



Đánh giá ảnh hưởng của viên nang ĐTB lên các chỉ số sinh hóa và mô bệnh học của động vật thực nghiệm

ASSESSING THE INFLUENCE OF DTB CAPSULES ON BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL INDICATORS OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Nguyễn Lê Hải, Nguyễn Duy Tuân, Nguyễn Hoàng Ngân

Học viện Y - Dược học cổ truyền Việt Nam

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu tính ảnh hưởng của viên nang ĐTB lên các chỉ số sinh hoá và hình ảnh mô bệnh học trên động vật thực nghiệm.

Đối tượng và phương pháp: Thiết kế nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của viên nang ĐTB lên các chỉ số sinh hóa và mô bệnh học của Chuột cống trắng chủng Wistar, giống theo quy định của Bộ Y tế Việt Nam. Chuột cống trắng cho uống ĐTB liều 280mg/kg/ngày và liều 840mg/kg/ngày, trong 90 ngày liên tục.

Kết quả: Trên các lô, cho thấy: Chuột khỏe mạnh, tăng trọng tốt, đều. Không làm thay đổi các chỉ tiêu sinh hóa máu đánh giá chức năng gan, thận (hoạt độ các enzym AST, ALT, Albumin huyết tương, Cholesterol toàn phần, Bilirubin toàn phần, Creatinin) so với lô chứng. Không gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận.

Kết luận: Viên nang ĐTB dùng trong thời gian 90 ngày không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ở các chỉ số sinh hoá máu, hình ảnh mô bệnh học của gan lách thận bình thường.

Từ khóa: Viên nang ĐTB, sinh hoá máu, hình ảnh mô học.

SUMMARY

Objectives: To study the influence of ĐTB capsules on biochemical indicators and histopathological images in experimental animals.

Subjects and methods: Experimental study on Wistar, following the Ministry of Health guidelines. White rats were given oral administration of ĐTB at a dose of 280mg/kg/day and a dose of 840mg/kg/day for 90 consecutive days.

Results: The rats remained in good health, gaining weight well and evenly throughout the study. There was no change in the blood biochemical indicators of liver and kidney function (AST, ALT, plasma albumin, total cholesterol, total bilirubin, and creatinine) compared with the control group. Importantly, there was no histopathological damage to the liver, spleen, or kidney.

Conclusions: The use of ĐTB capsules for a period of 90 days did not yield any statistically significant differences compared with the control group in blood biochemical indicators, or histopathological images of liver, spleen, and kidney.

Keywords: ĐTB capsules, blood biochemistry, histopathological images.

Tác giả liên hệ: Nguyễn Lê Hải

Số điện thoại: 0919703417

Email: drhaiitcm@gmail.com

Ngày nhận bài: 14/6/2023

Ngày phân biện: 27/6/2023

Ngày chấp nhận đăng: 18/9/2023

ĐẶT VẤN ĐỀ

Suy giảm trí nhớ gây ảnh hưởng rất rõ đến chất lượng công việc, chất lượng cuộc sống và là gánh nặng bệnh tật lớn cho toàn xã hội. Việc điều trị suy giảm trí nhớ hiện còn nhiều khó khăn, chi phí tốn kém. Trong những năm gần đây, các dạng bào chế từ dược liệu tự nhiên đang là một hướng đi đầy tiềm năng mang lại tính an toàn và hiệu quả khi sử dụng [1]. Viên nang ĐTB bào chế từ đinh lăng, trà xanh, bạch quả, do Công ty cổ phần dược phẩm Phú Tín sản xuất, với mục đích tăng cường năng lực tập trung ghi nhớ, cải thiện các chứng suy giảm trí nhớ. Để có cơ sở khoa học cho việc sử dụng rộng rãi chế phẩm trong chăm sóc sức khỏe liên quan tới trí nhớ, cần tiến hành các nghiên cứu về tính an toàn và tác dụng của bài thuốc. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá ảnh hưởng của viên nang ĐTB lên các chỉ số sinh hóa và hình ảnh mô bệnh học của động vật thực nghiệm.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chất liệu nghiên cứu

