

Đánh giá độc tính cấp, ảnh hưởng của bài thuốc "HV" đối với thể trạng chung và các chỉ số huyết học trên động vật thực nghiệm

EVALUATE THE ACUTE TOXICITY OF THE "HV" REMEDY FOR THE GENERAL CONDITION AND HEMATOLOGICAL INDICATORS ON EXPERIMENTAL ANIMALS

Đậu Xuân Cảnh¹, Vũ Thanh Tuyền¹, Đoàn Minh Thụy¹
Đặng Thị Lan Phương¹, Nguyễn Hoàng Ngân²

¹Học viên Y Dược học cổ truyền Việt Nam

²Học viên Quân y

TÓM TẮT

Bài thuốc "HV" gồm 14 vị thuốc là bài thuốc cổ phương "Dật kinh thang" gia thêm 03 vị thuốc Kỳ tử, Thô ty tử và Tòà dương; để điều trị suy buồng trứng sớm. Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu đánh giá độc tính cấp trên chuột nhắt trắng và sự ảnh hưởng đến thể trạng, cân nặng, các thông số huyết học trên chuột cống thực nghiệm của bài thuốc "HV". Kết quả: bài thuốc "HV" độc không có tính cấp theo đường uống và chưa xác định được LD₅₀ trên chuột nhắt trắng. Mẫu thuốc thử HV không ảnh hưởng đến thể trạng chung cũng như các chỉ số huyết học của chuột khi cho chuột uống liều 30,24g dược liệu/kg/ngày và liều 90,72g dược liệu/kg/ngày liên tục trong 90 ngày.

Từ khóa: Bài thuốc "HV", độc tính cấp, suy buồng trứng.

ABSTRACT

"HV" remedy was made from *Radix Rehmanniae glutinosae praeparatus*, *Tuber Dioscoreae persimilis*, *Rhizoma Atractylodis macrocephalac*, *Radix Paeomiae lactiflorae*, *Cortex Paeomiae suffruticosae*, *Radix*

Ngày nhận bài: 14/1/2019

Ngày phản biện: 16/1/2019

Ngày chấp nhận đăng: 16/1/2019

Ginseng, *Bupleurum sinense*, *Semen ziziphi mauritanae*, *Radix Angelicae sinensis*, *Radix Glehniae*, *Cortex Encorniae*, *Fruetus Lycii*, *Semen Cuscutae* and *Balanophora* meeting basic standards for treating early ovarian failure. The study evaluated the acute toxicity in mice and its effects on rat's health, weight and hematological parameters. The results showed that: HV remedy did not have acute oral toxicity, LD_{50} had not been identified in white mice. After 90 days of treatment with the doses of 30.24g/kg per day and 90.72g/kg per day, HV remedy caused no harm to rat's health and the hematological parameters.

Key words: HV remedy, acute toxicity, ovarian failure.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Suy buồng trứng sớm là một hội chứng lâm sàng có tỷ lệ mắc là 1/100 ở phụ nữ dưới 40 tuổi và tuổi mắc bệnh ngày càng trẻ hóa. Y học hiện đại điều trị chủ yếu dùng liệu pháp hormon thay thế tuy nhiên sử dụng hormon kéo dài sẽ gây ra những hệ lụy nhất định. Đông y đã được chứng minh đem lại hiệu quả tốt trong hỗ trợ điều trị suy buồng trứng sớm ngoài ra có ưu điểm chi phí thấp và ít tác dụng phụ. Vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu bài thuốc "HV" để hỗ trợ điều trị suy buồng trứng sớm. Để có cơ sở khoa học về độ an toàn của bài thuốc trước khi tiến hành nghiên cứu trên lâm sàng, đề tài này được tiến hành nghiên cứu với mục tiêu đánh giá ảnh hưởng của bài thuốc "HV" lên thể trạng chung và chỉ số huyết học của động vật thực nghiệm.

CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chất liệu nghiên cứu

Thuốc nghiên cứu: Các vị thuốc do Viện Dược liệu TW cung cấp, đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt nam V [1]; sắc đóng túi tại Viện Dược liệu TW theo tỉ lệ 1:1. Thuốc được cô đặc đến tỷ lệ tối đa 5:1 và được pha loãng bằng nước cất theo tỷ lệ thích hợp để cho chuột uống.

