

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT



**Phương pháp nghiên cứu
tác dụng dược lý
của thuốc từ dược thảo**

$\frac{61-615.9}{\text{KHKT}-06}$ 136-2006/CXB/444-06/KHKT-06

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU
TÁC DỤNG DƯỢC LÝ
CỦA THUỐC TỪ DƯỢC THẢO**



**NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
HÀ NỘI - 2006**

TỔ CHỨC BIÊN SOẠN

PGS. TS. NGUYỄN THƯỢNG DONG

THAM GIA BIÊN SOẠN

GS. ĐOÀN THỊ NHU

PGS. TSKH. ĐỖ TRUNG ĐÀM

PGS. PHẠM DUY MAI

PGS. TS. NGUYỄN THƯỢNG DONG

TS. NGUYỄN THỊ THU HƯƠNG

BIÊN TẬP VÀ TRÌNH BÀY

DS. NGUYỄN KIM PHƯỢNG

DS. LÊ NGUYỆT NGÀ

CN. ĐẶNG QUANG CHUNG

LỜI NÓI ĐẦU

Việt Nam có nguồn dược liệu phong phú và đa dạng, có kinh nghiệm sử dụng cây thuốc từ lâu đời để chữa bệnh trong y học cổ truyền. Hàng trăm cây thuốc đã được khoa học hiện đại chứng minh về giá trị chữa bệnh. Xu hướng đi sâu nghiên cứu xác minh các kinh nghiệm của y học cổ truyền và tìm kiếm các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học cao từ dược liệu để làm thuốc ngày càng được quan tâm ở nước ta cũng như trên thế giới.

Việc thử nghiệm tác dụng dược lý để tạo ra thuốc mới từ nguồn dược liệu ở nước ta được thực hiện trên quy mô ngày càng rộng lớn. Cuốn sách này giới thiệu các phương pháp nghiên cứu dược lý để xác định các chế phẩm và hoạt chất có các hoạt tính dược lý có thể sử dụng làm thuốc chữa bệnh. Phần lớn là những phương pháp dược lý được dùng phổ biến, đòi hỏi những điều kiện ứng dụng không quá phức tạp cho những kết quả chính xác, có sự tương quan với hiệu quả chữa bệnh của thuốc trên lâm sàng. Bên cạnh việc sử dụng để nghiên cứu các chế phẩm và hoạt chất từ dược thảo, các phương pháp này cũng có thể được ứng dụng để nghiên cứu các thuốc tổng hợp hoá học.

Trong tất cả các chương trình nghiên cứu dược lý các thuốc, cần có sự nghiên cứu có hệ thống và áp dụng các phương pháp nghiên cứu thích hợp, sao cho có thể dễ dàng phát hiện các chất có hoạt tính dược lý, nhận biết và loại bỏ các chất không có hoạt tính. Vì tính chất phức tạp của hoạt tính sinh học, không có hệ thống phương pháp thử nghiệm nào là hoàn hảo, nghĩa là có thể phát hiện tất cả các chế phẩm và hoạt chất có hoạt tính thực sự mà không phát hiện một cách nhầm lẫn các chất có kết quả thử nghiệm dương tính nhưng không có tác dụng thực sự và không có hiệu quả khi ứng dụng trên lâm sàng.

Người nghiên cứu phải hiểu biết giá trị cũng như mặt hạn chế của các phương pháp thử nghiệm và kết hợp một cách hợp lý để có sự kiểm chứng giữa các phương pháp và đạt các kết quả có độ chính xác cao hơn.

Trong nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc, có ba loại chương trình nghiên cứu. Loại chương trình nghiên cứu đơn giản nhất sử dụng một phương pháp thử nghiệm, hoặc hai phương pháp tương tự, để phát hiện các chất có cùng một loại tác dụng dược lý. Một ví dụ về loại nghiên cứu này là việc thử nghiệm tác dụng hạ đường huyết, đo khả năng làm giảm nồng độ đường trong máu động vật thí nghiệm của các chất.

Loại chương trình nghiên cứu thứ hai dùng nhiều phương pháp thử nghiệm nhằm xác định các hợp chất nào trong một nhóm hợp chất có hoạt tính, và có những loại hoạt tính sinh học nào. Chứng minh hoạt tính nào là chính, và những hoạt tính nào là phụ trợ. So sánh hiệu lực dược lý của chất thử nghiệm với các thuốc đã biết,

giúp đề ra quyết định về nội dung nghiên cứu tiếp theo. Chương trình cũng sẽ có nhiều mục tiêu thay vì một mục tiêu duy nhất.

Loại chương trình nghiên cứu thứ ba thường được gọi là chương trình nghiên cứu không định hướng (hay chương trình nghiên cứu mù). Mục tiêu là tìm ra một tác dụng sinh học nào đó của một nhóm chất mới và tìm ra những lĩnh vực nghiên cứu mới. Vì không biết hoặc không dự đoán được một loại tác dụng đã biết, chương trình nghiên cứu sẽ tiến triển tùy theo mức độ thông tin mà người nghiên cứu thu thập ngày càng nhiều về chất thử nghiệm.

Hiện nay, việc nghiên cứu tác dụng dược lý các thuốc được tiến hành phần lớn ở các phòng thí nghiệm dược lý của các viện nghiên cứu, các trường đại học, và một số công ty dược phẩm lớn có đầu tư cho nghiên cứu khoa học, để tạo ra các thuốc chữa bệnh mới từ nguồn nguyên liệu trong nước.

Chúng tôi hy vọng cuốn sách này sẽ giúp ích trong việc cung cấp tư liệu về phương pháp nghiên cứu dược lý cho các cán bộ khoa học, các nghiên cứu sinh, sinh viên y và dược, và cả cho cán bộ trong các ngành khác quan tâm đến nghiên cứu dược lý phục vụ việc chế tạo các thuốc mới từ nguồn nguyên liệu trong nước.

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Viện Dược liệu đã tạo điều kiện cho việc biên soạn và xuất bản cuốn sách này.

Tuy có nhiều cố gắng trong việc biên soạn, song cũng không thể tránh khỏi những thiếu sót, chúng tôi mong nhận được nhiều ý kiến đóng góp quý báu của bạn đọc, để lần tái bản sau được bổ sung đầy đủ và hoàn thiện hơn.

Các tác giả

MỤC LỤC

CHƯƠNG 1 MỘT SỐ VẤN ĐỀ CHUNG

I. Những yếu tố ảnh hưởng đến đáp ứng của cơ thể động vật đối với thuốc.....	15
II. Nghiên cứu cơ chế tác dụng dược lý của thuốc.....	17
III. Thuốc gây mê dùng cho động vật thí nghiệm.....	20
IV. Chăm sóc, sinh sản và quản lý động vật thí nghiệm.....	22

CHƯƠNG 2 PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC TÁC DỤNG CỦA THUỐC TỪ CÂY THUỐC VÀ PHƯƠNG PHÁP CHUẨN BỊ MẪU SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG DƯỢC LÝ

I. Phương pháp sàng lọc tác dụng của thuốc từ cây thuốc	27
II. Phương pháp chuẩn bị mẫu sử dụng trong nghiên cứu tác dụng dược lý	36

CHƯƠNG 3 NHỮNG THỬ NGHIỆM TRÊN CÁC CƠ QUAN CÔ LẬP

I. Các phương pháp thử nghiệm trên ruột cô lập.....	44
II. Các thử nghiệm trên các cơ quan có cơ trơn khác.....	47
III. Thử nghiệm trên cơ vân.....	50

CHƯƠNG 4 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC GIẢM ĐAU

I. Phương pháp nghiên cứu dược lý thuốc giảm đau gây ngủ.....	58
II. Phương pháp nghiên cứu dược lý thuốc giảm đau không gây ngủ	63

CHƯƠNG 5 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CHỐNG CO GIẬT

I. Nghiệm pháp gây co giật bằng pentylentetrazol.....	65
II. Thí nghiệm về tác dụng chống co giật do strychnin gây nên trên chuột.....	71

III. Nghiên cứu tác dụng chống co giật do tremorin gây nên trên chuột nhắt trắng.....	73
IV. Thí nghiệm về tác dụng chống co giật do natri glutamat gây nên trên chuột.....	74
V. Nghiên cứu tác dụng chống co giật do sốc điện gây nên	75

CHƯƠNG 6

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC TÁC DỤNG TRÊN HỆ THẦN KINH ĐỐI GIAO CẢM

I. Nghiên cứu các thuốc tác dụng giống thần kinh đối giao cảm.....	77
II. Nghiên cứu các thuốc liệt thần kinh đối giao cảm.....	79
III. Nghiên cứu các thuốc kháng cholinesterase	85

CHƯƠNG 7

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC TÁC DỤNG TRÊN HỆ THẦN KINH GIAO CẢM

