

Đánh giá độc tính cấp và ảnh hưởng đến chức năng tạo máu của bài thuốc Xương khớp bà Gioóng

ASSESSMENT OF ACUTE TOXICITY AND IMPACT IN HEMATOLOGIC FUNCTION OF XUONG KHOP BA GIOONG FOMULAR

Diệp Văn Trọng¹, Ngô Trí Tuệ², Đoàn Minh Thụy¹

¹ Học viện Y - Dược học cổ truyền Việt Nam

² Công ty Thuốc lá Thăng Long

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá độc tính cấp và ảnh hưởng lên chức năng tạo máu trên thực nghiệm của bài thuốc Xương khớp bà Gioóng.

Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu độc tính cấp thực hiện trên chuột nhắt trắng bằng đường uống dựa theo phương pháp Litchfield-Wilcoxon; Ảnh hưởng trên chức năng tạo máu thực hiện trên 30 chuột cống (Lô chứng: uống nước cất 1mL/kg trọng lượng cơ thể (TLCT); Lô trị 1: 14g dược liệu/kg TLCT; Lô trị 2: 42g dược liệu/kg TLCT. Chuột được uống nước cất hoặc thuốc thử trong 90 ngày liên tục.

Kết quả: Không có độc tính cấp của Xương khớp bà Gioóng khi dùng theo đường uống. Với liều lượng Xương khớp bà Gioóng cao nhất có thể đưa vào dạ dày chuột nhắt trắng là 375,0 g dược liệu/kg trọng lượng cơ thể (gấp 15,635 liều dùng trên người) không gây chết chuột nhắt trắng thực nghiệm; Xương khớp bà Gioóng không ảnh hưởng lên chức năng tạo máu của động vật thực nghiệm ở hai liều 14g dược liệu/kg TLCT và 42g dược liệu/kg TLCT uống trong 90 ngày liên tiếp.

Kết luận: Bài thuốc Xương khớp bà Gioóng không có độc tính cấp khi dùng theo đường uống và không ảnh hưởng lên chức năng tạo máu của động vật thực nghiệm.

Từ khóa: Thoái hóa khớp gối, xương khớp bà Gioóng.

SUMMARY

Objectives: Evaluate the acute toxicity and impact in hematologic function in experimental animals of Xuong khop ba Gioong Remedy.

Subject and methods: Acute toxicity was performed in Swiss mice orally by the Litchfield-Wilcoxon method; impact in hematologic function was carried on 30 Wistar rats (Control group: drunk water 1mL/kg body weight; Group 1: 14g herbs/kg TLCT; Group 2: 42g herbs/kg TLCT). The rats were kept taking water or trial medicine for 90 consecutive days.



Results: Xương khớp bà Gioong had not acute toxicity in the maximum dose of 375g herbs in experiment (15.635 times higher than the clinical dose) and Xương khớp bà Gioong remedy had not impact in hematologic functions of experimental animals at dose 14g herbs/kg BW and dose 42g herbs/kgBW, orally treated for 90 consecutive days.

Conclusions: Xương khớp bà Gioong remedy shows not acute toxicity and impact in hematologic function in experimental animals.

Key words: Knee osteoarthritis, Xương khớp bà Gioong.

ĐẶT VẤN ĐỀ

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 chế phẩm cần được xác định để đảm bảo an toàn khi thực hiện trên người [1].

Xương khớp bà Gioong là bài thuốc kinh nghiệm của bà Gioong - một thầy lang dân tộc Sán Dìu. Bài thuốc đã được bà sử dụng chữa cho nhiều trường hợp bệnh nhân thoái hóa khớp gối trong nhiều năm và cho kết quả khả quan. Mặc dù vậy, thuốc cần được thử độc tính để chứng minh độ an toàn cũng như nghiên cứu tác dụng dược lý để tìm hiểu cơ chế tác dụng và hiệu quả của thuốc một cách khoa học. Vì vậy, trong điều kiện cho phép, 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 của bài thuốc Xương khớp bà Gioong.

