

Nghiên cứu độc tính cấp và ảnh hưởng lên các chỉ số huyết học của Cao khô thanh nhiệt trên thực nghiệm

STUDY ON THE ACUTE AND THE EFFECTS ON THE HEMATOLOGICAL INDEXES OF CAO KHO THANH NHIET POWDER ON EXPERIMENT

Hoàng Trọng Tuấn¹, Nguyễn Duy Thuận¹, Nguyễn Phương Hiền¹, Lê Thu Trang¹, Nguyễn Thị Thu Thủy², Nguyễn Hoàng Ngân³

¹ Học viện Y - Dược học cổ truyền Việt Nam;

² Trung tâm nhiệt đới Việt - Nga;

³ Học viện Quân Y

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu độc tính cấp và ảnh hưởng lên các chỉ số huyết học của Cao khô thanh nhiệt trên thực nghiệm.

Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu độc tính cấp của Cao khô thanh nhiệt trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp thử nghiệm giới hạn áp dụng cho mẫu thử có nguồn gốc từ thực vật ít độc tính, theo hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu của Bộ Y tế, đánh giá ảnh hưởng lên các chỉ số huyết học trên chuột cống trắng được tiến hành theo hướng dẫn của WHO theo đường uống.

Kết quả: Độc tính cấp: liều cao nhất 10g/kg (tương đương gấp khoảng 11 lần liều tối đa trên lâm sàng) không gây chết chuột, chưa xác định LD₅₀ theo đường uống. Ảnh hưởng lên các chỉ số huyết học: Cao khô thanh nhiệt ở cả 2 liều 525 mg/kg/24h (tương đương liều trên lâm sàng) và 1575 mg/kg/24h (gấp 3 liều lâm sàng) đều không gây ảnh hưởng đến các chỉ số huyết học của chuột cống trắng sau 30 ngày và 60 ngày uống thuốc.

Kết luận: Cao khô thanh nhiệt không gây độc tính cấp trên chuột nhắt trắng uống đến liều 10,0g/kg/24h, không gây ảnh hưởng đến các chỉ số huyết học khi cho chuột cống trắng uống liều 525 mg/kg/24h và liều 1575 mg/kg/24h liên tục trong 60 ngày.

Từ khóa: Cao khô thanh nhiệt, độc tính cấp, chỉ số huyết học.

SUMMARY

Objective: To study the acute toxicity and the effects on the hematological indexes of Cao kho thanh nhiet powder on experiment.

Subject and methods: The acute toxicity of Cao kho thanh nhiet powder was determined by using Litchfield- Wilcoxon method, the effects on hematological indexes were determined by using



WHO's guideline, both by taken orally.

Results: Acute toxicity: At the highest dose of 10,0g/kg (11 times the maximum expected clinical dose) was not lethal to the mice, the oral LD₅₀ was not determined. Effects on hematological indexes: Cao kho thanh nhiet powder at both doses of 525 mg/kg/24h (equivalent to expected clinical dose) and 1575 mg/kg/24h (3 times the expected clinical dose) did not affect the hematopoietic indexes of Wistar rats after 30 days and 60 days taken orally.

Conclusion: Cao kho thanh nhiet does not cause acute toxicity at a dose of 10g/kg/24h and does not affect the hematological indexes.

Keywords: Cao kho thanh nhiet powder, acute toxicity, hematological indexes.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Y học cổ truyền (YHCT) từ xưa đã đề cập đến những tổn thương cơ thể do nắng – nóng gây ra và xếp vào chứng trúng thử. Có nhiều bài thuốc điều trị trúng thử như: Bạch hổ gia nhân sâm thang, Trúc diệp thạch cao thang, An cung ngư hoàng hoàn, Chí bảo đan... [1], [2]. Căn cứ vào nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của chứng trúng thử (say nắng – say nóng) theo y học cổ truyền, chúng tôi nghiên cứu bào chế Cao khô thanh nhiệt phòng chống say nắng – say nóng. Cao khô thanh nhiệt được xây dựng trên cơ sở bài Sinh mạch tán, được gia thêm các vị thuốc giúp sản phẩm toàn diện hơn, phù hợp với nhiều bệnh cảnh khác nhau của chứng say nắng, say nóng. Cao khô thanh nhiệt được bào

chế tại Trung tâm nhiệt đới Việt - Nga, đạt tiêu chuẩn cơ sở. Để đánh giá tính an toàn của cao khô, nghiên cứu này được chúng tôi thực hiện với hai mục tiêu:

1. Đánh giá độc tính cấp của Cao khô thanh nhiệt trên thực nghiệm.