I. Nghiên cứu các thuốc tác dụng giống thần kinh giao cảm.....	87
II. Nghiên cứu các thuốc phong bế thụ thể α - adrenergic	90
III. Nghiên cứu các thuốc phong bế thụ thể β - adrenergic.....	98

CHƯƠNG 8

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC TÁC DỤNG TRÊN TIM VÀ MẠCH VÀNH

I. Nghiên cứu thuốc trợ tim.....	101
II. Nghiên cứu thuốc tác dụng trên mạch vành.....	105

CHƯƠNG 9

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CHỐNG HUYẾT KHỐI VÀ THUỐC CHỐNG TĂNG HUYẾT ÁP

I. Nghiên cứu thuốc chống huyết khối.....	115
II. Nghiên cứu thuốc chống tăng huyết áp	120
III. Thử nghiệm tác dụng chống oxy hóa bảo vệ tế bào thần kinh trong mô hình thiếu máu cục bộ - tưới máu lại.....	123

CHƯƠNG 10

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC TÁC DỤNG TRÊN HỆ HÔ HẤP

I. Nghiên cứu thuốc chống ho.....	125
II. Nghiên cứu thuốc giãn phế quản	127
III. Nghiên cứu thuốc long đờm	129

CHƯƠNG 11

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CHỐNG TĂNG LIPID MÁU VÀ THUỐC TÁC DỤNG TRÊN VỮA XƠ ĐỘNG MẠCH

I. Thử nghiệm trên động vật có cholesterol máu bình thường trong sàng lọc ban đầu.....	131
II. Thử nghiệm trên động vật có tăng cholesterol máu	132
III. Các mô hình thực nghiệm trên động vật trung gian.....	135
IV. Tăng cholesterol máu gây bởi estrogen ở chim.....	136
V. Tăng cholesterol máu gây bởi triton.....	137
VI. Tăng cholesterol máu gây bởi tween 80.....	137
VII. Bàn luận và phân tích các phương pháp đánh giá các thuốc hạ cholesterol máu	138

CHƯƠNG 12

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CHỐNG VIÊM

I. Các phương pháp nghiên cứu trên phù thực nghiệm.....	140
II. Thử nghiệm trên ban đỏ gây bởi tia tử ngoại ở chuột lang.....	141
III. Các phương pháp nghiên cứu trên u hạt thực nghiệm.....	142
IV. Thử nghiệm gây dịch rỉ màng phổi trên chuột cống trắng già	144
V. Thử nghiệm trên viêm đa khớp thực nghiệm do <i>Mycoplasma arthritis</i>	144
VI. Thử nghiệm trên viêm khớp thực nghiệm gây bởi chất bổ trợ Freund	146
VII. Thử nghiệm trên viêm đa khớp ở chuột cống trắng gây bằng chất bổ trợ (chất sáp D) phân lập từ trực khuẩn lao	147
VIII. Nghiên cứu sự dung nạp thuốc chống viêm bởi dạ dày.....	149

CHƯƠNG 13

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC ỨC CHẾ VÀ ĐIỀU HÒA MIỄN DỊCH VÀ THUỐC KHÁNG HISTAMIN

I. Nghiên cứu thuốc ức chế và điều hòa miễn dịch	151
II. Nghiên cứu thuốc kháng histamin.....	158

CHƯƠNG 14

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CHỐNG LOÉT DẠ DÀY VÀ THUỐC KHÁNG ACID

I. Các thử nghiệm trên tổn thương dạ dày cấp tính	163
II. Thử nghiệm truyền dịch dạ dày chuột cống trắng.....	166
III. Xác định dịch nhày thành dạ dày.....	167
IV. Đo hoạt độ của enzym myeloperoxidase	167
V. Đo hoạt độ của pepsin	168
VI. Xác định hoạt độ của mucin	168
VII. Nghiên cứu hoạt tính kháng <i>Helicobacter pylori</i>	168
VIII. Thử nghiệm tác dụng ức chế sự ngưng kết hồng cầu gây bởi <i>Helicobacter pylori</i>	169

CHƯƠNG 15

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CÓ TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN

I. Đặt vấn đề.....	171
II. Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan trên tổn thương gan do các chất độc với gan	173
III. Nghiên cứu tác dụng của thuốc trên xơ gan thực nghiệm	183

CHƯƠNG 16

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CÓ TÁC DỤNG SINH MẬT VÀ THÔNG MẬT

I. Nghiên cứu tác dụng lợi mật của thuốc ở chuột lang.....	186
II. Nghiên cứu tác dụng sinh mật của thuốc ở chuột cống trắng	190
III. Nghiên cứu tác dụng sinh mật của thuốc ở chuột nhắt trắng.....	193
IV. Các mô hình khác nghiên cứu tác dụng lợi mật	195
V. Nghiên cứu tác dụng thông mật.....	196

CHƯƠNG 17

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CHỐNG ĐÁI THẢO ĐƯỜNG

I. Thử nghiệm tác dụng hạ đường máu trên chuột cống trắng bình thường.....	199
II. Thử nghiệm tác dụng hạ đường máu trên động vật đái tháo đường.....	200

III. Thử nghiệm dung nạp glucose.....	201
IV. Thử nghiệm tác dụng trên sự tiết insulin <i>in vitro</i>	202
V. Thử nghiệm các tác dụng ngoài tuyến tụy	203
VI. Thử nghiệm tác dụng trên hoạt độ của superoxyd dismutase ở đảo tụy động vật đái tháo đường	205
VII. Thử nghiệm tác dụng ức chế aldose reductase.....	205
VIII. Thử nghiệm tác dụng trên hàm lượng sorbitol	206

CHƯƠNG 18

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CÓ TÁC DỤNG NỘI TIẾT SINH DỤC

I. Nghiên cứu thuốc có tác dụng estrogen.....	209
II. Nghiên cứu thuốc có tác dụng kiểu progesteron (progestogen).....	214
III. Nghiên cứu thuốc có tác dụng androgen	220

CHƯƠNG 19

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CÓ TÁC DỤNG HƯỚNG SINH DỤC VÀ THUỐC CÓ TÁC DỤNG ĐIỀU TIẾT SINH SẢN

I. Nghiên cứu dược lý thuốc có tác dụng hướng sinh dục	223
II. Nghiên cứu dược lý thuốc có tác dụng điều tiết sinh sản	225

CHƯƠNG 20

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN *IN VITRO*

I. Những yếu tố ảnh hưởng	231
II. Kỹ thuật định tính để thăm dò tác dụng trên vi khuẩn	237
III. Phương pháp nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn bằng kỹ thuật dùng khoanh giấy trên môi trường đặc.....	240
IV. Phương pháp nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn bằng kỹ thuật dùng ống trụ trên môi trường đặc	251
V. Phương pháp nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn dùng kỹ thuật hệ nồng độ trong môi trường lỏng	252
VI. Phương pháp nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn dùng kỹ thuật vi định lượng trong vi môi trường lỏng	255
VII. Phương pháp sinh tự ký	258

CHƯƠNG 21**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG VI NẤM**

I. Nghiên cứu tác dụng kháng vi nấm <i>in vitro</i>	261
II. Nghiên cứu tác dụng kháng vi nấm <i>in vivo</i>	264
III. Mô hình gây nhiễm vi nấm da thực nghiệm ở chuột lang.....	266
IV. Mô hình gây nhiễm nấm giác mạc ở thỏ	268
V. Mô hình gây nhiễm vi nấm ở âm đạo chuột nhắt trắng.....	270
VI. Mô hình gây nhiễm vi nấm toàn thân ở chuột nhắt trắng	272
VII. Mô hình gây nhiễm vi nấm phổi ở chuột nhắt trắng.....	274
VIII. Một số mô hình khác	276

CHƯƠNG 22**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ
THUỐC CÓ TÁC DỤNG CHỐNG OXY HÓA**

I. Đại cương về gốc tự do	279
II. Các phương pháp xác định tác dụng chống oxy hóa	286

CHƯƠNG 23**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU MỘT SỐ TÁC DỤNG DƯỢC LÝ KHÁC**

I. Nghiên cứu tác dụng tăng lực.....	295
II. Nghiên cứu tác dụng chống tăng sản tuyến tiền liệt lành tính.....	296
III. Nghiên cứu tác dụng chống bệnh Alzheimer.....	297
IV. Nghiên cứu tác dụng ức chế sự dung nạp và ức chế triệu chứng cai nghiện morphin.....	299
V. Phương pháp nghiên cứu dược lý tác dụng hạ sốt.....	305
VI. Phương pháp nghiên cứu dược lý tác dụng chống béo phì.....	305

CHƯƠNG 24**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH TRƯỜNG DIỄN CỦA THUỐC**

