



Xác định độc tính cấp và tác dụng bảo vệ tế bào gan của viên nén bình can NK trên thực nghiệm

DETERMINE ACUTE TOXICITY AND EVALUATE THE HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF BINH CAN NK TABLETS ON EXPERIMENT

Phạm Thị Thanh, Phạm Thanh Tùng, Nguyễn Thị Lan, Phạm Quốc Bình, Nguyễn Thị Vân Anh

Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định độc tính cấp và đánh giá tác dụng bảo vệ gan của viên nén Bình Can NK trên thực nghiệm.

Đối tượng, phương pháp nghiên cứu: Xác định độc tính cấp bằng đường uống và đánh giá tác dụng bảo vệ gan trên chuột nhắt trắng chủng Swiss theo mô hình gây tổn thương gan chuột thực nghiệm bằng Paracetamol; Thuốc tham chiếu là Silymarin.

Kết quả: Viên nén Bình Can NK liều 13,10mg/kg/24h có tác dụng làm giảm alanine transaminase (ALT); Bình Can NK liều 39,30mg/kg/24h làm giảm hoạt độ enzym aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT). Tác dụng này tương đương tác dụng của Silymarin; kết quả phân tích đại thể và vi thể gan chuột cho thấy viên nén Bình Can NK và silymarin có tác dụng giảm tổn thương gan.

Từ khóa: Bình Can NK; Paracetamol; Tác dụng bảo vệ gan; Tổn thương gan; Chuột nhắt trắng.

SUMMARY

Objectives: Identify acute toxicity and evaluate on hepatoprotective effects of Binh Can NK tablets.

Subjects and methods: Determination of oral toxicity and protective effect enhancing hepatic function in Swiss mice following the model of experimental mice's liver damage with Paracetamol. The comparator is Silymarin.

Results: Binh Can NK tablets with dose of 13.10mg/kg/24h have the effect of reducing alanine transaminase (ALT); Can NK dose 39.30mg/kg/24h reduces the activity of enzymes aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT). The results of macroscopic and microscopic analysis of rat liver showed that Binh Can NK tablets and silymarin have the effect of reducing liver damage.

Keywords: Binh Can NK, Paracetamol, Hepatoprotective effect; Liver damage; White mice.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Gan là tạng lớn của cơ thể, đảm nhiệm nhiều chức năng quan trọng và phức tạp, đóng vai trò quan trọng trong quá trình khử độc và chuyển hoá các

chất. Gan là cơ quan chuyển hóa biến đổi các chất độc nội hoặc ngoại sinh thành các chất không độc để đào thải ra ngoài. Khi gan bị tổn thương, bệnh lý của gan thường nặng và ảnh hưởng đến hoạt động

Ngày nhận bài: 10/9/2021

Ngày phản biện: 14/9/2021

Ngày chấp nhận đăng: 30/9/2021



chức năng của nhiều cơ quan trong cơ thể.

Ở Việt Nam, bệnh lý gan mật là một trong những nhóm bệnh phổ biến, chiếm 29,9% tổng số các bệnh lý lâm sàng, trong đó thường gặp nhất là viêm gan do virus (VGVR) chiếm 16,7%. Hoặc viêm gan do nhiễm độc thuốc hoặc hóa chất ngày một gia tăng.

Trên thực tế đã có một số thuốc bảo vệ gan có tác dụng tương đối tốt được dùng trong điều trị trong lâm sàng như Sylimarín, biphenyl dimethyl dicarbonxylat (Fortex...) nhưng chủ yếu là các sản phẩm nhập ngoại, giá thành cao không phù hợp với điều kiện kinh tế của đa số người bệnh khi phải điều trị lâu dài. Trong khi đó ở nước ta, nhiều vị thuốc có nguồn gốc từ dược liệu có tác dụng nhuận gan, lợi mật đã được sử dụng từ lâu nhưng ít được nghiên cứu một cách có hệ thống để chứng minh, khẳng định tác dụng của chúng.

"Bình Can hoàng" là bài thuốc nghiệm phương của Lương y Nguyễn Kiều đã được sử dụng lưu truyền trong nhân dân có tác dụng cải thiện tốt chức năng gan, nhưng chưa được chứng minh trên cơ sở khoa học. Vì vậy việc nghiên cứu khẳng định tác dụng bảo vệ tế bào gan của bài thuốc được bào chế dưới dạng viên nén là hết sức cần thiết.

CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chất liệu nghiên cứu

viên nén Bình Can NK với thành phần: Nhân trần, Hoàng bá nam, Cỏ xước, Cam thảo nam, Cối xay, Lá chanh, Lá gai và tá dược vừa đủ 1200mg. Liều dùng 6 viên/24h/ 2 lần.

Đối tượng nghiên cứu

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, thuần chủng, cả hai giống, nặng 20 ± 2 gam, số lượng 100 con do Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp. Động vật được nuôi trong điều kiện đầy đủ thức ăn và nước

uống tại phòng thí nghiệm từ 7 - 10 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

Hóa chất gây tổn thương tế bào gan: Parateamol.

Thuốc chống dương: Silymarin, dạng viên nén, hàm lượng 70mg của hãng.

Kít định lượng các enzym và chất chuyển hóa trong máu.

Các hóa chất xét nghiệm và làm tiêu bản mô bệnh học.

Phương pháp nghiên cứu

** Nghiên cứu độc tính cấp của viên nén Bình can NK trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo hướng dẫn của Bộ Y tế Việt Nam, tiến hành theo phương pháp Litchfield- Wincoxon.*

Viên nén Bình Can NK được sản xuất tại viện nghiên cứu Y Dược cổ truyền Tuệ Tĩnh được nghiên cứu trong cối sứ pha thành hỗn dịch. Đây là hỗn dịch đậm đặc nhất có thể cho chuột nhắt trắng uống bằng kim chuyên dụng. Hỗn dịch đậm đặc này dùng để nghiên cứu độc tính cấp và xác định LD50 của viên nén Bình Can NK trên thực nghiệm.

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

Chuột được chia thành 5 lô khác nhau, mỗi lô 10 con.

Sau 12 giờ nhịn ăn, chuột được uống thuốc cường bức, thuốc thử được đưa thẳng vào dạ dày chuột bằng kim cong đầu tù.

Cho chuột uống hỗn dịch với thể tích 0,25ml/10g thể trọng/lần nhưng với các liều tăng dần, tối đa 3 lần/24 giờ, mỗi lần uống cách nhau 3 giờ. Tìm liều cao nhất không gây chết chuột, liều thấp nhất gây chết 100% số chuột và các liều trung gian.

** Nghiên cứu tác dụng bảo vệ chức năng gan của viên nén Bình Can NK trên thực nghiệm*

Nghiên cứu tác dụng bảo vệ tế bào gan của viên



nén Bình Can NK được thực hiện trên chuột nhắt trắng gây tổn thương tế bào gan bằng paracetamol

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

- Lô 1 (lô chứng sinh học): Uống dầu olive với thể tích 0,2 ml/10g

- Lô 2 (lô mô hình): Uống dầu olive + uống paracetamol 400mg/kg (0,2ml/10g)

- Lô 3 (lô uống silymarin): Uống silymarin liều 70 mg/kg/ngày + uống paracetamol 0,2ml/10g

- Lô 4 (lô uống BCNK liều 1): Uống Bình Can NK liều 13,10g được liệu /kg/24h + uống paracetamol 0,2ml/10g (liều có tác dụng tương đương trên người, tính theo hệ số ngoại suy của chuột nhắt trắng là 12).

- Lô 5 (lô uống BCNK liều 2): uống Bình Can

NK liều 39,30g được liệu /kg/24h + paracetamol 0,2ml/10g (liều gấp 3 liều lâm sàng, tính theo hệ số ngoại suy của chuột nhắt trắng là 12).

Chuột được uống dầu olive hoặc các thuốc thử liên tục trong 8 ngày. Ngày thứ 8, sau uống thuốc 1 giờ, chuột được nhện đói 16 - 18 giờ trước đó, gây tổn thương gan ở các lô từ lô 2 đến lô 5 bằng uống paracetamol liều 400mg/kg, với thể tích 0,2ml/10g, 48 giờ sau gây độc bằng paracetamol, lấy máu động mạch cảnh của chuột để xác định hoạt độ AST, ALT, đồng thời lấy gan để làm tiêu bản mô bệnh học.

Các chỉ tiêu theo dõi:

Đánh giá mức độ tổn thương gan: Xác định hoạt độ AST, ALT.