Công thức bài thuốc: Thực địa 35g, Hoài sơn 20g, Bạch truật 25g, Bạch thược 15g, Đơn bì 08g, Nhân sâm 07g, Sài hồ bắc 08g, Táo nhân 08g,

Đương quy 20g, Sa sâm 15g, Đờ trọng 08g, Kỳ tử 20g, Thổ ty tử 15g và Tỳ gia 12g.

Hoá chất: máy phân tích huyết học Humancout 30TS, hãng Human, Đức, sử dụng phần mềm phân tích huyết học dành cho chuột thí nghiệm, hóa chất của hãng.

Đối tượng nghiên cứu

Chuột nhắt trắng chủng Swiss và chuột Wistar do Ban động vật Học viện Quân y cấp, được nuôi trong điều kiện chuồng thoáng mát, đảm bảo hợp vệ sinh, chế độ ăn uống theo nhu cầu của chuột.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu độc tính cấp trên chuột nhắt trắng: xác định LD_{50} của bài thuốc "HV" trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon và hướng dẫn của WHO [2], [3]. Chuột nhắt được chia thành các lô, mỗi lô 10 con, được uống mẫu thuốc nghiên cứu 3 lần/24h theo liều tăng dần từ 90g/kg/24h đến 450g/kg/24h (liều dung nạp tối đa). Theo dõi sát tình trạng chung và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ, và tiếp tục theo dõi đến hết ngày thứ 7 sau uống thuốc lần đầu. Xác định % số chuột chết theo liều dùng trong 72 giờ sau uống thuốc thử lần đầu tiên, từ đó xác định liều chết 50% (nếu có).

Nghiên cứu ảnh hưởng của bài thuốc "HV" đối với thể trạng và các chỉ số huyết học ở chuột cống trắng:

* Chuột Wistar được chia làm 3 lô, mỗi lô 10 con:

- Lò 1 (lò chứng): uống dung môi là nước cất, trong thể tích 2ml/kg trọng lượng cơ thể/ngày.

- Lò trị 1: uống thuốc sắc HV liều 30,24g/kg/ngày.

- Lò trị 2: uống dịch chiết bài thuốc "HV" liều 90,72g/kg/ngày (liều gấp 3 lò trị 1).

Chuột được uống thuốc sắc HV hoặc nước cất một lần vào 8 giờ sáng hàng ngày liên tục trong 90 ngày.

Các chỉ tiêu theo dõi: tình trạng chung, thể trọng của chuột, số lượng hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, số lượng bạch cầu, và số lượng tiểu cầu.

Các thời điểm theo dõi: Trước khi uống thuốc (N0), 45 ngày sau uống thuốc (N45) và sau 90 ngày uống thuốc (N90) [6].

Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp t-test Student. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Bảng 1. Ảnh hưởng của bài thuốc "HV" đến thể trọng chuột (g)

Thời điểm	Trọng lượng chuột ($\bar{X} \pm SD$)			$P_{\text{giữa các lò}}$
	Lò chứng (1)	Lò thứ 1 (2)	Lò thứ 2 (3)	
D_0 (a)	169,60 \pm 4,55	170,90 \pm 4,43	169,80 \pm 3,79	$P_{1,2} > 0,05$ $P_{1,3} > 0,05$ $P_{2,3} > 0,05$
D_{45} (b)	198,10 \pm 4,84	204,04 \pm 8,40	201,80 \pm 9,15	
D_{90} (c)	216,04 \pm 7,44	219,04 \pm 5,50	217,90 \pm 5,13	
$P_{\text{trước sau}}$	$P_{a,b} < 0,01; P_{b,c} < 0,01; P_{a,c} < 0,01$			

Nhận xét: So sánh trong từng lò giữa các thời điểm nghiên cứu, trọng lượng chuột ở các lần cân sau đều lớn hơn lần cân trước ($p < 0,01$). So sánh giữa các lò tại cùng thời điểm đánh giá, không có sự khác biệt về trọng lượng chuột ($p > 0,05$).

Đánh giá chức năng tạo máu

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Độc tính cấp

Sau khi cho các lò chuột uống uống thuốc thử theo liều tăng dần từ 90g/kg/24h đến 450g/kg/24h chuột, không phát hiện ngộ độc nào trên chuột thí nghiệm trong thời gian theo dõi, chuột hoạt động bình thường, các biểu hiện sinh lý bình thường. Theo dõi sau 72 giờ, cũng như sau 7 ngày, các lò thí nghiệm đều không có chuột chết. Vì vậy chưa xác định được liều chết 50%.

Tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng của chuột

Tình trạng chung

Trong thời gian thí nghiệm, quan sát chuột ở cả 3 lò: hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, ăn uống tốt, phân khô. Không thấy biểu hiện gì đặc biệt ở cả 3 lò chuột trong suốt thời gian nghiên cứu.

Sự thay đổi thể trọng chuột

Bảng 2. Ảnh hưởng của bài thuốc "HV" đến số lượng hồng cầu trong máu chuột (T/l)

Thời điểm	Hồng cầu chuột ($\bar{X} \pm SD$)			$P_{\text{giữa các lô}}$
	Lô chứng (1)	Lô thử 1 (2)	Lô thử 2 (3)	
D_0 (a)	8,17 \pm 0,52	7,96 \pm 0,59	8,06 \pm 0,97	$P_{1,2} > 0,05$
D_{45} (b)	8,28 \pm 1,24	8,11 \pm 0,67	8,32 \pm 0,67	$P_{1,3} > 0,05$
D_{90} (c)	8,67 \pm 1,30	8,20 \pm 1,98	8,59 \pm 0,98	$P_{2,3} > 0,05$
$P_{\text{trong cùng lô}}$	$P_{a,b} > 0,05; P_{a,c} > 0,05; P_{b,c} > 0,05$			

Nhận xét: So sánh trong cùng lô ở các thời điểm trước nghiên cứu, sau uống bài thuốc "HV" 45 ngày và sau uống bài thuốc "HV" 90 ngày số lượng hồng cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm nghiên cứu số lượng hồng cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3. Ảnh hưởng của bài thuốc "HV" đến hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột (g/dl)

Thời điểm	Huyết sắc tố chuột ($\bar{X} \pm SD$)			$P_{\text{giữa các lô}}$
	Lô chứng (1)	Lô thử 1 (2)	Lô thử 2 (3)	
D_0 (a)	125,50 \pm 9,80	125,90 \pm 15,07	124,90 \pm 16,72	$P_{1,2} > 0,05$
D_{45} (b)	126,10 \pm 15,95	125,20 \pm 12,40	125,70 \pm 15,71	$P_{1,3} > 0,05$
D_{90} (c)	126,60 \pm 18,27	125,60 \pm 12,41	126,20 \pm 14,54	$P_{2,3} > 0,05$
$P_{\text{trong cùng lô}}$	$P_{a,b} > 0,05; P_{a,c} > 0,05; P_{b,c} > 0,05$			

Nhận xét: So sánh trong cùng lô ở các thời điểm trước nghiên cứu, sau uống bài thuốc "HV" 45 ngày và sau uống bài thuốc "HV" 90 ngày nồng độ huyết sắc tố trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm nghiên cứu số lượng nồng độ huyết sắc tố trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 4. Ảnh hưởng của bài thuốc "HV" đến hematocrit trong máu chuột (%)

Thời điểm	Hematocrit ($\bar{X} \pm SD$)			$P_{\text{giữa các lô}}$
	Lô chứng (1)	Lô thử 1 (2)	Lô thử 2 (3)	
D_0 (a)	40,37 \pm 2,64	39,93 \pm 4,95	41,02 \pm 3,42	$P_{1,2} > 0,05$
D_{45} (b)	41,53 \pm 1,71	41,54 \pm 1,80	39,71 \pm 4,11	$P_{1,3} > 0,05$
D_{90} (c)	41,69 \pm 3,41	41,40 \pm 2,73	41,92 \pm 2,66	$P_{2,3} > 0,05$
$P_{\text{trong cùng lô}}$	$P_{a,b} > 0,05; P_{a,c} > 0,05; P_{b,c} > 0,05$			

Nhận xét: So sánh trong cùng lô ở các thời điểm trước nghiên cứu, sau uống bài thuốc "HV" 45 ngày và sau uống bài thuốc "HV" 90 ngày hematocrit trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm nghiên cứu hematocrit trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 5. Ảnh hưởng của bài thuốc "HV" đến số lượng bạch cầu trong máu chuột (G/l)

Thời điểm	Bạch cầu máu chuột ($\bar{X} \pm SD$)			$P_{\text{giữa các lô}}$
	Lô chứng (1)	Lô thứ 1 (2)	Lô thứ 2 (3)	
D_0 (a)	9,06 \pm 2,16	8,89 \pm 2,65	8,91 \pm 3,07	$P_{1,2} > 0,05$
D_{45} (b)	8,95 \pm 1,55	9,07 \pm 1,65	8,53 \pm 2,34	$P_{1,3} > 0,05$
D_{90} (c)	8,88 \pm 2,52	8,69 \pm 2,40	8,34 \pm 1,54	$P_{2,3} > 0,05$
$P_{\text{trước sau cùng lô}}$	$P_{1,b} > 0,05; P_{1,c} > 0,05; P_{b,c} > 0,05$			-