2. Đánh giá ảnh hưởng lên các chỉ số huyết học của Cao khô thanh nhiệt trên thực nghiệm.

CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chất liệu nghiên cứu

Chất liệu nghiên cứu là Cao khô thanh nhiệt, được bào chế từ bài thuốc thanh nhiệt, xây dựng trên cơ sở bài thuốc cổ phương "Sinh mạch tán". Các dược liệu đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V [3].

STT	Tên vị thuốc	Tên khoa học	Liều (gam) dược liệu
1	Nhân sâm	Radix Ginseng	10
2	Mạch môn	Ophiopogon japonicus (Thunb.) Ker. Gawl	15
3	Ngũ vị tử	Schisandra chinensis	5
4	Cát căn	Radix Puerariae	10
5	Cam thảo	Radix Glycyrrhizae	5
Tổng			45 (g)

Cao khô thanh nhiệt được bào chế theo quy trình công nghệ của Trung tâm nhiệt đới Việt - Nga, đạt tiêu chuẩn cơ sở. Đóng gói: đóng túi PE 2 lớp, có nhãn đúng quy định. Để nơi khô mát, tránh ánh sáng.

Liều dự kiến sử dụng trên người là 3,75g cao

khô dược liệu/người/ngày, hay 75mg cao khô dược liệu/kg/24h. Qui đổi ra liều dự kiến có tác dụng ở chuột nhắt trắng (hệ số 12) là 75 x 12 = 900 mg/kg/24h; liều dự kiến có tác dụng ở chuột cống trắng (hệ số 7) là 75 x 7 = 525 mg/kg/24h [4].

* **Hóa chất, máy móc dùng trong nghiên cứu:**

- Máy xét nghiệm sinh hóa tự động Chemix 180 hãng Sysmex;
- Máy xét nghiệm huyết học tự động XE2100, hãng Sysmex;
- Buồng VKH 21;
- Hệ thống PowerLab với các cảm biến: cảm biến nhiệt độ MLT 415/D, cảm biến huyết áp MLT 844, cảm biến ghi điện tim MLA 2540 (Nhật Bản);
- Cân phân tích 10-4, model CP224S (Sartorius - Đức);
- Bộ dụng cụ phẫu thuật động vật cỡ nhỏ, hóa chất và các dụng cụ thí nghiệm khác.

Động vật nghiên cứu

- Đánh giá độc tính cấp:

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, gồm 08 con, cân nặng $20,0 \pm 2,0g$, được nuôi trong phòng thí nghiệm bảo đảm theo yêu cầu.

- Đánh giá ảnh hưởng lên các chỉ số huyết học:

Chuột cống trắng trưởng thành cả hai giống, khỏe mạnh, gồm 30 con, cân nặng $180 \pm 20g$. Chuột cống trắng được chia thành 3 lô, mỗi lô 10 con. Chuột được cho uống thuốc thử hoặc nước cất liên tục trong 60 ngày, thể tích cho uống là $5ml/kg/24h$.

Phương pháp nghiên cứu

- Đánh giá độc tính cấp:

Đánh giá độc tính cấp và xác định LD50 của Cao khô thanh nhiệt trên chuột nhắt trắng. Độc tính cấp của Cao khô thanh nhiệt trên chuột nhắt trắng được xác định bằng đường uống theo phương pháp thử nghiệm giới hạn áp dụng cho mẫu thử có nguồn gốc từ thực vật ít độc tính, theo hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu của Bộ Y tế [5].

- Đánh giá ảnh hưởng lên các chỉ số huyết học:

* Động vật dùng trong nghiên cứu:

Chuột cống trắng trưởng thành cả hai giống, khỏe mạnh, gồm 30 con, cân nặng $180 \pm 20g$.