Thuốc nghiên cứu (thuốc thử): Viên nang ĐTB với các thành phần bạch quả, đinh lăng, trà xanh, mỗi viên nang chứa 450mg bột cao khô bạch quả, đinh lăng và trà xanh, mỗi loại 150 mg và tá dược (tinh bột ngô, natri starch glycolat, magnesi stearat, aerosil, lactose) 50 mg. Như vậy viên nang có chứa 450mg cao dược liệu, tương ứng với 500mg bột trong viên nang. Liều dùng trong nghiên cứu được tính theo liều bột thuốc trong viên nang (500mg/viên). Dựa trên liều dùng dân gian đối với các dược liệu thành phần [2] và kết quả đánh giá hàm lượng hoạt chất của các dược liệu trong viên nang, liều dự kiến sử dụng trên người là 4 viên nang/người/ngày, tương ứng 2000mg/người/ngày. Tính quân bình một người 50kg thì liều dùng dự kiến trên người sẽ là 40mg/kg/ngày. Quy đổi theo hệ số quy đổi từ người sang động vật thực nghiệm, liều tương đương trên chuột nhất với hệ số quy đổi là 12 thì liều dự kiến có tác dụng trên chuột nhất là 480 mg/kg/

ngày, liều trên chuột cống (hệ số quy đổi là 7) là 280 mg/kg/ngày. Bột trong viên nang được cân chính xác trên cân 10-4, được hòa tan trong nước cất, cho chuột uống bằng kim chuyên dụng (kim cong đầu tù).

Đối tượng nghiên cứu

Chuột cống trắng chủng Wistar số lượng 30 con khỏe mạnh, trọng lượng $180 \pm 20g$ do Ban động vật Học viện Quân y cấp, nuôi dưỡng theo tiêu chuẩn động vật nghiên cứu.

Thiết bị, hóa chất

Máy xét nghiệm sinh hoá Biochemical Systems International Srl, Italia, model 3000 Evolution, hóa chất của hãng.

Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm: Bộ môn Dược lý - Học viện Quân Y.
- Thời gian: Tháng 1/2022 đến tháng 6/2022.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của viên nang ĐTB lên các chỉ số sinh hóa và mô bệnh học của động vật thực nghiệm

Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu:

Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên làm 3 lô, mỗi lô 10 con:

- Lô 1 (lô chứng): uống nước cất.
- Lô trị 1: Uống thuốc thử liều 280mg/kg/24h.
- Lô trị 2: Uống thuốc thử liều 840mg/kg/24h (liều gấp 3 lô trị 1).

Được theo dõi được kiểm tra vào trước lúc uống thuốc, sau 45 ngày và sau 90 ngày uống thuốc.

Theo dõi và đánh giá kết quả:

- Đánh giá ảnh hưởng của thuốc thử lên các chỉ tiêu sinh hóa: Chuột được uống thuốc thử hoặc nước cất một lần vào 8 giờ sáng hàng ngày liên tục trong 90 ngày. Các chỉ số sinh hóa máu phản ánh chức năng gan, thận và chuyển hóa: ALT, AST, albumin, cholesterol toàn phần, nồng độ creatinin huyết thanh [3], [4].

- Đánh giá ảnh hưởng của thuốc thử lên mô bệnh học gan, lách, thận:

Sau 90 ngày uống thuốc, chuột được mổ để



quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan. Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, lách, thận của ít nhất 30% số chuột ở mỗi lô. Các xét nghiệm vi thể được thực hiện tại Bộ môn khoa Giải phẫu bệnh Pháp y, Bệnh viện Quân y 103.

Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê y sinh học bằng phần mềm SPSS

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

Đạo đức trong nghiên cứu:

Nghiên cứu được thực hiện trên động vật thực nghiệm, nhằm mục đích phục vụ khoa học và chăm sóc sức khỏe cho người bệnh. Nghiên cứu được Hội đồng khoa học của Học viện Y - Dược học cổ truyền Việt Nam thông qua.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả đánh giá ảnh hưởng các chỉ tiêu sinh hóa

Bảng 1. Ảnh hưởng của thuốc thử đến hoạt độ AST, ALT trong máu chuột

Chỉ số	Thời điểm	Kết quả ($\bar{X} \pm SD$, n=10 ở mỗi lô)			$P_{\text{giữa các lô}}$
		Lô chứng (1)	Lô trị 1(2)	Lô trị 2 (3)	
AST (u/l)	D _{0(a)}	89,30 ± 10,18	91,60 ± 11,85	89,80 ± 12,47	$p_{1-2} > 0,05$
	D _{45(b)}	90,10 ± 12,26	93,00 ± 12,74	91,20 ± 13,01	$p_{1-3} > 0,05$
	D _{90(c)}	85,60 ± 10,32	88,30 ± 14,68	86,90 ± 12,69	$p_{2-3} > 0,05$
	$p_{\text{trước sau}}$	$p_{a-b} > 0,05; p_{a-c} > 0,05; p_{b-c} > 0,05$			-
ALT (u/l)	D _{0(a)}	68,10 ± 9,86	68,90 ± 10,25	66,80 ± 9,64	$p_{1-2} > 0,05$
	D _{45(b)}	65,80 ± 10,12	66,20 ± 9,97	64,60 ± 10,05	$p_{1-3} > 0,05$
	D _{90(c)}	69,30 ± 9,03	69,70 ± 11,16	68,50 ± 10,59	$p_{2-3} > 0,05$
	$p_{\text{trước sau}}$	$p_{a-b} > 0,05; p_{a-c} > 0,05; p_{b-c} > 0,05$			-

So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, hoạt độ các enzyme AST và ALT trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, hoạt độ các enzyme AST và ALT trong máu của chuột thay

đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy ĐTB với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi hoạt độ các enzyme AST và ALT có ý nghĩa thống kê, không gây ra hủy hoại tế bào gan trên chuột nghiên cứu.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ albumin và cholesterol toàn phần trong máu chuột

Chỉ số	Thời điểm	Kết quả ($\bar{X} \pm SD$, n=10 ở mỗi lô)			$P_{\text{giữa các lô}}$
		Lô chứng (1)	Lô trị 1(2)	Lô trị 2 (3)	
Albumin huyết tương (g/l)	D _{0(a)}	31,60 ± 2,82	31,10 ± 2,68	31,20 ± 2,59	$p_{1-2} > 0,05$
	D _{45(b)}	31,30 ± 2,27	31,70 ± 2,22	31,80 ± 2,34	$p_{1-3} > 0,05$
	D _{90(c)}	31,90 ± 2,63	31,50 ± 2,49	31,40 ± 1,98	$p_{2-3} > 0,05$
	$p_{\text{trước sau}}$	$p_{a-b} > 0,05; p_{a-c} > 0,05; p_{b-c} > 0,05$			-

Chỉ số	Thời điểm	Kết quả ($\bar{X} \pm SD$, n=10 ở mỗi lô)			$p_{\text{giữa các lô}}$
		Lô chứng (1)	Lô trị 1(2)	Lô trị 2 (3)	
Cholesterol toàn phần (mmol/l)	D _{0(a)}	1,19 ± 0,17	1,17 ± 0,25	1,20 ± 0,23	$p_{1-2} > 0,05$
	D _{45(b)}	1,21 ± 0,19	1,14 ± 0,18	1,15 ± 0,20	$p_{1-3} > 0,05$
	D _{90(c)}	1,16 ± 0,21	1,18 ± 0,15	1,13 ± 0,16	$p_{2-3} > 0,05$
	$p_{\text{trước sau}}$	$p_{a-b} > 0,05; p_{a-c} > 0,05; p_{b-c} > 0,05$			-