Nhận xét: So sánh trong cùng lô ở các thời điểm trước nghiên cứu, sau uống bài thuốc "HV" 45 ngày và sau uống bài thuốc "HV" 90 ngày số lượng bạch cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm nghiên cứu số lượng bạch cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 6. Ảnh hưởng của bài thuốc "HV" đến số lượng tiểu cầu trong máu chuột (G/l)

Thời điểm	Số lượng tiểu cầu máu chuột ($\bar{X} \pm SD$)			$P_{\text{giữa các lô}}$
	Lô chứng (1)	Lô thứ 1 (2)	Lô thứ 2 (3)	
D_0 (a)	625,00 \pm 145,57	597,00 \pm 144,15	657,00 \pm 176,07	$P_{1,2} > 0,05$
D_{45} (b)	640,60 \pm 175,42	605,00 \pm 68,35	647,75 \pm 90,80	$P_{1,3} > 0,05$
D_{90} (c)	612,80 \pm 156,32	615,70 \pm 213,44	691,25 \pm 177,56	$P_{2,3} > 0,05$
$P_{\text{trước sau cùng lô}}$	$P_{1,b} > 0,05; P_{1,c} > 0,05; P_{b,c} > 0,05$			-

Nhận xét: So sánh trong cùng lô ở các thời điểm trước nghiên cứu, sau uống bài thuốc "HV" 45 ngày và sau uống bài thuốc "HV" 90 ngày số lượng tiểu cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm nghiên cứu số lượng tiểu cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

BÀN LUẬN

Độc tính cấp của bài thuốc bài thuốc "HV"

Liều dự kiến điều trị trên người là 216g/người/

ngày, hay 4,32g/kg/ngày. Quy đổi ra liều trên chuột nhất trắng (theo hệ số gấp 12 lần) là 51,84g/kg/ngày. Chuột nhất trắng đã uống tối đa liều 450g/kg/24h, gấp 8,68 lần liều dự kiến trên chuột, mà không có biểu hiện độc tính. Đây là lượng thuốc tối đa (cò đặc thuốc tối đa để thuốc vắn qua kim được, thể tích uống tối đa) có thể cho chuột uống trong một ngày. Vì không có chuột chết nên chưa xác định được LD_{50} của bài thuốc "HV" trên chuột nhất trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon. Với liều dung nạp tối đa



450g/kg/24h mà chưa có biểu hiện độc tính chứng tỏ bài thuốc "HV" an toàn khi đánh giá độc tính cấp đường uống.

Ảnh hưởng của bài thuốc "HV" lên trọng lượng, thể trạng chung của chuột và cơ quan tạo máu

Trọng lượng chuột 3 lô đều tăng so với trước nghiên cứu. Không có sự khác biệt về sự tăng trọng lượng giữa lô chứng và các lô dùng thuốc ($p > 0,05$). Như vậy, cả hai liều thuốc thử không làm ảnh hưởng xấu đến tình trạng chung và trọng lượng chuột.

Theo 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. Vì vậy, các xét nghiệm về số lượng hồng cầu, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu của chuột thí nghiệm được xác định. Sau 90 ngày uống dịch chiết bài thuốc

"HV", các xét nghiệm chỉ số huyết học của chuột ở lô trị 1 và lô trị 2 không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$). Như vậy dịch chiết bài thuốc "HV" không thể hiện độc tính trên cơ quan tạo máu.

KẾT LUẬN

- Chưa tìm thấy LD_{50} của dịch chiết bài thuốc "HV" theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với liều dung nạp tối đa là 450g/kg/24h, không có biểu hiện của độc tính cấp.

- Dịch chiết bài thuốc "HV" khi cho chuột cống trắng uống liều 30,24g/kg/ngày và 90,72g/kg/ngày trong 90 ngày liên tục không ảnh hưởng đến thể trạng chung và các chỉ số huyết học của chuột thực nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, NXB Y học.
2. Bộ y tế (2018), "Quy định về thử thuốc trên lâm sàng", Thông tư số 29/2018/TT-BYT.
3. Đỗ Trung Đàm (1996), *Phương pháp xác định độc tính cấp*, NXB Y học.
4. WHO (2000), *General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine*, World Health Organization.