Đánh giá đại thể, vi thể gan chuột

Bảng 1. Bảng mô tả đánh giá vi thể gan chuột

Điểm	Mô tả
0 (-)	Gan bình thường
1 (+)	Tổn thương tối thiểu - mức độ nhẹ, khu trú, giới hạn ở vùng trung tâm tiểu thùy, và dưới ¼ tiểu thùy gan bị hoại tử
2 (++)	Tổn thương mức độ nhẹ - trung bình, khu trú hoặc lan tỏa nhiều ổ, hoại tử từ vùng trung tâm đến khoảng cửa chiếm ½ tiểu thùy gan
3 (+++)	Tổn thương mức độ trung bình – nặng, lan tỏa nhiều ổ, từ vùng trung tâm đến khoảng cửa, hoại tử chiếm trên ½ nhưng dưới ¾ tiểu thùy gan
4 (++++)	Tổn thương mức độ nặng, lan tỏa nhiều ổ, hoại tử trên ¾ tiểu thùy gan
5 (+++++)	Tổn thương mức độ rất nặng, hoại tử toàn bộ tiểu thùy gan từ tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy đến khoảng cửa, lan rộng các tiểu thùy lân cận

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả độc tính cấp của viên nén Bình Can NK

Bảng 2. Kết quả độc tính cấp của viên nén Bình Can NK

Lô chuột	n	Liều (ml/kg)	Liều (viên/kg)	Liều (gam được liệu/kg)	Tỷ lệ chết (%)	Dấu hiệu bất thường khác
Lô 1	10	30	12	109,2	0	Không

Lô 2	10	45	18	163,8	0	Không
Lô 3	10	60	24	218,4	0	Không
Lô 4	10	75	30	273	0	Không

Chuột nhắt trắng được uống viên nén BCNK từ liều thấp nhất đến liều cao nhất. Lô chuột đã uống đến liều 0,25 ml/10 g, 3 lần trong 24 giờ dung dịch đậm đặc nhất có thể cho uống được. Sau khi uống thuốc thử BCNK, tất cả các chuột không có hiện tượng gì đặc biệt: ăn uống, hoạt động bình thường, chuột không khó thở, không tiêu chảy, không thấy xuất hiện chuột chết trong vòng 72 giờ từ sau khi uống thuốc thử Bình Can NK. 7 ngày sau khi uống thuốc thử tất cả các chuột đều sống và không thấy có hiện tượng gì bất thường. Vì không có chuột chết ở lô có nồng độ cao nhất có thể cho chuột uống nên chưa xác định được LD50 của bài thuốc

BCNK trên chuột nhắt trắng theo đường uống bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon.

Như vậy các lô chuột uống viên nén BCNK liều từ 30 ml/kg (12 viên/kg) tương đương 109,2gam dược liệu/kg đến liều tối đa 75 ml/kg (30 viên/kg) tương đương 273gam dược liệu/kg mà các chuột vẫn bình thường, không thấy có chuột nào chết, chứng tỏ thuốc “ Bình can NK” có tính an toàn cao trong thử nghiệm độc tính cấp theo đường uống.

Tác dụng bảo vệ gan của viên nén Bình Can NK
Tác dụng của viên nén Bình Can NK lên các chỉ số AST, ALT

Bảng 3. Ảnh hưởng của viên nén Bình Can NK lên hoạt độ AST, ALT chuột thí nghiệm

Lô nghiên cứu	AST (UI/L)	p	ALT (UI/L)	p
Lô 1: chứng sinh lý (1)	211,60 ± 57,82		60,27 ± 12,54	
Lô 2: mô hình (2)	284,73 ± 72,40	$p_{2-1} < 0,05$	239,39 ± 127,22	$p_{2-1} < 0,001$
Lô 3: uống silymarin 70mg/kg (3)	198,84 ± 51,19	$p_{3-2} < 0,01$	92,56 ± 32,79	$p_{3-2} < 0,01$
Lô 4: uống BCNK liều 13,10g/kg/24h (4)	236,33 ± 95,26	$p_{4-2} < 0,05$	75,21 ± 10,67	$p_{4-2} < 0,001$
Lô 5: uống BCNK liều 39,30g/kg/24h (5)	194,94 ± 43,72	$p_{5-2} < 0,01$	61,73 ± 17,90	$p_{5-2} < 0,001$

ALT và AST là hai loại enzyme được giải phóng khi tổn thương tế bào gan. ALT có chủ yếu trong gan, AST không chỉ có trong gan mà còn có ở cơ tim, cơ vân ... vì vậy nồng độ ALT đặc hiệu cho các tổn thương ở gan hơn AST.