So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, nồng độ albumin và cholesterol toàn phần trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, nồng độ albumin và cholesterol toàn phần trong

máu của chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy ĐTB với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi nồng độ albumin và cholesterol toàn phần trong máu chuột nghiên cứu.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ bilirubin toàn phần và creatinin trong máu chuột

Chỉ số	Thời điểm	Kết quả ($\bar{X} \pm SD$, n=10 ở mỗi lô)			$p_{\text{giữa các lô}}$
		Lô chứng (1)	Lô trị 1(2)	Lô trị 2 (3)	
Bilirubin toàn phần (μmol/L)	D _{0(a)}	72,70 ± 21,86	77,30 ± 17,76	76,90 ± 14,46	$p_{1-2} > 0,05$
	D _{45(b)}	76,70 ± 23,20	75,50 ± 27,65	75,90 ± 18,85	$p_{1-3} > 0,05$
	D _{90(c)}	79,10 ± 15,35	75,10 ± 18,55	74,90 ± 16,91	$p_{2-3} > 0,05$
	$p_{\text{trước sau}}$	$p_{a-b} > 0,05; p_{a-c} > 0,05; p_{b-c} > 0,05$			-
Creatinin (μmol/l)	D _{0(a)}	48,60 ± 7,16	48,30 ± 4,68	47,60 ± 5,96	$p_{1-2} > 0,05$
	D _{45(b)}	49,30 ± 9,12	47,40 ± 5,17	48,20 ± 8,12	$p_{1-3} > 0,05$
	D _{90(c)}	47,50 ± 8,05	49,10 ± 4,68	46,90 ± 8,01	$p_{2-3} > 0,05$
	$p_{\text{trước sau}}$	$p_{a-b} > 0,05; p_{a-c} > 0,05; p_{b-c} > 0,05$			-

So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, nồng độ bilirubin toàn phần và creatinin trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, nồng độ bilirubin toàn phần và creatinin trong máu của chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy ĐTB với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi nồng độ bilirubin toàn phần

và creatinin trong máu chuột nghiên cứu.

Kết quả mô bệnh học gan, lách, thận chuột nghiên cứu

Đại thể

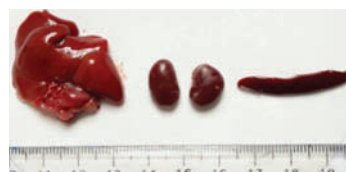
Quan sát đại thể bằng mắt thường dưới kính lúp có độ phóng đại 25 lần, chúng tôi thấy: màu sắc, hình thái của gan, lách và thận ở hai lô dùng thuốc thử không khác so với chúng. Kết quả được thể hiện ở hình 1 dưới đây.



Hình ảnh gan, thận, lách lô chứng



Hình ảnh gan, thận, lách lô trị 1



Hình ảnh gan, thận, lách lô trị 2

Hình 1. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột thí nghiệm

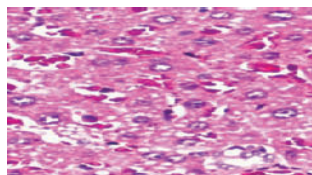
Hình ảnh đại thể các tạng gan, lách, thận của chuột ở các lô trị 1, lô trị 2, là các lô cho uống ĐTB, có màu nâu đỏ thẫm đồng đều, bề mặt nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết, có đàn hồi khi ấn xuống, không khác biệt so với hình ảnh gan, thận của chuột ở lô chứng.

Vi thể

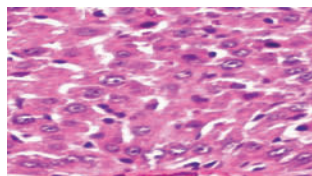
Các tiêu bản mô bệnh học gan, lách, thận

được đọc tại Bộ môn khoa Giải phẫu bệnh Pháp y, Bệnh viện Quân y 103. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học gan, lách, thận chuột cho thấy ĐTB dùng đường uống với liều 280mg/kg/24h và 840mg/kg/24h liên tục trong 90 ngày, không gây tổn thương trên gan, thận, lách của chuột. Kết quả mô bệnh học gan của chuột sau 90 ngày uống thuốc được thể hiện ở hình 2 dưới đây.