Chuột cống trắng được chia thành 3 lô, mỗi lô 10 con. Chuột được cho uống thuốc thử hoặc nước cất liên tục trong 60 ngày, thể tích cho uống là $5ml/kg/24h$.

- Lô chứng sinh lý: uống nước cất.

- Lô trị 1: uống Cao khô thanh nhiệt, liều $525 mg/kg/24h$.

- Lô trị 2: uống Cao khô thanh nhiệt, liều $1575 mg/kg/24h$.

* Phương pháp thực hiện:

Đánh giá ảnh hưởng lên các chỉ số huyết học của cao khô trên động vật thực nghiệm được xác định theo hướng dẫn của WHO, OECD [5],[6].

Các chỉ tiêu theo dõi:

- Đánh giá độc tính cấp:

* Thí nghiệm: Chuột nhắt trắng khỏe mạnh, được cho nhịn ăn 15 giờ trước khi thí nghiệm. Cho chuột uống Cao khô thanh nhiệt với liều tăng dần ($1,0g/kg$; $2,0g/kg$; $5,0g/kg$; $10,0g/kg$) trong thử nghiệm sơ bộ, mỗi mức liều thử trên 01 chuột. Thử nghiệm giới hạn với liều $10,0g/kg$ được tiến hành khi ở tất cả các mức liều đã thử chuột đều sống và không có biểu hiện độc tính. Tiếp tục cho 04 chuột khác uống mẫu thử với liều $10,0g/kg$. Theo dõi trong 7 ngày, sau đó tiếp tục theo dõi cho đến hết 14 ngày. Nếu có 3 con chết thì dừng thử nghiệm giới hạn, tiến hành thử nghiệm chính thức theo nguyên tắc giảm liều. Trong trường hợp này, LD50 nhỏ hơn mức liều giới hạn. Nếu có ít nhất 3 con sống thì LD50 lớn hơn mức liều giới hạn đã thử, dừng thử nghiệm và theo dõi tiếp cho đủ thời gian quy định hoặc tiến hành thử nghiệm chính thức ở các mức liều cao hơn để tính được giá trị LD50 nếu thấy cần thiết hoặc giảm để xác định mức liều không gây triệu chứng ngộ độc gì.

- Chức năng tạo máu qua các chỉ số huyết học:

Đánh giá chức năng 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. Các thông số theo dõi được kiểm tra vào trước lúc uống thuốc, sau 30 ngày uống thuốc và sau 60 ngày uống thuốc.

Thời gian, địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Tháng 6 – tháng 10/2022.

- Địa điểm nghiên cứu: Bộ môn Dược lý, Học viện Quân Y.

Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được thu thập và xử lý bằng phương pháp thống kê T-test Student. Số liệu được biểu diễn dưới dạng: $\bar{X} \pm SD$. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả đánh giá độc tính cấp của Cao khô thanh nhiệt trên thực nghiệm

Chuột nhắt trắng được uống Cao khô thanh nhiệt với liều tăng dần (1,0g/kg; 2,0g/kg; 5,0g/kg; 10,0g/kg) trong thử nghiệm sơ bộ, mỗi mức liều thử trên 01 chuột, tất cả các chuột đều sống và không có biểu hiện độc tính.

Thử nghiệm giới hạn với liều 10,0g/kg được tiến hành, tiếp tục cho 04 chuột khác uống mẫu thử với liều 10,0g/kg.

Kết quả theo dõi trong 7 ngày cho thấy tất cả các chuột uống mẫu thử đều sống và không có biểu hiện độc tính.

Các chuột được theo dõi tiếp cho đến hết 14 ngày, quan sát thấy chuột hoạt động, ăn uống bình thường, không có biểu hiện độc tính.

