần uống cao lỏng Actiso, ở cả lô trị 1 và lô trị 2, nồng độ creatinin trong máu chuột cống trắng không có sự thay đổi khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$) (Biểu đồ 2).

Thay đổi về mô bệnh học

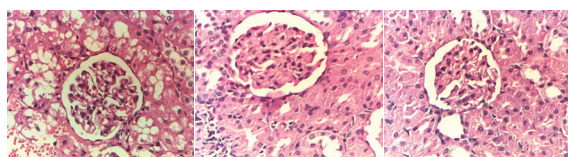
Đại thể: Trên tất cả các chuột cống trắng thực nghiệm (cả lô chứng và 2 lô trị), không quan sát thấy có thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan tim, phổi, gan, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá của chuột.

Vi thể: Sau 4 tuần uống thuốc thử, cấu trúc vi thể gan và thận của lô trị 1 và lô trị 2 không có sự khác biệt rõ rệt so với lô chứng sinh học (Hình 1 và Hình 2).



Lô chứng Lô trị 1 Lô trị 2

Hình 1. Hình ảnh vi thể gan (HE × 400)



Lô chứng Lô trị 1 Lô trị 2

Hình 2. Hình ảnh vi thể thận (HE × 400)

BÀN LUẬN

Ảnh hưởng của cao lỏng Actiso lên tình trạng chung và thể trọng của chuột và cơ quan tạo máu

Theo hướng dẫn của WHO, tình trạng chung, trọng lượng cơ thể và các chỉ số huyết học là những xét nghiệm bắt buộc khi đánh giá độc tính của thuốc thử. Máu là một tổ chức quan trọng vì máu liên quan mật thiết với mọi bộ phận, cơ quan trong cơ thể [5]. Về mặt bệnh lý, máu chịu ảnh hưởng của

tất cả các tổ chức đó nhưng đồng thời cũng bị ảnh hưởng và phản ánh tình trạng riêng của cơ quan tạo máu. Nếu thuốc có ảnh hưởng đến cơ quan tạo máu thì trước hết các thành phần của máu sẽ bị thay đổi, đặc biệt thường làm giảm số lượng bạch cầu. Vì vậy, các xét nghiệm về số lượng hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu, số lượng tiểu cầu trên chuột cống cần được xác định. Định lượng huyết sắc tố cho biết rõ chức năng của hồng cầu. Thể tích trung bình hồng cầu phản ánh đặc điểm của tình trạng thiếu máu. Hematocrit là tỷ lệ % giữa khối hồng cầu và máu toàn phần [6]. Nếu thuốc làm thay đổi số lượng hồng cầu hoặc làm mất nước hay ú nước trong tế bào máu thì chỉ số này sẽ thay đổi. Kết quả nghiên cứu cho thấy trọng lượng chuột ở cả 3 lô (lô chứng và 2 lô trị) đều tăng rõ rệt so với trước khi nghiên cứu, không có sự khác biệt giữa lô chứng sinh học và các lô dùng thuốc thử. Tất cả các chỉ số huyết học ở lô chứng sinh học và cả 2 lô trị đều trong giới hạn bình thường, thay đổi không có ý nghĩa thống kê so với trước khi dùng thuốc thử và so với lô chứng sinh học ở cả 2 thời điểm sau 2 tuần và 4 tuần uống liên tục thuốc thử. Như vậy, cao lỏng Actiso đều không làm ảnh hưởng đến tình trạng chung, trọng lượng của chuột và không thể hiện độc tính trên các cơ quan tạo máu.

Ảnh hưởng của cao lỏng Actiso đến chức năng gan, thận

Trong cơ thể, gan có nhiều chức năng quan trọng. Việc đưa thuốc vào cơ thể có thể gây độc với gan, làm ảnh hưởng đến chức năng của cơ quan này. Vì vậy, khi đánh giá độc tính của thuốc thì nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc đối với chức năng gan là rất cần thiết [5]. Để đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan, nồng độ các enzym có nguồn gốc tại gan (AST, ALT) trong huyết thanh thường được định lượng. Ngoài ra, người ta còn đánh giá chức năng gan qua các chỉ số nồng độ bilirubin toàn



phần, cholesterol toàn phần và albumin trong máu [6]. Kết quả cho thấy sau 2 tuần và 4 tuần uống cao lỏng Actiso, các chỉ số hoạt độ AST, ALT, nồng độ bilirubin toàn phần, cholesterol toàn phần và albumin trong máu không thay đổi có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử.

Thận là cơ quan bài tiết của cơ thể, nhu mô thận rất dễ tổn thương bởi các chất nội sinh và ngoại sinh. Vì vậy, khi đưa thuốc vào cơ thể thuốc có thể gây tổn thương thận, từ đó ảnh hưởng đến chức năng thận [7]. Creatinin là thành phần đạm trong máu ổn định nhất, hầu như không phụ thuộc vào chế độ ăn hoặc những thay đổi sinh lý mà chỉ phụ thuộc vào khả năng đào thải của thận. Khi cầu thận bị tổn thương, nồng độ creatinin máu tăng sớm hơn ure. Do vậy, creatinin máu là chỉ tiêu tin cậy và quan trọng hơn ure máu, nên hiện nay dùng để đánh giá và theo dõi chức năng thận [1]. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ creatinin trong máu chuột sau dùng cao lỏng Actiso không có sự thay đổi khác biệt với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử.

Ảnh hưởng của cao lỏng Tỏi đen lên cấu trúc đại thể và vi thể

Theo hướng dẫn của WHO, giải phẫu đại thể và vi thể gan thận là chỉ số bắt buộc khi đánh giá độc tính bán trường diễn. Ngoài ra, xét nghiệm vi thể còn là tiêu chuẩn vàng để đánh giá tổn thương 2 cơ quan chính chịu trách nhiệm chuyển hóa và thải trừ thuốc là gan và thận [5]. Trên tất cả chuột nghiên cứu, không quan sát thấy có thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan. Kết quả giải phẫu bệnh cho thấy cao lỏng Actiso cả 2 liều khi dùng đường uống trên chuột cống liên tục trong 4 tuần không làm thay đổi hình ảnh mô bệnh học gan và thận so với lô chứng sinh học.

KẾT LUẬN

Cao lỏng Actiso khi dùng đường uống trong 4 tuần liên tục với 2 mức liều 0,2 g/kg/ngày và liều cao gấp 5 lần (1,0 g/kg/ngày) không gây độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng thông qua không ảnh hưởng đến tình trạng chung, thể trọng, chức năng của hệ tạo máu và chức năng gan, thận chuột cống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. De Jong WH, Carraway JW and Geertsma RE. In vivo and in vitro testing for the biological safety evaluation of biomaterials and medical devices. *Biocompatibility and Performance of Medical Devices*. 2012;120-158.
2. Viện Dược liệu. *Cây thuốc và động vật làm thuốc*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2007.
3. Ben Salem M, Affes H, Ksouda K, et al. Pharmacological studies of artichoke leaf extract and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr*. 2015;70:441–53.
4. El-Boshy M, Ashshi A, Gaith M, et al. Studies on the protective effect of the artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against cadmium toxicity-induced oxidative stress, hepatorenal damage, and immunosuppressive and hematological disorders in rats. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24:12372–383.
5. World Health Organization. *Working group on the safety and efficacy of herbal medicine*, Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization. 2000.
6. Nguyễn Thế Khánh, Phạm Tử Dương. *Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học. 2001.
7. Vũ Đình Vinh. *Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hoá*, Nhà xuất bản Y học. 2001,115-287.