I. Đại cương về nghiên cứu độc tính.....	311
II. Phương pháp nghiên cứu độc tính trường diễn.....	313

CHƯƠNG 25**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH TẠI CHỖ**

I. Đặt vấn đề.....	321
--------------------	-----

II. Nghiên cứu tác dụng kích ứng da	322
III. Thử tác dụng kích ứng da của thuốc so với một thuốc tham chiếu.....	325
IV. Thử tác dụng kích ứng da của thuốc so với một thuốc kích ứng chuẩn	327
V. Xác định mức độ kích ứng da của thuốc nguyên dạng	329
VI. Xác định nồng độ kích ứng ngưỡng	330

CHƯƠNG 26

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH GÂY BIẾN CHỨNG VÀ SINH UNG THƯ

I. Độc tính gây biến chứng	335
II. Nghiên cứu độc tính sinh ung thư	342

CHƯƠNG 27

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH TRÊN CHỨC NĂNG SINH SẢN VÀ PHÁT TRIỂN

I. Động vật thí nghiệm	347
II. Phương pháp thực nghiệm	347
III. Phân tích kết quả.....	352
IV. Nghiên cứu tác dụng sinh quái thai của thalidomid	352

CHƯƠNG 28

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TÍNH AN TOÀN VÀ LIỀU CÓ HIỆU QUẢ CỦA THUỐC

I. Đặt vấn đề.....	355
II. Những điểm cần quán triệt khi xác định tính an toàn và liều có hiệu quả của thuốc	355
III. Phương pháp xác định liều có hiệu quả cho một thuốc mới	357
IV. Xác định tính an toàn của thuốc	363
V. Tính liều có hiệu quả tương đương trên người	366
VI. Trường hợp xác định độc tính cấp, nhưng không tìm được LD ₅₀	367

CHƯƠNG 29

CÁCH XÁC ĐỊNH LIỀU ED₅₀

I. Đại cương	369
II. Cách xác định ED ₅₀	371

CHƯƠNG 30**PHƯƠNG PHÁP NGOẠI SUY LIỀU CÓ HIỆU QUẢ TƯƠNG ĐƯƠNG
GIỮA NGƯỜI VÀ ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM**

I. Các yếu tố ảnh hưởng đến liều có hiệu quả tương đương giữa các loài động vật	377
II. Ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm.....	385
III. Xác định diện tích bề mặt cơ thể của người.....	387
 TÀI LIỆU THAM KHẢO	393

CHƯƠNG 1

MỘT SỐ VẤN ĐỀ CHUNG

GS. Đoàn Thị Nhu

I. NHỮNG YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN ĐÁP ỨNG CỦA CƠ THỂ ĐỘNG VẬT ĐỐI VỚI THUỐC

Hoạt tính dược lý của thuốc trong thử nghiệm trên động vật phụ thuộc vào nhiều yếu tố thuộc bản chất cơ thể động vật hoặc vào những yếu tố bên ngoài.

1.1. Yếu tố phụ thuộc bản chất cơ thể động vật

Độ nhạy cảm của cơ thể thay đổi với tuổi. Nói chung những động vật non có độ nhạy cảm lớn hơn. Những liều cần thiết để gây một tác dụng dược lý là hàm số của trọng lượng cơ thể. Do đó trong thử nghiệm, bao giờ người ta cũng tính liều dùng theo thể trọng. Giới tính đôi khi làm thay đổi hoạt tính của thuốc. Độc tính của strychnin lớn hơn ở động vật cái. Tác dụng kích thích của morphin mạnh hơn ở phụ nữ.

Hoạt tính của thuốc có thể thay đổi theo loài. Các yếu tố di truyền ảnh hưởng đến các tác dụng của thuốc mà sự chuyển hóa có thể phụ thuộc vào sự hiện diện của một gen. Việc lựa chọn loài động vật có tầm quan trọng rất lớn trong nghiên cứu dược lý thực nghiệm. Atropin có độc tính thấp trên các loài động vật gặm nhấm, do sự hiện diện của một esterase trong huyết thanh của các động vật này. Nicotin gây liệt trực tiếp các hạch giao cảm của thỏ, gây hạ huyết áp, trong khi nó kích thích các hạch giao cảm lúc ban đầu ở chó, gây tăng huyết áp. Morphin kích thích hệ thần kinh trung ương của mèo và khỉ, nhưng gây an thần ở người và chó. Các glycosid trợ tim loại *Digitalis* và *Strophanthus* thể hiện mức độ tích lũy cao ở người và mèo, nhưng có mức độ tích lũy thấp hơn nhiều ở chuột và thỏ.

Việc dùng dài hạn một số thuốc gây quen thuốc. Đối tượng trở nên ngày càng kém nhạy cảm với thuốc và để đạt tác dụng tương tự, cần phải tăng thêm liều. Ngược lại, đối với một số thuốc, một số đối tượng có hiện tượng không dung nạp. Những liều thấp gây những biểu hiện mạnh mẽ có thể dẫn tới tử vong. Chế độ ăn ảnh hưởng đến hoạt tính của thuốc. Strychnin và cocain thể hiện độc tính lớn hơn trên những động vật ở trạng thái nhịn đói. Tác dụng của các thuốc lợi tiểu mạnh hơn sau khi cho động vật uống nhiều nước và muối natri clorid. Sự mệt nhọc nói chung làm tăng độc tính.

Nhiệt độ cơ thể có vai trò thiết yếu đối với tác dụng của một số thuốc. Các salicylat làm cho nhiệt độ của những đối tượng bị sốt trở về mức bình thường, nhưng không có tác dụng trên đối tượng bình thường. Lúc bắt đầu tác dụng, ether gây kích thích mạnh hơn ở đối tượng sốt cao. Thêm nữa, độc tính các thuốc thường tăng lên cùng với sự tăng thân nhiệt. Chu kỳ sinh dục và sự thai nghén ở động vật cái ảnh hưởng đến tác dụng của thuốc. Progesteron chỉ có tác dụng sau khi các thụ thể chịu tác động của estrogen. Oxytocin chỉ có tác dụng kích thích trên tử cung vào cuối thời kỳ thai nghén.

Bệnh tật có thể làm thay đổi tác dụng của thuốc. Tác dụng của glucosid trợ tim, khó chứng minh một cách đầy đủ ở đối tượng bình thường, đã thể hiện rõ ràng ở đối tượng suy tim. Các yếu tố ảnh hưởng đến chuyển hóa cũng làm thay đổi hoạt tính của thuốc. Những sự biến đổi chuyển hóa có thể chuyển đổi các thuốc thành các chất có hoạt tính, hoặc, ngược lại, thành các chất không có hoạt tính được lý.

1.2. Yếu tố bên ngoài

Để tạo nên những điều kiện tối ưu về môi trường ở các phòng chăn nuôi, lưu giữ, chăm sóc động vật, cần quan tâm những vấn đề sau đây:

- Tiêu chuẩn hóa nhiệt độ, ẩm độ, áp suất không khí, công suất và nhịp chiếu sáng của phòng.
- Tiêu chuẩn hóa các kiểu lồng và các đồ trang bị thích hợp được thiết kế để tránh các trạng thái stress và tai nạn không mong muốn và để làm đơn giản hóa công việc.
- Đào tạo một cách cơ bản các kỹ thuật viên chăn nuôi động vật.
- Tuân thủ thực hiện một cách đầy đủ thời gian thuần hóa đối với động vật thí nghiệm, đặc biệt sau sự vận chuyển.
- Tránh tất cả những sự vận chuyển không cần thiết động vật tới nơi thí nghiệm. Cán bộ nghiên cứu nên đi tới nhà chăn nuôi lưu giữ động vật hơn

là mang động vật tới nơi thí nghiệm, để tránh tới mức tối đa mọi thay đổi về môi trường.

- Thực hiện những biện pháp vệ sinh cần thiết như sự khử khuẩn thích hợp, quần áo sạch, buồng tắm có vòi gương sen, v.v.
- Tránh những ảnh hưởng không liên quan tới thí nghiệm, ví dụ như khói, tiếng ồn, thuốc trừ sâu (Wilk, 1966).

II. NGHIÊN CỨU CƠ CHẾ TÁC DỤNG DƯỢC LÝ CỦA THUỐC

Cơ chế tác dụng của thuốc là phần thiết yếu của dược lý học. Trong nghiên cứu cơ chế tác dụng của thuốc, trước hết, người ta cố gắng xác định bản chất của hệ thống sinh lý bị ảnh hưởng. Cơ chế hóa sinh sâu sắc của tác dụng đã được làm sáng tỏ đối với một số thuốc.