Bảng 1. Kết quả đánh giá độc tính cấp của Cao khô thanh nhiệt

Lô chuột	n	Liều (g/kg TLCT)	Tỷ lệ chết (%)	Dấu hiệu bất thường khác
Lô 1	01	1,0	0	Không
Lô 2	01	2,0	0	Không
Lô 3	01	5,0	0	Không
Lô 4	01	10	0	Không
Lô 5	01	10	0	Không
Lô 6	01	10	0	Không
Lô 7	01	10	0	Không
Lô 8	01	10	0	Không

Như vậy, chưa xác định được LD50 của Cao khô thanh nhiệt theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất cho chuột uống trong 24h là 10,0 g/kg thể trọng không

xuất hiện độc tính cấp.

Kết quả đánh giá ảnh hưởng lên các chỉ số huyết học của Cao khô thanh nhiệt trên thực nghiệm

Bảng 2. Ảnh hưởng của Cao khô thanh nhiệt đến các chỉ số huyết học của chuột

Chỉ số	Thời điểm	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	P_{2-1} P_{3-2} P_{3-1}
		(n=10) $\bar{X} \pm SD$	(n=10) $\bar{X} \pm SD$	(n=10) $\bar{X} \pm SD$	
Hồng cầu (T/l)	Trước uống	7,05 ± 0,56	6,95 ± 0,52	6,92 ± 0,76	> 0,05
	Sau 30 ngày	6,98 ± 0,54	7,11 ± 0,68	7,09 ± 0,59	
	Sau 60 ngày	7,02 ± 0,58	7,06 ± 0,49	7,01 ± 0,52	

Huyết sắc tố (g/dl)	Trước uống	13,02 ± 0,82	12,96 ± 0,75	12,93 ± 0,97	> 0,05
	Sau 30 ngày	12,86 ± 1,03	13,02 ± 0,98	12,98 ± 1,12	
	Sau 60 ngày	12,85 ± 1,16	13,06 ± 0,82	13,04 ± 0,74	
Hematocrit (%)	Trước uống	32,81 ± 2,30	32,79 ± 2,45	32,69 ± 2,25	> 0,05
	Sau 30 ngày	32,56 ± 1,69	33,04 ± 1,94	32,94 ± 1,98	
	Sau 60 ngày	32,65 ± 2,21	32,88 ± 1,76	32,69 ± 2,19	
MCV (fl)	Trước uống	46,68 ± 1,38	46,85 ± 1,63	46,28 ± 2,11	> 0,05
	Sau 30 ngày	46,35 ± 2,19	46,57 ± 1,45	46,64 ± 1,38	
	Sau 60 ngày	46,89 ± 1,67	46,72 ± 1,96	46,51 ± 2,21	
Bạch cầu (G/l)	Trước uống	6,92 ± 0,96	7,02 ± 1,71	6,95 ± 0,95	> 0,05
	Sau 30 ngày	6,89 ± 1,12	6,86 ± 1,05	7,09 ± 1,12	
	Sau 60 ngày	6,79 ± 1,68	6,94 ± 1,12	7,15 ± 1,71	
Tiểu cầu (G/l)	Trước uống	546,92 ± 91,12	533,86 ± 58,69	528,41 ± 83,96	> 0,05
	Sau 30 ngày	514,16 ± 97,57	542,42 ± 76,94	532,95 ± 71,72	
	Sau 60 ngày	525,81 ± 110,02	519,33 ± 84,36	560,91 ± 90,18	

Cao khô thanh nhiệt không ảnh hưởng đến các chỉ số huyết học của chuột.

BÀN LUẬN

Độc tính cấp của Cao khô thanh nhiệt

Độc tính cấp là độc tính xảy ra sau khi dùng thuốc một lần hoặc vài ba lần trong ngày. Đánh giá độc tính cấp của Cao khô thanh nhiệt được tiến hành bằng đường uống theo phương pháp thử nghiệm giới hạn áp dụng cho mẫu thử có nguồn gốc từ thực vật ít độc tính, theo hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu của Bộ Y tế [5].