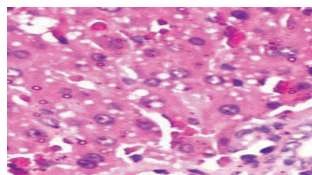
Hình thái vi thể gan



Chuột 6 lô chứng (HE x 400): các bè gan và tiểu thùy gan bình thường, không có, thoái hóa, xâm nhập viêm, tĩnh mạch trung tâm không giãn, không xung huyết.

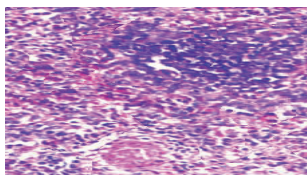


Chuột 12 lô trị 1 (HE x 400): các bè gan và tiểu thùy gan, tế bào gan bình thường. Hình ảnh vi thể không khác biệt so với lô chứng.

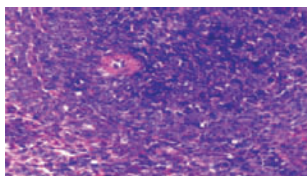


Chuột 25 lô trị 2 (HE x 400): các bè gan và tiểu thùy gan, tế bào gan bình thường. Hình ảnh vi thể không khác biệt so với lô chứng.

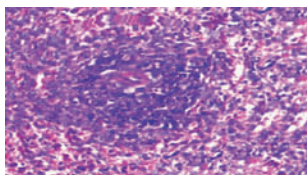
Hình thái vi thể



Chuột 5 lô chứng (HE x 400): Các nang lympho với tâm mầm rộng và trung tâm có động mạch nút lông. Cấu trúc lách bình thường.

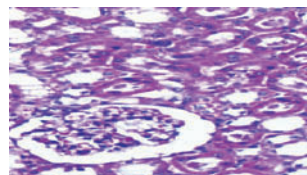


Chuột 16 lô trị 1 (HE x 400): Cấu trúc lách bình thường. Hình ảnh vi thể không khác biệt so với lô chứng.

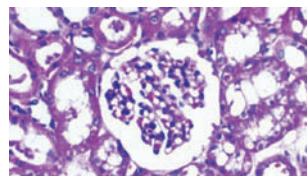


Chuột 29 lô trị 2 (HE x 400): Cấu trúc lách bình thường. Hình ảnh vi thể không khác biệt so với lô chứng.

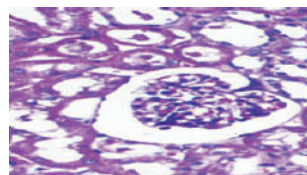
Hình thái vi thể thận



Chuột 9 lô chứng (HE x 400): Các mao mạch trong tiểu cầu và khe thận bình thường. Các tế bào biểu mô ống thận bình thường.



Chuột 12 lô trị 1 (HE x 400): các cấu trúc như mô thận bình thường. Hình ảnh vi thể không khác biệt so với lô chứng.



Chuột 21 lô trị 2 (HE x 400): các cấu trúc như mô thận bình thường. Hình ảnh vi thể không khác biệt so với lô chứng.

Hình 2. Hình ảnh vi thể gan, lách, thận chuột nghiên cứu

Hình ảnh vi thể gan, lách và thận của chuột nghiên cứu (HE x 400) không thấy có sự khác biệt về cấu trúc vi thể gan, lách, thận giữa lô trị 1 và lô trị 2 so với nhóm chứng.