2.1. Cơ chế chung của tác dụng dược lý của thuốc

Các thuốc đôi khi là những chất thay thế, nhằm sửa chữa sự thiếu có tính chất ngoại sinh (các vitamin) hoặc nội sinh (các hormon) về các chất thiết yếu. Phần lớn các thuốc tác động đến một trong những chức năng sinh lý lớn, hoặc kích thích, hoặc ức chế chức năng này. Sau khi quan sát những tác dụng về đại thể của thuốc, người ta cố gắng xác định hệ thống sinh lý bị ảnh hưởng. Như vậy, người ta nghiên cứu tìm nơi tác dụng, ở vỏ não hoặc dưới vỏ não của một thuốc gây co giật; người ta cố gắng phân biệt xem tăng huyết áp do co mạch hay do tăng hiệu suất của tim. Ở mức của hệ thần kinh tự quản, người ta nghiên cứu những tác dụng trên các bộ phận tác động của sợi cơ mạch máu, trên các sợi giao cảm, trên các hạch. Các tác dụng của một chất thường là phức hợp của những tác dụng kích thích và ức chế. Thậm chí đôi khi tác dụng kích thích là do ức chế một tác dụng ức chế.

Trong nghiên cứu dược lý, người ta cố gắng làm sáng tỏ những tương tác của thuốc với một chất thiên nhiên. Một số thuốc có tác dụng giống như tác dụng của các chất thiên nhiên: các thuốc giống thần kinh đối giao cảm và acetylcholin, các thuốc giống thần kinh giao cảm và noradrenalin, các thuốc thay thế các hormon. Một số thuốc tác động trên những tương tác của một chất thiên nhiên với các bộ phận tác động, làm dễ dàng (hợp lực) hoặc ngăn cản (đối kháng) các tương tác này.

Một số thuốc có thể làm thay đổi chuyển hóa của các chất thiên nhiên do tác động trên các enzym của sự dị hóa (các thuốc kháng cholinesterase) hoặc của sự tổng hợp (các thuốc ức chế dopadecarboxylase ức chế dopamin- β -oxydase. Đôi khi, thuốc tác động trên sự đi qua của những tiền chất vào bên trong màng của tế bào

thực hiện sự tổng hợp (các thioamid ức chế iod vào trong tuyến giáp; sự cạnh tranh triethylcholin - cholin). Thuốc có thể thay thế tiền chất trong các phản ứng tổng hợp dẫn tới tạo thành một chất trung gian giả (α -methyldopa) hoặc một chất chống chuyển hóa.

Thuốc có thể gây giải phóng một chất thiên nhiên từ các nơi dự trữ, hoặc ngược lại ức chế sự giải phóng này. Sự tiêu cạn chất thiên nhiên này có thể do sự giải phóng quá mức vượt quá khả năng tổng hợp, hoặc do rối loạn trong dự trữ. Một số thuốc giải phóng một chất sinh học từ các liên kết với protein của mô hoặc huyết tương. Ví dụ, hoạt tính của các sulfamid gây hạ đường máu là do giải phóng insulin. Các thuốc kháng sinh là những chất độc chọn lọc do tác dụng đặc hiệu gây rối loạn một dây chuyền chuyển hóa của vi sinh vật.

Một số thuốc biểu hiện tác dụng mà không được hấp thu vào cơ thể. Những thuốc này có thể tác động một cách cơ học như thuốc dùng để thực rửa hoặc một số thuốc tẩy. Một số thuốc khác tác dụng do một hiện tượng vật lý; ví dụ, bismuth carbonat, có tính trợ về mặt hóa học, dính chặt vào niêm mạc dạ dày - ruột và tạo nên một màng bao bảo vệ; than hoạt hút các dịch và hơi ở ruột. Những thuốc khác tác động theo con đường hóa học: các thuốc ăn da kết hợp với nước và hủy hoại các tế bào, tanin có tác dụng làm săn do gây kết tủa protein của tế bào.

2.2. Các thụ thể (receptor)

Từ ngữ thụ thể chỉ những vị trí phân tử đặc trưng của một tế bào tác động, thuốc tác động trên những vị trí đó để gây phản ứng đặc trưng của tế bào đối với thuốc. Phân tử thuốc có một số nhóm hóa học có khả năng kết hợp với thụ thể; một trong những nhóm này có khả năng gây tác dụng được lực học: đó là nhóm có hoạt tính. Những vị trí khác của tế bào mà thuốc kết hợp, nhưng không tham gia vào tác dụng được gọi là chất nhận. Như vậy, acetylcholin kết hợp với các thụ thể bởi các chức ester và amoni bậc bốn; nhưng chỉ có chức sau này có khả năng hoạt hóa các thụ thể.

Một số thụ thể đã được xác định là những vị trí trên các enzym: adenylyclase đối với các tác dụng chuyển hóa của catecholamin, adenosin triphosphatase màng tế bào phụ thuộc vào Na^+ và K^+ đối với các glucosid trợ tim và có thể với một số thuốc lợi tiểu. Việc sử dụng các chất ức chế đặc hiệu hoặc chất đối kháng cho phép phân loại các thụ thể. Đôi khi các thụ thể đối với một thuốc nào đó chỉ có trong một loại tế bào; khi đó, thuốc gây các tác dụng đặc hiệu. Thường thì các thụ thể được phân bố trong nhiều mô. Như vậy, acetylcholin có tác dụng trên các sợi cơ trơn của mạch máu, ruột, phế quản, mống mắt và trên các sợi cơ tim.

Một thuốc có thể tác động trên nhiều loại thụ thể phân bố trong cùng mô hoặc trong các mô khác nhau. Như vậy, acetylcholin kích thích các thụ thể của những sợi cơ trơn làm giãn mạch, những tế bào hạch của hệ thần kinh tự quản, của bản thần kinh - cơ. Những thụ thể này không giống nhau, vì một số chất chỉ kích thích hoặc chỉ ức chế một trong các loại thụ thể. Như vậy muscarin tác động trên các thụ thể của những sợi cơ trơn và nicotin tác động trên các thụ thể của hạch.

Tác dụng trên những thụ thể khác nhau có thể dẫn đến các tác dụng trái ngược nhau. Adrenalin tác động chủ yếu trên những thụ thể alpha và gây co mạch; liều thấp tác động trên những thụ thể beta và gây giãn mạch. Trong những thuốc giống thần kinh giao cảm gần với adrenalin, một số, như neosynephrin, tác động ưu tiên trên những thụ thể alpha, các thuốc khác, như isoprenalin, tác động ưu tiên trên những thụ thể beta.

Nếu một chất có khả năng kết hợp với những thụ thể của một thuốc khác, nhưng không có nhóm hoạt động có khả năng hoạt hóa các thụ thể này, thì chất này có thể tác động như là một chất đối kháng. Như vậy atropin làm mất tác dụng của acetylcholin trên những sợi cơ trơn được phân bố hệ thần kinh đối giao cảm. Các thuốc ức chế dây thần kinh tiết adrenalin alpha kết hợp với những thụ thể alpha của adrenalin và để lại những tác dụng giãn mạch của adrenalin trên các thụ thể beta.

2.3. Cơ chế sâu sắc của tác dụng dược lý của thuốc

Tác dụng của thuốc thể hiện cuối cùng trên những dây chuyển chuyển hóa. Tuy nhiên, những thay đổi về chuyển hóa chịu trách nhiệm về tác dụng dược lý còn chưa được xác định một cách rõ ràng trong phần lớn trường hợp. Một số thuốc thay đổi một phản ứng men chịu trách nhiệm về sự thoái biến của một chất sinh lý. Sự ức chế cholinesterase, là enzym gây thủy phân acetylcholin, giải thích cho phần lớn các tác dụng của eserine và neostigmin.

Tác dụng của một thuốc có thể được giải thích bằng sự can thiệp của thuốc đó vào trong các dây chuyển chuyển hóa. Những vitamin tan trong nước là những yếu tố cấu thành những enzym chủ yếu đối với các quá trình chuyển hóa. Các thuốc ngủ ức chế sự hô hấp tế bào. Thyroxin làm tăng chuyển hóa cơ bản bằng tác động trên quá trình oxy - hóa khử gây phosphoryl - hóa. Adrenalin làm hoạt hóa phosphorylase và gây sự phân hủy glycogen.

Một số hormon kích thích sự tổng hợp acid ribonucleic phụ thuộc vào acid desoxyribonucleic và làm tăng sự tổng hợp protein. Đó là tác dụng của aldosteron, các steroid tăng đồng hóa, insulin, thyroxin.

Các thuốc có thể làm thay đổi các tính chất của màng tế bào. Màng tế bào chia cách hai môi trường có thành phần ion khác nhau. Natri được giữ bên ngoài tế bào do có tính thấm qua màng yếu và do một quá trình hoạt động, một cái bơm, gây sự trao đổi với kali tập trung trong tế bào. Như vậy tạo nên một điện thế giữa bên ngoài và bên trong tế bào, điện thế của màng, gần với điện thế của kali (khoảng 80 mV).