NGUYÊN LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu nghiên cứu

Thành phần bài thuốc xương khớp bà Gioong: Mẫu đơn bì 20g (*Cortex Radicis Paeoniae suffruticosae*), Dây đau xương 20g (*Caulis Tinosporae sinensis*), Câu đằng 20g (*Ramulus cum Unco Uncariae*), Kê huyết đằng 20g (*Caulis Spatholobi suberecti*), Tang kí sinh 20g (*Herba Loranthe Gracifloli*).

Bài thuốc được bào chế thành dạng cao lỏng

Tất cả các vị thuốc đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V [2].

Dịch chiết từ bài thuốc Xương khớp bà Gioong có tỉ lệ 1:1 (1ml dịch chiết tương đương 1g dược liệu của bài thuốc). Từ dịch chiết 1:1 thuốc được cô về cao lỏng. Quá trình chiết xuất được thực hiện bằng máy tự động tại Khoa Dược - Viện nghiên cứu Y dược cổ truyền Tuệ Tĩnh - Học viện Y - Dược học cổ truyền Việt Nam.

Động vật nghiên cứu

Thử độc tính cấp: 60 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: Chuột cống trắng chủng Wistar, cả 2 giống, 30 chuột, khỏe mạnh, trọng lượng 180 ± 20 g.

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, tỉ 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

Độc tính cấp: Số chuột chết/có biểu hiện bất thường trong suốt 7 ngày và tỷ lệ chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc; liều thuốc thử; các chỉ số liên quan đến tình trạng



chung của chuột: ăn, ngủ, vận động, bài tiết...; các chỉ số liên quan đến dấu hiệu nhiễm độc: nôn, co giật, kích động, bài tiết...

Chức năng tạo máu: số lượng hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu.

Tiến hành nghiên cứu

Độc tính cấp

Nghiên cứu độc tính cấp của bài thuốc Xương khớp bà Gioóng trên chuột nhắt trắng bằng đường uống trong thí nghiệm này dựa theo phương pháp Litchfield-Wilcoxon, hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới và thông tư hướng dẫn về thử thuốc trên lâm sàng của Bộ Y tế [1].

Dịch chiết từ bài thuốc Xương khớp bà Gioóng có tỉ lệ 1:1 (1ml dịch chiết tương đương 1g dược cao lỏng sau đó được cô thành tỷ lệ thích hợp để cho chuột uống. Liều dùng của thuốc được tính theo gam dược liệu. Tổng bài thuốc là 100g, được sử dụng trên người mỗi ngày 1 thang (100g). Như vậy liều dùng trên người là $100g/50kg/24h = 2g/kg/24h$. Quy đổi ra liều tương đương trên chuột nhắt trắng (hệ số quy đổi là 12) thì liều tương đương dự kiến trên chuột nhắt trắng tương đương liều dùng trên người là $24g/kg/24h$ [3].

Dung môi dùng làm chứng là nước cất.

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

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

Cho chuột uống thuốc với thể tích 0,25ml/10g thể trọng/lần với nước cao cô đặc dẫn đến mức không hút được qua kim, tối đa 3 lần/24 giờ, mỗi lần uống cách nhau ít nhất 3 giờ. Tìm liều cao nhất không gây chết chuột, liều thấp nhất gây chết 100% số chuột và các liều trung

gian.

Theo dõi tình trạng chung của chuột, quá trình diễn biến bắt đầu có dấu hiệu nhiễm độc (như nôn, co giật, kích động, bài tiết...) và số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc.

Tất cả chuột chết (nếu có) được mổ để đánh giá tổn thương đại thể và xác định nguyên nhân gây độc. Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD50 của thuốc thử.

Tiếp tục theo dõi tình trạng của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống cao lỏng Xương khớp bà Gioóng.

Chức năng tạo máu

Vi bài thuốc đã được sử dụng trên người, nên liều thuốc nghiên cứu được ngoại suy từ liều trên người, có tham khảo liều chết 50%: Quy đổi ra liều trên chuột cống (hệ số 7) là $14g/kg/24h$ [3].