Trong nghiên cứu này, ở lô mô hình (gây độc nhưng không dùng thuốc), PAR với liều 400mg/kg dùng đường uống trên chuột nhắt trắng đã làm tăng hoạt độ AST, ALT so với nhóm chứng. Điều này chứng tỏ PAR đã gây tổn thương tế bào gan, làm giải phóng các enzyme vào máu.

Kết quả trên cho thấy khi chuột được uống

Silymarin 70mg/kg/ngày, uống Bình Can NK ở cả 2 mức liều (tương đương liều lâm sàng và gấp 3 lần liều lâm sàng), các chỉ số AST và ALT đều thấp hơn so với lô mô hình (gây tổn thương gan bằng PAR, không được sử dụng hoạt chất bảo vệ), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$. Như vậy, Silymarin và Bình Can NK ở 2 mức liều đều cho thấy tác dụng bảo vệ gan. Bình Can NK ở cả 2 mức liều đều có tác dụng bảo vệ gan tương tự silymarin liều 70 mg/kg/ngày.

Ảnh hưởng của viên nén Bình Can NK lên hình thái đại thể gan chuột



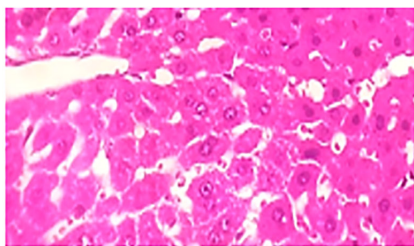
Bảng 4. Đặc điểm hình thái đại thể của gan

Lô thí nghiệm	Hình thái đại thể gan
Lô 1: Chứng sinh lý	Gan màu đỏ, mặt nhẵn, mật độ mềm, không phù nề, không xung huyết.
Lô 2: Mô hình	Gan có màu bạc, xung huyết, bề mặt sần sùi, có nhiều chấm xuất huyết. Các gan có mật độ rất lỏng lẻo
Lô 3: Uống symarin 70mg/kg	Gan màu đỏ, xung huyết nhẹ, không nhìn rõ điểm tổn thương. Mật độ gan tương đối lỏng lẻo.
Lô 4: uống BCNK liều 13,10g/kg/24h	Các gan có màu đỏ, một số gan có, bề mặt sần sùi, một số gan có chấm xuất huyết. Các gan có mật độ tương đối lỏng lẻo
Lô 5: uống BCNK liều 39,30g/kg/24h	Gan đa số màu đỏ, bề mặt mịn, một số xung huyết nhẹ, không phù nề, mật độ gan mềm.

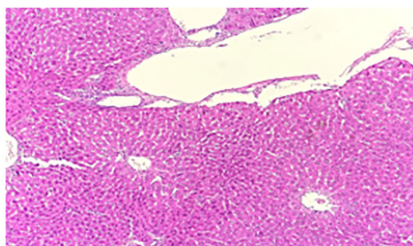
Kiểm tra đại thể gan giữa các lô thí nghiệm cho thấy: có sự khác biệt về hình ảnh đại thể của gan giữa các lô. PAR đã làm thay đổi cấu trúc, hình thái bề mặt của gan tại lô mô hình. Tại các lô uống PAR kết hợp Slimarin 70mg/kg/ngày hoặc Bình Can NK ở cả 2 mức liều, mức độ tổn thương về hình

thái, bề mặt có xu hướng nhẹ hơn so với lô mô hình, đặc điểm hình thái gan của 3 lô này tương tự nhau. Như vậy, tác dụng của Silimarin và Bình Can NK lên gan chuột là tương đương nhau.

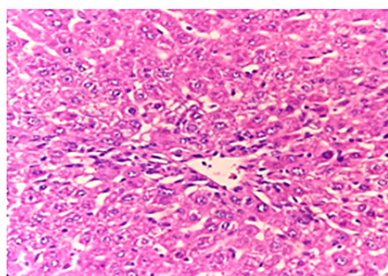
Ảnh hưởng của viên nén Bình Can NK lên cấu trúc vi thể gan chuột



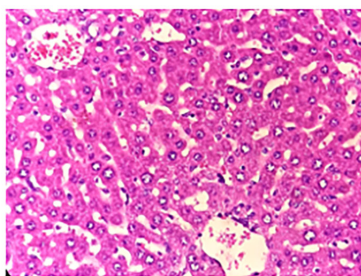
Hình thái vi thể gan chuột chứng



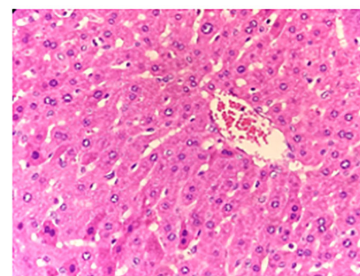
Hình thái vi thể gan chuột lô mô hình



Hình thái vi thể gan chuột lô uống Silymarin



Hình thái vi thể gan chuột lô uống Bình Can NK liều 13,10 mg/g/24h



Hình thái vi thể gan chuột lô uống Bình Can NK liều 39,30 mg/g/24h

Hình 2. Hình ảnh tiêu bản vi thể tế bào gan chuột



Ở lát cắt gan chuột bình thường uống nước cất: tế bào gan bình thường, cạnh khoảng cửa tế bào gan thoái hóa nhẹ.