Sự kích thích bởi các chất trung gian kích thích gây khử cực (giảm trị số tuyệt đối của điện thế màng). Khi điện thế này đạt tới một trị số nào đó, tính thấm đối với natri tăng lên đột ngột và điện thế tác động được tạo nên, mà đỉnh gần với điện thế cân bằng của natri tăng lên đột ngột và điện thế tác động được tạo nên, mà đỉnh gần với điện thế cân bằng của natri và quá trình kết thúc do tác động của một hiện tượng khử hoạt tính đối với sự tăng tính thấm với natri. Điện thế tác động giảm do sự tăng tính thấm của màng đối với ion kali. Trong giai đoạn phục hồi, hoạt tính chuyển hóa, nhờ vào năng lượng được cung cấp bởi sự thủy phân adenosin triphosphat, do sự can thiệp của adenosin triphosphatase ở màng, đẩy natri ra ngoài tế bào và đổi lấy ion kali vào trong tế bào.

Sự ức chế được thực hiện do sự tăng phân cực của màng, làm mất các điện thế kích thích không lan truyền. Các thuốc có thể gắn kết với thụ thể ở màng, gây tác dụng giống chất trung gian hoặc ức chế nó. Thuốc cũng có thể làm thay đổi tính thấm của màng với natri, hoặc làm giảm, hoặc làm tăng. Thuốc có thể ức chế sự trao đổi tích cực $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ qua màng, ví dụ bằng cách ức chế adenosin triphosphatase ở màng như các glucosid trợ tim. Những tác dụng trên màng này rất quan trọng để giải thích cơ chế tác dụng dược lý của nhiều thuốc.

Một nucleotid đặc biệt, chất 3' - 5' - adenosin monophosphat vòng, được tạo nên do tác động của adenylcyclase có vai trò quan trọng trong việc gây nên nhiều phản ứng (Schmitt, 1970).

III. THUỐC GÂY MÊ DÙNG CHO ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM

3.1. Các thuốc thường được dùng để gây mê động vật thí nghiệm

Cloral hydrat: gây một giấc ngủ yên tĩnh từ 5 đến 8 giờ, mà không ức chế các phản xạ.

Cloralose là kết hợp của cloral và α -glucose, gây giấc ngủ, làm tăng các phản xạ tủy.

Urethan có tác dụng gây ngủ mà không ảnh hưởng đến hô hấp, tuần hoàn và các phản xạ.

Các thuốc barbituric tạo thành một nhóm thuốc gây ngủ có tác dụng tương tự, chỉ khác nhau ở thời gian cảm ứng và thời gian kéo dài tác dụng. Các thuốc hay được dùng là: pentobarbital, thiopental, và được dùng ít hơn là amobarbital, aprobarbital. Các thuốc này gây một giấc ngủ yên tĩnh. Với liều cao hơn, có tác dụng gây mê, làm mất tri giác và các phản xạ, làm giảm trương lực cơ.

Các thuốc gây mê bay hơi được dùng là ether và cloroform. Các thuốc này là những chất không chuyển hóa và được thải trừ nhanh. Muốn có tác dụng, thuốc phải đạt được một áp suất hơi thích hợp ở hệ thần kinh trung ương.

3.2. Thuốc gây mê dùng cho các loài động vật thí nghiệm khác nhau

Chuột nhắt trắng

Chuột nhắt trắng được gây mê bằng cách đặt trong lọ miệng rộng trong đó có miếng bông thấm đầy ether hoặc cloroform, hoặc bằng cách đặt trước mũi chuột nhắt trắng được buộc chặt vào bàn phẫu thuật một miếng bông thấm đầy ether. Các phương pháp gây mê khác là tiêm vào màng bụng cloral hydrat 0,36 g/kg thể trọng; hoặc tiêm dưới da urethan 0,1 g/100 g thể trọng (1 ml dung dịch urethan 10% trong nước cho 100 g thể trọng); hoặc tiêm dưới da amobarbital natri 0,062 g/kg thể trọng.

Chuột cống trắng

Trong nhiều phẫu thuật, chuột cống trắng có thể được gây mê bằng tiêm dưới da 0,5 đến 0,7 ml dung dịch 25% urethan trong nước cho 100 g thể trọng (khoảng 175 mg cho 100 g thể trọng). Chuột cống trắng còn có thể được gây mê với ether hoặc cloroform trong bình miệng rộng hoặc dưới một cái phễu, hoặc bằng cách đặt trước mũi chuột một miếng bông, đặt trong một cái cốc nhỏ, thấm đầy ether; hoặc bằng cách tiêm vào màng bụng cloral hydrat 0,36/kg thể trọng; hoặc bằng cách tiêm dưới da amobarbital natri 0,06 - 0,10 g/kg thể trọng.

Chuột lang

Chuột lang được gây mê bằng cách cho ngửi ether; hoặc tiêm dưới da 1,0 - 1,2 g urethan cho 1 kg thể trọng.

Thỏ

Thỏ có thể được gây mê bằng cách cho ngửi ether; hoặc bằng cloral hydrat với liều 0,7 - 0,8/kg tiêm dưới da hoặc 0,25 g/kg tiêm vào màng bụng; hoặc bằng

urethan 1,0 – 1,2 g/kg tiêm dưới da; hoặc bằng barbital natri 0,225 g/kg tiêm tĩnh mạch (trong dung dịch 10%) hoặc 0,20 g/kg (trong dung dịch 1%) tiêm màng bụng; hoặc bằng cloralose 0,10 g/kg tiêm tĩnh mạch.

Mèo

Mèo có thể được gây mê bằng cho người ether (dưới chuông thủy tinh và sau đó, trong thí nghiệm cấp tính, trong khí quản); hoặc bằng cloral hydrat tiêm dưới da 0,35 g/kg (5 ml dung dịch 7% cho 1kg); hoặc bằng urethan 1,0 – 1,2 g/kg tiêm dưới da hoặc 0,8 – 1,0 g/kg tiêm tĩnh mạch (trong dung dịch 10%); hoặc bằng amobarbital natri 0,04 – 0,10 g/kg tiêm dưới da, hoặc 0,05 – 0,06 g/kg tiêm màng bụng; hoặc bằng barbital natri 0,35 g/kg tiêm tĩnh mạch; hoặc bằng pentobarbital 0,035 g/kg tiêm màng bụng.

Chó

Chó có thể được gây mê bằng tiêm tĩnh mạch hỗn hợp pentobarbital natri 0,03 g/kg, và thiopental natri 0,025 g/kg, và sau đó duy trì tác dụng gây mê bằng tiêm truyền pentobarbital 0,004 g/kg mỗi giờ. Một số nhà nghiên cứu ưa dùng duy nhất pentobarbital. Cũng có thể gây mê chó bằng cloral hydrat 0,35 – 0,37 g/kg (3,5 – 3,7 ml dung dịch 10% /kg) tiêm màng bụng, kết hợp với morphin hydroclorid 0,01 g/kg tiêm dưới da; hoặc bằng phenobarbital natri 0,025 – 0,035 g/kg tiêm bắp hoặc dưới da, hoặc 0,225 g/kg tiêm tĩnh mạch (trong dung dịch 10%), hoặc 0,20 g/kg tiêm màng bụng (trong dung dịch 1%); hoặc bằng amytal natri 0,06 g/kg tiêm màng bụng, hoặc 0,10 g/kg tiêm dưới da, hoặc 0,045 - 0,06 g/kg tiêm tĩnh mạch (Abramov và cộng sự, 1957; Turner, 1965).

IV. CHĂM SÓC, SINH SẢN VÀ QUẢN LÝ ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM

(Bhardwaj, 1984)

Chăm sóc và quản lý động vật thí nghiệm là một chuyên ngành đa diện có liên quan đến một số lĩnh vực nghiên cứu cơ bản như môi trường, sinh lý, di truyền học, dinh dưỡng, khảo sát bệnh và kiểm soát bệnh, quản lý nhân viên và tổ chức, lưu giữ hồ sơ và xử lý dữ liệu.

4.1. Nhà chăn nuôi và môi trường

Vì động vật thí nghiệm nhạy cảm với các điều kiện sống, cần phải nuôi chúng trong một nhà biệt lập làm bằng bê tông và ở xa nhà ở của người, và không bị ảnh hưởng bởi bụi, khói, tiếng ồn, các loài gặm nhấm hoang, sâu bọ và chim. Nhà chăn

nuôi, các chuồng và môi trường của các phòng nuôi động vật là các yếu tố chính cần phải xem xét.

Khi vẽ sơ đồ một nhà chăn nuôi, cần phải phân chia rõ rệt không gian cho các hoạt động khác nhau. Các phòng nuôi động vật chiếm khoảng 50 – 60% của toàn bộ diện tích xây dựng, diện tích còn lại được dùng cho các dịch vụ như nhà kho (8 – 10%), diện tích rửa (8 – 10%), văn phòng và nhân viên (8 – 10%), phòng máy (4 – 5%), khu vực cách ly và các hành lang (12 – 15%).