Kết quả ở bảng 1 cho thấy Cao khô thanh nhiệt không có biểu hiện độc tính cấp ở liều 10,0g/kg. Cao khô thanh nhiệt ở liều gấp khoảng 11 lần liều dùng dự kiến trên người nhưng không có độc tính cấp trên chuột nhắt, theo đường uống (Tính người lớn trưởng thành 50 kg, hệ số ngoại suy trên chuột nhắt 12). Đồng thời, chưa xác định được LD50 trên

chuột nhắt trắng của Cao khô thanh nhiệt theo đường uống do không có chuột chết trong quá trình nghiên cứu. Như vậy, Cao khô thanh nhiệt có tính an toàn cao, khoảng an toàn điều trị rộng với liều dùng trên lâm sàng theo hướng dẫn của WHO [7]. So sánh với kết quả nghiên cứu của Phan Văn Minh (2018) sử dụng cao khô Giải Thử Khang cho kết quả tương tự ở liều dưới 48g/kg [8].

Ảnh hưởng lên các chỉ số huyết học của chuột

Máu là một tổ chức rất quan trọng vì máu liên quan mật thiết với mọi bộ phận, cơ quan trong cơ thể. 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 [7]. 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 các tế bào máu.

Huyết sắc tố trong hồng cầu có nhiệm vụ tiếp nhận oxy khi qua phổi và nhường lại lượng oxy đó cho các tế bào khi qua các mao mạch. 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 [7]. Hematocrit là tỷ lệ % giữa khối hồng cầu và máu toàn phần. Nếu thuốc làm thay đổi số lượng hồng cầu hoặc làm mất nước hay ứ nước trong tế bào máu thì chỉ số này sẽ thay đổi.

Vì vậy, các xét nghiệm về 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 của chuột thí nghiệm được xác định. Kết quả từ bảng 2 đều cho thấy các chỉ số trên của chuột ở cả hai lô trị đều không có thay đổi có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với trước khi sử dụng Cao khô thanh nhiệt và so với lô chứng ở cùng thời điểm. Như vậy, Cao khô thanh nhiệt không gây ảnh hưởng đến chức năng tạo máu của chuột nghiên cứu.

KẾT LUẬN

Chưa xác định được LD50 của Cao khô thanh nhiệt theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất cho chuột uống trong 24h là 10,0g/kg thể trọng không xuất hiện độc tính cấp.

Cao khô thanh nhiệt ở cả 2 liều 525 mg/kg/24h (tương đương liều trên lâm sàng) và 1575 mg/kg/24h (liều gấp 3) đều không gây ảnh hưởng đến thể trạng, các chỉ số tạo máu của chuột cống trắng sau 30 ngày và 60 ngày uống thuốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Tô Như Khuê, Nguyễn An Quy.** Nhận xét về một số chỉ tiêu thể lực chức năng sinh lý của các đơn vị bộ đội trong những năm qua. Kỷ yếu công trình KHKT Vệ sinh phòng dịch Bệnh truyền nhiễm, Tổng cục Hậu cần, Cục Quân y, 1981, tr.40-46.
- Bùi Thụy, Phạm Quý Soạn, Trần Văn Chấn.** Biến đổi và hồi phục mạch, nhiệt ở công nhân lò cao. Kỷ yếu công trình nghiên cứu y học lao động (1960 -1970), Viện Vệ sinh dịch tễ học, Hà Nội, 1970, tr. 1-2.
- Chang, C.-K., Chang, C.-P., Liu, S.-Y., & Lin, M.-T.** Oxidative stress and ischemic injuries in heat stroke. *Neurobiology of Hyperthermia*, 2007, pp.525–546.
- Đỗ Trung Đàm.** Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm. Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật. *Tạp chí dược học*, 2006, số 479, tr. 38-41.
- Bộ Y tế.** Hướng dẫn lập Thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu. Thông tư số 141/QĐ-K2ĐT, 2015, ngày 27/10/2015.
- Organization of Economic Co-operation and Development – OECD.** *The OECD Guideline for Testing of Chemicals: 423 Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method.* OECD, Paris, France, 2001.
- Nguyễn Thế Khánh, Phạm Tử Dương.** Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng. Nhà xuất bản Y học, 2001.
- Phan Văn Minh.** Đánh giá độc tính cấp, bán trường diễn và tác dụng tăng khả năng chịu đựng với gánh nặng nhiệt trên thực nghiệm của cao khô giải thử thang. Luận văn thạc sĩ Y học, Học viện Quân Y, 2018.