Ở các lát cắt gan chuột uống PAR (lô mô hình) có sự thay đổi cấu trúc so với gan bình thường. Tổn thương mức độ nặng, lan tỏa nhiều ổ, hoại tử trên $\frac{3}{4}$ tiểu thùy gan.

Tại Lô chuột uống PAR kết hợp silymarin tổn thương gan mức độ trung bình – nặng, lan tỏa nhiều ổ, từ vùng trung tâm đến khoảng cửa, hoại tử chiếm trên $\frac{1}{2}$ nhưng dưới $\frac{3}{4}$ tiểu thùy gan, chứng tỏ hiệu quả bảo vệ gan của Silymarin.

Lô chuột uống PAR kết hợp Bình Can NK ở cả 2 mức liều 13,10mg/kg/24h và 39,30mg/kg/24 giờ cũng làm giảm tổn thương các tế bào gan: tổn thương mức độ trung bình – nặng, lan tỏa nhiều ổ,

từ vùng trung tâm đến khoảng cửa, hoại tử chiếm trên $\frac{1}{2}$ nhưng dưới $\frac{3}{4}$ tiểu thùy gan.

Như vậy, silymarin và Bình Can NK liều 13,10mg/kg/24h và liều 39,30mg/kg/24h đều có tác dụng bảo vệ gan thông qua làm giảm mức độ tổn thương tế bào gan khi so sánh với lô mô hình.

KẾT LUẬN

Chưa tìm thấy LD50 của viên nén Bình Can NK trên chuột nhắt trắng theo đường uống. Với liều cao nhất 75 ml/kg (30 viên/kg) tương đương 273gam được liệu/kg không xuất hiện độc tính cấp.

Bình Can NK có tác dụng bảo vệ gan thông qua tác dụng làm giảm hoạt độ AST, ALT, giảm tổn thương đại thể và vi thể gan. Tác dụng này tương đương tác dụng của Silimarin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Lê Quang Cường (2015)**, *Hướng dẫn thử nghiệm phi lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y thuốc từ dược liệu* (ban hành kèm theo Quyết định số QĐ-BYT ngày 1/2015).
2. **Bộ Y tế (2018)**, “Quy định về thử thuốc trên lâm sàng, Thông tư số 29/2018/TT-BYT ngày 29 tháng 10 năm 2018
3. **Phạm Hoàng Phiệt (2001)**, *Tổng quan tình hình viêm gan siêu vi B ở Việt Nam*, Hội thảo khoa học về điều trị viêm gan B ngày nay: Triển vọng mới cho bệnh nhân viêm gan B mạn tính, Hồ Chí Minh tháng 12/2001.
4. **Đỗ Trung Đàm (2001)**, “Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thực nghiệm”, *Tạp chí Dược học*, (3), tr.8-9
5. **Bộ Y tế (2018)**, *Dược điển Việt Nam III*, tr. 142
6. **Gerhard Vogel H. (2016)**, *Drug discovery and evaluation Pharmacological assays*, Springer.
7. **World Health Organization (2013)**, *Working group on the safety and efficacy of herbal medicine*, Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization
8. **Girish C., Koner B.C., Jayanthi S., Rao K. R., Rajesh B., Pradhan S. C.** – Hepatoprotective activity of six polyherbal formulations in paracetamol induced liver toxicity in mice, *Indian J Med Res.* **126** (2009) 569-578
9. **Chen P. J., Pang V. F., Jeng Y. M., Chen T. J., Hu F. C., Chi W. T., Chou H. Y., Chiu H. C., Lee Y. C and Sheen L. Y.** -Establishment of a standardized animal model of chronic hepatotoxicity using acetaminophen induced hepatotoxicity in the evaluation of hepatoprotective effects of health food, *Journal of Food and Drug Analysis* **20** (1) (2012) 41-47.