Các chuồng được làm bằng kim loại thích hợp (tấm thép không gỉ hoặc sắt mạ kẽm) hoặc vật liệu tổng hợp và được đặt trên các giàn kim loại thích hợp. Các chuồng có kích thước thích hợp đối với mỗi loài động vật và có sự sắp đặt đầy đủ việc cho ăn và cho uống nước. Các chuồng phải không có đường nứt và các góc mà các loài vật gây hại có thể trốn ở đó và sinh sản.

Môi trường của phòng động vật và chuồng động vật là yếu tố quan trọng nhất trên đó phụ thuộc sản lượng và khả năng thực nghiệm của động vật. Vì các động vật rất nhạy cảm với các thay đổi của môi trường, phải tránh các thay đổi đột ngột về nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng và sự thông gió. Nói chung nên áp dụng các tiêu chuẩn sau đây về môi trường phòng động vật, với những thay đổi nhỏ cho các loài động vật khác nhau.

Nhiệt độ: $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; Ẩm độ: 50 - 60%.

Ánh sáng: 300 lux ở mức thấp nhất với chu kỳ ánh sáng đều 12 giờ.

Tiếng ồn: Cường độ 50 decibel. Tránh tiếng ồn cao và đột ngột.

Thông gió: 10 – 15 sự thay đổi không khí/giờ.

4.2. Động vật sinh sản và các thực hành về sinh sản

Để gây dựng một đàn động vật, phải lựa chọn động vật giống từ một nguồn đáng tin cậy/được chứng nhận về chất lượng, đảm bảo là bản chất di truyền học và tình trạng sức khỏe đạt tiêu chuẩn mong muốn. Trong trường hợp của một dòng nội phối, cần phải biết các đặc tính của dòng với sự phân bố gen và số của thế hệ nội phối để cho sự nhân giống tiếp theo. Về tình trạng sức khỏe, cần phải biết các động vật có phải từ dòng không có tác nhân gây bệnh thường quy riêng biệt hoặc dòng động vật thí nghiệm mà người ta đã biết hệ vi sinh vật hay không. Cũng cần phải biết tình trạng dinh dưỡng và tập quán nuôi ăn động vật.

Tùy theo yêu cầu, các đàn động vật có thể là nội phối hoặc ngoại phối (giao phối ngẫu nhiên). Trong trường hợp của các đàn nội phối, việc giao phối được sắp xếp giữa động vật đực và cái trong cùng một lứa đẻ. Thực hiện việc chọn lọc và các thế

hệ sau được nuôi. Việc theo dõi thường xuyên một đàn nội phối là cần thiết để đảm bảo tính đồng hợp tử của đàn. Các dòng nội phối được dùng là những mô hình rất có ích trong nghiên cứu nhiều bệnh miễn dịch và các nghiên cứu sinh học khác.

Trong trường hợp động vật ngoại phối (giao phối ngẫu nhiên), cần chú ý để tránh sự nội phối bằng cách sắp xếp sự giao phối giữa động vật đực và cái không có quan hệ họ hàng. Trong các đàn lớn, cơ hội của sự nội phối rất ít, ngay cả khi động vật được lựa chọn ngẫu nhiên và cho giao phối để sinh sản.

Thông tin tóm tắt về tập tính sinh sản của các động vật thí nghiệm thường dùng được trình bày ở bảng dưới.

4.3. Sự dinh dưỡng và cho ăn

Tình trạng dinh dưỡng của động vật chắc chắn có ảnh hưởng đến kết quả của thí nghiệm. Do đó, điều thiết yếu là động vật thí nghiệm được nuôi với một chế độ ăn cân bằng dựa trên các yêu cầu về dinh dưỡng của mỗi loài động vật. Trong dinh dưỡng và cho ăn, cần chú ý các điểm sau đây.

Chế độ ăn cân bằng. Chế độ ăn cho động vật chứa protein, carbohydrat, mỡ, chất khoáng, vitamin, chất xơ, và nước với tỷ lệ cần thiết cho mỗi loài động vật.

Tập tính sinh sản của các động vật thí nghiệm thường dùng

Loài động vật	Chu kỳ động dục (ngày)	Thời gian động dục	Thời gian rụng trứng	Thời gian mang thai (ngày)	Tuổi/thể trọng cai sữa tuần	Cỡ lứa đẻ	Động dục sau khi đẻ	Thời gian sống sinh sản (năm)
Chuột nhắt trắng	4 - 5	10 giờ	2 - 3 giờ sau động dục (tự nhiên)	21	3 tuần/ 9 - 12 g	10	sau khi đẻ	1
Chuột cống trắng	4 - 5	13 - 15 giờ	8 - 10 giờ (tự nhiên)	21	3 tuần/ 40 - 50g	8 - 12	"	1
Chuột lang	16	6 - 11 giờ	10 giờ (tự nhiên)	68	4 tuần/ 250 g	1 - 4	"	3 - 4
Thỏ	—	Liên tục	Được gây, 10 - 11 giờ sau giao phối	30	8 tuần/ 800 g	4 - 5	35 ngày	2 - 3

Tập tính sinh sản của các động vật thí nghiệm (tiếp theo)

Hamster	4 - 5	20 giờ	8 - 12 giờ (tự nhiên)	16	3 tuần/ 30 g	5 - 8	1 - 8 ngày	1
Gà	-	-	-	21 (ấp)	-	-	-	1 - 2
Chó	2 lần một năm	14 - 21 ngày	1 - 3 ngày (tự nhiên)	62	6 - 8 tuần	4 - 8	Động dục tiếp sau	6 - 8
Khỉ (rhesus)	28	-	11 - 14 ngày sau bắt đầu kỳ kinh nguyệt	164	18 - 24 tuần	1	Sau khi các con cai sữa	12 - 15

Chất lượng. Các thành phần của chế độ ăn phải có chất lượng chuẩn và không có bụi, mốc, nấm và ô nhiễm khác.

Số lượng. Mỗi động vật phải được cung cấp số lượng cần thiết thức ăn đáp ứng nhu cầu của sự nuôi dưỡng động vật và sinh sản.

Vị ngon. Thức ăn phải có vị ngon sao cho động vật ăn hết. Nếu thức ăn không ngon hoặc có mùi khó chịu, sẽ có sự hao phí dẫn đến suy dinh dưỡng.

Các chất bổ sung. Không bổ sung các thuốc, hormon, kháng sinh hoặc hóa chất vào thức ăn, trừ khi vì mục đích thử nghiệm, vì các chất này có thể gây rối loạn chuyển hóa bình thường của động vật và ảnh hưởng đến các kết quả thí nghiệm.

4.4. Vệ sinh và kiểm soát bệnh tật

Khi gây dựng một đàn động vật mới, nhà chăn nuôi phải được bố trí các hàng rào để kiểm soát sự xâm nhập của ô nhiễm vào nhà chăn nuôi qua người, vật liệu và loài gặm nhấm hoang.

Các phòng động vật phải được làm sạch, khử nhiễm và xông hơi cùng với các chuồng không và các giàn trong các phòng. Một khi đàn động vật đã được gây dựng, phải có sự kiểm soát chặt chẽ việc đi vào của nhân viên và các vật liệu như thức ăn, ổ nằm, nước, không khí, thiết bị. Các hàng rào không xuyên qua được ngăn cản sự xâm nhập của loài gặm nhấm hoang, chim, sâu bọ và vật hại. Cần có sự kiểm tra y tế đều đặn để phát hiện mọi trường hợp nhiễm khuẩn, kể cả xét nghiệm vi sinh vật học. Thực hiện cấy vi khuẩn khi có động vật chết. Tất cả động vật chết và chất thải phải được vứt bỏ hoặc tiêu một cách hợp thức.

CHƯƠNG 2

PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC TÁC DỤNG CỦA THUỐC TỪ CÂY THUỐC VÀ PHƯƠNG PHÁP CHUẨN BỊ MẪU SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG DƯỢC LÝ

PGS. TSKH. Đỗ Trung Đàm
PGS.TS. Nguyễn Thượng Dong

I. PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC TÁC DỤNG CỦA THUỐC TỪ CÂY THUỐC

1. Tầm quan trọng của việc nghiên cứu cây thuốc

Cây thuốc (động vật và khoáng vật có được dùng làm thuốc, nhưng ít hơn) đã là nguồn được dùng để chữa bệnh cho người trong một thời gian dài từ thời tiền sử.