Chuột cống được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 10 chuột (gồm 5 cái, 5 đực).

+ Liều lượng thuốc

- Lô chứng: uống nước cất 1ml/kg trọng lượng cơ thể (TLCT).

- Lô trị 1: $14g/kg$ TLCT.

- Lô trị 2 (gấp ba liều I): $42g/kg$ TLCT.

Chuột được uống nước cất hoặc thuốc thử trong 90 ngày liên tục, mỗi ngày một lần vào buổi sáng.

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 vào các thời điểm trước, sau 45 ngày và sau 90 ngày uống thuốc.

Cách dùng: chuột cống được cho ăn từ 16 giờ ngày hôm trước, vào 8 giờ sáng hàng ngày, cho chuột uống thuốc bằng kim đầu tù, với cùng một thể tích là 1ml/kg TLCT chuột trong 90 ngày.



Thời điểm xét nghiệm: trước uống thuốc, sau 45 ngày, sau 90 ngày nghiên cứu.

Địa điểm nghiên cứu

Đề tài được thực hiện tại Bộ môn Dược lí, Học viện Quân Y.

Các tiêu bản mô học được làm và đọc tại Bộ môn khoa Giải phẫu bệnh - Pháp y, Bệnh viện

Quân y 103.

Xử lý số liệu

Các số liệu được trình bày dưới dạng Mean \pm SD. So sánh thống kê bằng test T-student, sử dụng phần mềm SPSS 20.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

KẾT QUẢ

Bảng 1. Độc tính cấp của bài thuốc Xương khớp bà Gioóng trên chuột nhắt trắng

Lô chuột	Số chuột thí nghiệm	Liều dùng (g/kg thể trọng)	Số chuột sống/chết sau 72 giờ	Số chuột sống/chết sau 7 ngày
Lô 1	10	75	10/0	10/0
Lô 2	10	150	10/0	10/0
Lô 3	10	225	10/0	10/0
Lô 4	10	300	10/0	10/0
Lô 5	10	375	10/0	10/0

Cho chuột nhắt uống Xương khớp bà Gioóng đến liều cao nhất là 375,0 g/kg trọng lượng cơ thể (gấp 15,635 lần liều dùng trên người), tất cả chuột thí nghiệm ở các lô đều ăn, uống, đi lại, hoạt động bình thường. Theo dõi sau 72 giờ không có chuột thí nghiệm bị chết.

Như vậy không xác định được độc tính cấp và LD50 của Xương khớp Bà Gioóng trên chuột nhắt trắng theo đường uống, với liều cao nhất có thể đưa được vào dạ dày chuột nhắt trắng trong 24 giờ.

Ảnh hưởng của Xương khớp bà Gioóng đến chức năng tạo máu

Bảng 2. Ảnh hưởng của Xương khớp bà Gioóng lên số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột ($\bar{X} \pm SD$, $n = 10$ ở mỗi lô)

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	$p_{\text{giữa các lô}}$
Số lượng hồng cầu chuột ($\times 10^{12}$g/L)				
Trước thí nghiệm (a)	$7,17 \pm 0,93$	$7,12 \pm 0,85$	$7,16 \pm 1,05$	
Sau 45 ngày (b)	$7,21 \pm 1,08$	$7,19 \pm 0,96$	$7,24 \pm 1,11$	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$
Sau 90 ngày (c)	$7,15 \pm 0,69$	$7,21 \pm 1,03$	$7,19 \pm 1,05$	$p_{3-1} > 0,05$
$p_{\text{trong cùng lô}}$	$p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-

Hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột (g/dL)				
Trước thí nghiệm (a)	12,74 ± 1,24	13,06 ± 1,15	12,91 ± 1,61	p ₂₋₁ > 0,05 p ₃₋₂ > 0,05 p ₃₋₁ > 0,05
Sau 45 ngày (b)	12,86 ± 1,28	12,95 ± 1,09	13,06 ± 1,20	
Sau 90 ngày (c)	13,09 ± 1,43	12,93 ± 1,42	13,14 ± 1,98	
P _{trong cùng lô}	p _{b,c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			-

So sánh các lô chuột cống thí nghiệm thấy số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột của các lô ở trước, sau ba tuần, sau 6 tuần và cùng thời điểm thấy khác biệt không có ý nghĩa thống kê với p > 0,05.