BÀN LUẬN

Về độc tính cấp, bán trường diễn

Các vị thuốc trong chế phẩm ĐTB đều là những vị thuốc được sử dụng từ lâu, đều cho thấy bảo đảm tính an toàn. Việc phối hợp các vị thuốc theo đúng nguyên lý của y học cổ truyền, nhằm làm tăng tác dụng điều trị và hạn chế độc tính của bài thuốc. Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi về độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của ĐTB trên động vật thực nghiệm cũng cho thấy ĐTB có tính an toàn cao.

Độc tính cấp

Chưa tìm thấy LD50 của viên nang ĐTB theo đường uống trên chuột nhắt trắng với mức liều cao nhất đã cho chuột uống là 30,0 g/kg thể trọng.

Độc tính bán trường diễn

Trên các lô chuột cống trắng cho uống ĐTB liều 280mg/kg/ngày, và liều 840mg/kg/ngày, trong 90 ngày liên tục, cho thấy:

- Chuột khỏe mạnh, tăng trọng tốt, đều.
- Không làm thay đổi các chỉ số huyết học (hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu).
- Không làm thay đổi các chỉ tiêu sinh hóa máu đánh giá chức năng gan, thận (hoạt độ các enzym AST, ALT, Albumin huyết tương, Cholesterol toàn phần, Bilirubin toàn phần, Creatinin).
- Không gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận.

Như vậy viên nang ĐTB khi thử nghiệm độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng cho thấy không có độc tính ở các mức liều và thời gian đã dùng.

Về tác dụng tăng cường trí nhớ trên mô hình mê cung nước thực nghiệm.

Kết quả thử nghiệm với chế phẩm ĐTB cho kết quả cải thiện khả năng học tập ở pha huấn luyện tốt tương đương so với thuốc tham chiếu, cho phép khẳng định tác dụng của chế phẩm ĐTB làm tăng cường khả năng học tập và ghi nhớ khi đánh giá trên mô hình thực nghiệm.

Đánh giá các chỉ tiêu sinh hóa

Các chỉ tiêu sinh hóa đánh giá ảnh hưởng lên

gan (AST, ALT), thận (creatinin), chuyển hóa (albumin, cholesterol), cho phép khảo sát những ảnh hưởng lên chức năng của các cơ quan quan trọng trong chuyển hóa, thải trừ thuốc [3, 4, 5]. Các chỉ số sinh hóa đã khảo sát đều không có thay đổi khác biệt so với lô chứng sinh lý cũng như so với trước khi dùng thuốc.

Đánh giá kết quả mô bệnh học

Hình ảnh mô bệnh học (cả đại thể và vi thể) của gan, lách, thận cho phép đánh giá ảnh hưởng lên cấu trúc của các cơ quan chính liên quan đến chuyển hóa, thải trừ thuốc [3, 4, 5]. Kết quả nghiên cứu cho thấy hình ảnh mô bệnh học gan, lách, thận của các chuột nghiên cứu đều bình thường.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được trên thực nghiệm, chúng tôi kết luận: Trên các lô chuột uống ĐTB ở các mức liều 280mg/kg/24h và 840mg/kg/24h liên tục trong 90 ngày cho thấy:

- Không làm thay đổi các chỉ tiêu sinh hóa máu bao gồm nồng độ men gan AST, ALT, cholesterol toàn phần, creatinin, albumin huyết tương.
- Không gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận.

Như vậy viên nang ĐTB với các mức liều dùng và thời gian sử dụng trong nghiên cứu thực nghiệm trên chuột cống trắng có tính an toàn cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1. Trần Quốc Bảo.** *Bệnh học Y học cổ truyền dùng cho sau đại học*, Nhà xuất bản Quân đội nhân dân, 2012.
- 2. Bộ Y tế.** *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, 2017.
- 3. Bộ y tế.** *Quy định thử thuốc trên lâm sàng*, Quyết định số 01/2007/QĐ-BYT, 2007.
- 4. Gerhard Vogel H.** *Drug discovery and evaluation Pharmacological assays*, Springer, 2002.
- 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.