- Số loài cây khoảng 500 000 loài, mới nghiên cứu khoảng 25 000 loài (kể cả chỉ mới nghiên cứu sơ bộ) chiếm 5%. Một số loài tuyệt chủng, một số loài đe dọa tuyệt chủng. Ví dụ, cây thông đỏ *Taxus baccata* L. subsp. *Wallichyana* (Zucc.) Pilger, hoặc *T. Wallichiana* Zucc., hoặc *T. yunnanensis* Cheng et L.K.Fu, thuộc họ Thông đỏ (Taxaceae), có alcaloid taxin A, taxin B, taxinin, baccatin-3, 10-deacetyl baccatin-2, có thể chuyển hóa thành taxol, chữa được một số dạng ung thư. Hiện ở ta, còn rất ít, chỉ khoảng mấy chục cây. Nếu không nghiên cứu để phát triển sẽ bị tuyệt chủng, và như thế, làm thế nào có nguyên liệu nghiên cứu để tạo ra thuốc được.

- Các thuốc đang có trên thị trường chiếm 25% có nguồn gốc từ cây cỏ, nấm, mốc.
- Các thầy thuốc ít tin tưởng vào sự sử dụng thuốc từ cây cỏ với dạng thô, chưa được nghiên cứu sâu. Cần nghiên cứu để chứng minh khoa học, từ đó, thầy thuốc tây y mới tin dùng. Nghiên cứu nâng cao, hiện đại hóa thuốc từ cây thuốc cổ truyền mới đảm bảo được tính an toàn và hiệu quả.
- Do môi trường sống thay đổi, cây thuốc đã có một số đột biến di truyền (genetic mutation) và tính chất có thể khác trước đây người xưa đã dùng. Vì thế, cần phải nghiên cứu.
- Cây thuốc có thể chia làm hai loại lớn:
 - + Chưa thấy trong văn thư cổ và phải đánh giá sinh học lần đầu tiên.
 - + Đã dùng từ lâu đời, có trong y văn cổ, nhưng chưa được chứng minh khoa học. Do đó cần phải nghiên cứu.
- Kết quả nghiên cứu tùy thuộc vào trình độ và phương tiện nghiên cứu. Ở nước ta, trình độ nghiên cứu có hạn, phương tiện nghiên cứu chưa có, hoặc có nhưng chưa biết tận dụng, khai thác hết công suất. Do vậy, ta phải biết lựa chọn, nghiên cứu cái gì và nghiên cứu được ở mức độ nào.

1.2. Mục tiêu nghiên cứu sàng lọc tác dụng sinh học ban đầu

- Phát hiện ra một tác dụng nào đó để phát triển thuốc mới.
- Xác định phân tử thuốc mới có hoạt tính sinh học.
- Tối ưu hóa hoạt tính sinh học bằng cách thay đổi về cấu trúc hóa học của phân tử thuốc ban đầu.
- Cung cấp tính hợp lý cho việc sử dụng lâm sàng cây thuốc.
- Có khi không phát hiện ra tác dụng gì rõ, nhưng qua nghiên cứu, cũng sẽ phát hiện được một số tác dụng được lý nhất định để ta có cơ sở áp dụng.

1.3. Các loại chương trình sàng lọc

1.3.1. Sàng lọc các thuốc có một tác dụng đã cho

Xây dựng một phương pháp nghiên cứu được lý tốt, rồi sàng lọc, thử với nhiều thuốc để xem loại nào có tác dụng đó và mức độ tác dụng ra sao. Ví dụ:

- + Tác dụng kháng khuẩn.
- + Tác dụng chống đái tháo đường (chống tăng glucose huyết).

- + Tác dụng chống viêm.
- + Tác dụng chống ung thư.
- + Tác dụng chống sốt rét...

1.3.2. Sàng lọc một thuốc xem có những tác dụng gì

Chiết xuất ra một dạng thuốc, rồi thử với các tác dụng khác nhau để sàng lọc xem thuốc đó có những tác dụng gì? Mức độ tác dụng đó ra sao? Tác dụng là trực tiếp, gián tiếp, cơ chế tác dụng như thế nào?

1.3.3. Sàng lọc cấu trúc nào có tác dụng

Biết một chất A có tác dụng E. Thay đổi cấu trúc chất A theo nhiều cách nhau, sẽ được hàng loạt chất. Sàng lọc xem các chất dẫn xuất từ chất A có tác dụng E không? Tác dụng tăng và tăng bao nhiêu? Tác dụng giảm và giảm bao nhiêu? Hay không còn tác dụng. Rút ra những chất có tác dụng tăng.

1.4. Tiêu chuẩn chọn phương pháp nghiên cứu

- Độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu
- Kết quả phải phỏng lại được, phương pháp phải phát hiện được tác dụng định nghiên cứu.
- Phương pháp phải đáp ứng được với dạng thuốc nghiên cứu
 - + Thuốc tinh khiết thường đáp ứng được mọi phương pháp nghiên cứu.
 - + Thuốc bán tinh chế
 - + Thuốc chiết thành nhóm (alcaloid, glycosid...)
 - + Phân đoạn chiết (phân đoạn chiết với cloroform, ethylacetat, *n* - hexan, cồn, nước...)
 - + Cao thuốc
 - ...
- Phương pháp dung nạp được nhiều loại dung môi khác nhau, thậm chí hỗn dịch. Ví dụ, hỗn dịch thì không thể tiêm được, nhưng có thể uống.
- Phương pháp cung cấp được thông tin dược lý chính và các tác dụng khác.
- Cần có thuốc để tham chiếu cho tác dụng đó. Ví dụ, tác dụng hạ sốt dùng paracetamol.

1.5. Tiêu bản thử (đối tượng thử)

- Động vật thử nghiệm:
 - + Tùy theo nghiên cứu tác dụng gì mà dùng loại động vật thí nghiệm thích hợp, nhạy cảm với tác dụng định nghiên cứu, như chuột nhắt trắng, chuột cống trắng, chuột lang, thỏ, chó, khỉ. Có khi dùng chuột hamster, chim bồ câu, gà, cá...
 - + Bình thường phải dùng động vật thí nghiệm khỏe mạnh, trưởng thành, không có thai, không đang nuôi con bú. Nhưng có thí nghiệm lại phải dùng động vật còn non, động vật có thai hoặc đang nuôi con bú (Ví dụ, phải thử tác dụng của thuốc trên các giai đoạn này của con vật).
 - + Ghi rõ chủng loại, giới tính, độ tuổi, khối lượng, điều kiện nuôi động vật thí nghiệm.
 - + Thử trên con vật không gây mê hoặc con vật gây mê.
 - + Mô hình bệnh tật: Trong hầu hết các trường hợp, muốn nghiên cứu tác dụng gì, phải gây bệnh cho con vật có trạng thái bệnh lý tương tự như ở người. Ví dụ: Muốn nghiên cứu tác dụng hạ sốt, phải gây sốt cho con vật, ví dụ gây sốt cho chuột cống trắng bằng men bia.

Muốn nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch, phải gây suy giảm miễn dịch, ví dụ, gây suy giảm miễn dịch ở chuột nhắt trắng bằng cyclophosphamid. Muốn nghiên cứu tác dụng chống tăng cholesterol huyết, phải gây tăng cholesterol huyết, ví dụ gây tăng cholesterol huyết cho thỏ bằng triton (gây tăng cholesterol nội sinh) hoặc cho thỏ ăn liều cao cholesterol cùng với thức ăn (gây tăng cholesterol ngoại sinh).

- + Có thể dùng các con vật bị khiếm khuyết di truyền, tức là có trạng thái bệnh bẩm sinh. Ví dụ, người ta đã tạo ra được chủng chuột cống trắng bị tăng huyết áp bẩm sinh, tăng glucose huyết bẩm sinh, bị bệnh tự miễn bẩm sinh...
- Cơ quan cô lập: tim, ruột, động mạch, tử cung.
- Máu hoặc thành phần của máu (bạch cầu, tế bào lymphô, hồng cầu...)
- Phôi gà: khi nghiên cứu virus.
- Tế bào: tế bào gan, tế bào đảo Langerhans của tụy...
- Tế bào đã dòng hóa: tế bào ung thư.
- Nghiên cứu *in vitro*: Nuôi cấy tế bào hoặc mô ngoài cơ thể; nuôi cấy vi khuẩn, nấm; nuôi cấy các cấu tử là thành phần của tế bào.

1.6. Vấn đề liều thử, nồng độ thử, lô thử

- Tùy thuốc có tác dụng mạnh hoặc yếu. Thuốc có tác dụng mạnh, dùng liều hoặc nồng độ thấp; thuốc có tác dụng yếu, dùng liều hoặc nồng độ cao.
- Số liều dùng tùy ý người nghiên cứu. Nếu có điều kiện, dùng 3 liều khác nhau, liều thấp, liều trung bình và liều cao. Các liều thường hơn kém nhau 2 lần.
- Mỗi liều phải dùng một lô, kèm thêm một lô đối chứng âm (không dùng thuốc) và một lô đối chứng dương (dùng một thuốc đã biết có tác dụng đó để tham chiếu).
- Dựa vào liều dùng ở người, dự tính ra liều dùng trên động vật (xin xem "Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm", tạp chí Dược học 2001, số 2 và số 3).