Bảng 3. Ảnh hưởng của Xương khớp bà Gioóng lên hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột ($\bar{X} \pm SD$, n = 10 ở mỗi lô)

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	P _{giữa các lô}
Hematocrit (%)				
Trước thí nghiệm (a)	32,08 ± 5,29	32,16 ± 6,15	32,63 ± 6,09	p ₂₋₁ > 0,05 p ₃₋₂ > 0,05 p ₃₋₁ > 0,05
Sau 45 ngày (b)	32,35 ± 6,16	32,47 ± 5,94	32,71 ± 5,58	
Sau 90 ngày (c)	31,96 ± 6,04	32,02 ± 6,44	32,11 ± 6,17	
P _{trong cùng lô}	p _{b,c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			-
Thể tích trung bình hồng cầu (fL)				
Trước thí nghiệm (a)	45,65 ± 3,82	45,31 ± 4,29	46,36 ± 4,63	p ₂₋₁ > 0,05 p ₃₋₂ > 0,05 p ₃₋₁ > 0,05
Sau 45 ngày (b)	46,36 ± 5,94	46,27 ± 3,95	46,97 ± 5,41	
Sau 90 ngày (c)	45,95 ± 4,21	45,88 ± 5,82	45,55 ± 5,59	
P _{trong cùng lô}	p _{b,c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			-

So sánh các lô chuột cống thí nghiệm thấy hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu của các lô ở trước, sau ba tuần, sau 6 tuần và cùng thời điểm thấy khác biệt không có ý nghĩa thống kê với p > 0,05.



Bảng 4. Ảnh hưởng của Xương khớp bà Gioóng lên số lượng bạch cầu trong máu chuột ($\bar{X} \pm SD, n = 10$ ở mỗi lô, G/L)

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	P giữa các lô
Trước thí nghiệm (a)	6,94 ± 1,19	6,77 ± 1,45	6,91 ± 1,67	p ₂₋₁ > 0,05 p ₃₋₂ > 0,05 p ₃₋₁ > 0,05
Sau 45 ngày (b)	6,86 ± 1,05	6,86 ± 1,46	7,06 ± 1,52	
Sau 90 ngày (c)	7,01 ± 1,21	6,95 ± 1,34	7,12 ± 1,45	
p _{trong cùng lô}	p _{b,c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			-

So sánh các lô chuột cống thí nghiệm thấy số lượng bạch cầu của các lô trước nghiên cứu, sau 3 tuần, sau 6 tuần và cùng thời điểm thấy khác biệt không có ý nghĩa thống kê với p > 0,05.

Bảng 5. Ảnh hưởng của Xương khớp bà Gioóng lên số lượng tiểu cầu trong máu chuột ($\bar{X} \pm SD, n = 10$ ở mỗi lô, G/L)

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	pgiữa các lô
Trước thí nghiệm (a)	568,90 ± 168,46	548,30 ± 129,18	581,60 ± 138,26	p ₂₋₁ > 0,05 p ₃₋₂ > 0,05 p ₃₋₁ > 0,05
Sau 45 ngày (b)	583,50 ± 146,91	494,60 ± 153,62	592,40 ± 129,57	
Sau 90 ngày (c)	519,70 ± 162,72	483,80 ± 138,85	569,80 ± 166,48	
p _{trong cùng lô}	p _{b,c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			-

So sánh các lô chuột thí nghiệm thấy số lượng tiểu cầu của các lô trước nghiên cứu, sau 3 tuần, sau 6 tuần và cùng thời điểm thấy khác biệt không có ý nghĩa thống kê với p > 0,05.

BÀN LUẬN

Xương khớp bà Gioóng là sự kết hợp của 5 vị thuốc: Mẫu đơn bì, Kê huyết đằng, Dây đau xương, Tang kí sinh và Câu đằng. Trong đó có một số vị thuốc đã được chứng minh có tác dụng chống viêm, giảm đau điều trị thoái hóa khớp gối trên lâm sàng và thực nghiệm [5],[6]. Tuy nhiên, theo quy định, ngoại trừ các bài thuốc cổ phương được chiết xuất theo phương pháp truyền thống, tất cả các thuốc có nguồn

gốc từ dược liệu đều phải đánh giá độc tính cấp, bán trường diễn và tác dụng dược lý trên động vật thực nghiệm trước khi đưa vào thử nghiệm trên người [1]. Các vị thuốc được lựa chọn theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V và bào chế theo phương pháp y học cổ truyền trước khi bào chế thành cao lỏng.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chưa xác định được độc tính cấp và không xác định được liều LD50; Các chỉ số huyết học tại các thời điểm

sau uống Xương khớp bà Gioóng trong 45 và 90 ngày không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so với trước khi dùng thuốc ở tất cả các chỉ số nghiên cứu ($p > 0,05$).

Đây là kết quả mong đợi và phù hợp vì bài thuốc có thành phần là những vị đã được viết trong Dược điển Việt Nam là không có độc và vẫn được sử dụng trên lâm sàng hàng ngàn năm để bình can, tức phong, trấn kinh, hoạt huyết thông lạc, bổ huyết, thanh nhiệt lương huyết,...[4]. Theo Thông tư ban hành Danh mục dược liệu độc làm thuốc ban hành năm 2017 của Bộ Y tế [2], các vị thuốc trong bài thuốc không nằm trong danh sách, tuy nhiên trong một số tài liệu có ghi chép về độc tính cấp nước sắc Câu đằng trên chuột nhắt trắng tìm phúc mạc có LD 50 là $29 \pm 0,8$ g/kg; alkaloid toàn phần của Câu đằng bằng đường uống LD 50 là $514,6 \pm 29,1$ mg/kg. Nhưng nghiên cứu về độc tính bán cấp của Câu đằng trên chuột cống trắng còn non, alkaloid toàn phần của Câu đằng bằng đường uống với liều dùng 50mg/kg, dùng ngày 1 lần, liên tục trong 14 ngày; kết quả không phát hiện được các biến đổi bệnh lý của phủ tạng súc vật thí nghiệm.

KẾT LUẬN

- Không có độc tính cấp của bài thuốc Xương khớp bà Gioóng khi dùng theo đường uống. Với lượng cao lỏng có thể đưa vào dạ dày chuột nhắt trắng là 375,0g dược liệu/kg

trọng lượng cơ thể (gấp 15,635 lần liều dùng trên người) không gây chết chuột nhắt trắng thực nghiệm.

- Bài thuốc Xương khớp bà Gioóng không ảnh hưởng lên chức năng tạo máu của động vật thực nghiệm ở hai liều 14g dược liệu/kg TLCT và 42g dược liệu/kg TLCT uống trong 90 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế.** Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 về việc ban hành tài liệu chuyên môn "Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu", 2015.
- Bộ Y tế.** Thông tư 42/2017/TT-BYT Danh mục dược liệu độc sử dụng làm thuốc, 2017.
- Đỗ Trung Đàm.** Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 2006, tr. 335- 342, 347-352, 355-368, 377-392.
- Bộ Y tế.** Dược điển Việt Nam V, Nhà xuất bản y học, 2018.
- Shen P., Lin W., Ba X. và cộng sự.** Quercetin-mediated SIRT1 activation attenuates collagen-induced mice arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, pp. 279, 114213.
- Kim H.S. Kim A.-R., Lee J.M. và cộng sự.** A mixture of Trachelospermi caulis and Moutan cortex radices extracts suppresses collagen-induced arthritis in mice by inhibiting NF- κ B and AP-1. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012, 64(3), pp. 420-429.