Ví dụ: Một loại dược liệu dùng cho người là 30 g. Gọi người có khối lượng trung bình 50 kg, thì liều tính theo 1 kg cân nặng ở người là 0,6 g/kg. Nếu thử trên chuột nhắt trắng (liều trên chuột nhắt phải gấp 12 lần liều dùng cho người nếu tính theo 1 kg cân nặng) thì liều dùng theo 1 kg cân nặng sẽ là 7,2 g/kg. Còn nếu thử trên chó, thì chỉ dùng liều là 1,2 g/kg (liều của chó thường dùng gấp đôi liều dùng cho người tính theo 1 kg cân nặng). Cần tham khảo tài liệu trên ở tạp chí Dược học 2001, số 2 và số 3. Cách tính như trên thường là đúng trên đa số các trường hợp, nhưng cần chú ý vẫn có những ngoại lệ.

Liều tính như trên là liều trung bình. Nếu có điều kiện dùng 3 liều khác nhau, thì dùng một liều bằng nửa liều đó và một liều gấp đôi.

- Nếu là thuốc chưa dùng cho người (mới nghiên cứu), thì phải tự ý suy xét, dựa vào tầm nhìn và kinh nghiệm của người nghiên cứu. Nếu xác định được LD_{50} thì liều dùng thường xoay quanh $1/5 - 1/10$ của liều LD_{50} (xin xem sách "Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc", 1996, NXB Y học).

1.7. Một số quan niệm về liều dùng ở động vật thí nghiệm

- Nói chung, liều dùng có ảnh hưởng đến mức độ tác dụng và thời gian tác dụng.
- Ở liều cao, tất cả các thuốc đều gây độc (muối ăn, dầu mỡ dùng liều cao cũng độc). Có thuốc, cho uống đến liều tối đa có thể cho uống được, nhưng con vật không chết. Nhưng tiêm thì có thể chết. Chết ở đây, có

thể là do thuốc, nhưng cũng có thể là do thuốc không tinh khiết, thuốc có nhiều tạp chất, hoặc do dung môi pha thuốc.

- Mỗi loại thuốc, dựa vào thành phần và tính chất, có thể tiên đoán một phần về tác dụng và độc tính. Người có tầm nhìn và kinh nghiệm sẽ phân xét sát thực tế hơn.
- Đường dùng thuốc (uống, tiêm bắp, tiêm dưới da, tiêm màng bụng, tiêm tĩnh mạch...), nói chung, trong hầu hết các trường hợp gây nên cùng loại tác dụng, nhưng thay đổi khác nhau về mức độ đáp ứng. Về đường dùng thuốc, ít nhất nên dự kiến đường dùng sẽ áp dụng trên người. Ngoài ra, có thể dùng thêm đường dùng khác.

1.8. Các hệ thống phương pháp thử nghiệm sàng lọc được lý

Tác dụng	Phương pháp thử
1. Kháng virus	1. Virus bệnh <i>Ranikhet</i> , thử <i>in vivo</i> trên màng đệm niệu nang (chorioallantoic membrane, CAM), đơn lớp nguyên bào sợi phôi gà (chick embryo fibroblast monolayer, CEF). 2. Virus bệnh đậu bò (<i>Vaccinia virus</i>) trên CAM và CEF 3. Virus rừng <i>Semliki</i> (thử <i>in vivo</i> ở chuột nhắt trắng) 4. Virus gây viêm não - cơ tim (thử <i>in vivo</i> ở chuột nhắt trắng) 5. Virus viêm não Nhật Bản (thử <i>in vivo</i> ở chuột nhắt trắng) 6. Virus <i>Herpes simplex</i> 7. Các chất gây cảm ứng interferon (ở chuột nhắt trắng)
2. Kháng khuẩn (<i>in vitro</i>)	1. <i>Streptococcus faecalis</i> 2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 3. <i>Mycobacterium leprae</i> (<i>in vivo</i> , chuột nhắt trắng) 4. <i>M. tuberculosis</i> 5. <i>Staphylococcus aureus</i> 6. <i>Salmonella typhi</i> 7. <i>Escherichia coli</i> 8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9. <i>Bacillus subtilis</i>

3. Kháng nấm (<i>in vivo</i> và <i>in vitro</i>)	1. <i>Candida albicans</i> 2. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> 3. <i>Aspergillus fumigatus</i> 4. <i>Cryptococcus neoformans</i> 5. <i>Sporotrichum schenckii</i>
4. Kháng đơn bào	A. Kháng amíp 1. <i>Entamoeba histolytica</i> - Môi trường không có ngoại vật <i>in vitro</i> - Thử trên ruột chuột cống trắng - Thử trên gan chuột cống trắng B. Kháng sốt rét 1. Diệt thể liệt sinh ở máu - <i>In vitro</i>: <i>Plasmodium falciparum</i> - <i>In vivo</i>: + <i>P. berghei</i> (chuột nhắt trắng, chuột cống trắng, mastomys) + <i>P. yoelli</i> (chuột nhắt trắng) + <i>P. knowlesi</i> (khỉ) 2. Phòng ngừa nguyên nhân (chuột nhắt trắng, mastomys, khỉ) 3. Chống tái phát (khỉ) C. Kháng Leishmania 1. <i>Leishmania donovani</i> (<i>in vitro</i> và <i>in vivo</i>) D. Kháng Giardia 1. <i>Giardia lamblia</i> (<i>in vitro</i> và <i>in vivo</i>)
5. Chống giun sán	A. Giun chỉ 1. <i>Litomosoides carinii</i> (cotton rat, mastomys) 2. <i>Brugia malayi</i> (mèo, mastomys) 3. <i>Acanthocheilium viteae</i> (mastomys) B. Giun móc 1. <i>Ancylostoma ceylanicum</i> (chuột cống trắng, chuột hamster) C. Sán dây 1. <i>Hymenolepis nana</i> (chuột nhắt trắng, chuột cống trắng)
6. Chống ung thư	Thử trên các dòng tế bào ung thư

7. Chống sinh sản	A. Nữ giới 1. <i>In vivo</i> - Chống làm tổ (chuột cống trắng, chuột hamster) - Sảy thai (chuột cống trắng) - Độc với phôi (chuột cống trắng) - Thúc đẻ (oxytocic, mèo) 2. <i>In vitro</i> - Sảy thai (co bóp tử cung chuột cống trắng) B. Nam giới 1. Chống sinh tinh trùng (chuột cống trắng) 2. Diệt tinh trùng (<i>in vitro</i>) 3. Đông tinh dịch (<i>in vitro</i>)
8. Hạ glucose huyết	- Thỏ - Chuột cống trắng - Chuột nhắt trắng
9. Hạ lipid huyết	A. Hạ lipid <i>in vivo</i>: (chuột cống trắng, thỏ, khỉ) Cholesterol, triglycerid, lipoprotein huyết thanh ở con vật bình thường và con vật bị tăng do triton, hoặc ăn nhiều chất mỡ, hoặc ăn nhiều cholesterol. B. Sinh tổng hợp cholesterol <i>in vitro</i>: Dùng lát cắt gan chuột cống trắng. C. Ưc chế kết tụ tiểu cầu: <i>in vitro</i> và <i>in vivo</i>
10. Hệ thần kinh trung ương	1. Tác dụng trên hành vi (chuột nhắt trắng, chuột cống trắng) 2. Tác dụng trên thân nhiệt 3. Giảm đau 4. Chống co giật (co giật do sốc điện trên ngưỡng, do strychnin, do metrazol...) 5. Tăng cường hoặc đối kháng với barbiturat (trên thời gian ngủ) 6. Tăng hoạt động và độc tính do amphetamin 7. Kháng reserpin 8. Đau do phenylquinon 9. Trục quay 10. Học và nhớ phản xạ 11. Đáp ứng lẩn tránh có điều kiện

11. Tim mạch và hệ tự động	Thường thử trên chuột cống trắng, mèo, chó 1. Huyết áp 2. Điện tim đồ và nhịp tim 3. Hô hấp 4. Tác dụng trợ tim 5. Loạn nhịp tim do dòng điện, do $BaCl_2$, do aconitin.. 6. Thử trên tim cô lập thỏ 7. Thử trên tâm nhĩ cô lập (chuột lang)
12. Chống viêm	1. Phù chân chuột do carragenin 2. Phù chân chuột do cao lạnh và tác nhân khác 3. U nang thực nghiệm 4. U hạt thực nghiệm do hạt bông, do amian 5. Viêm khớp do adjuvant 6. Chỉ số sinh loét ở chuột cống trắng
13. Lợi niệu	Thường thử trên chuột cống trắng
14. Chống co thắt	Hồi tràng chuột lang cô lập
15. Dẫn truyền thần kinh - cơ	Thử trên mèo
16. Chống dị ứng	1. Phản ứng phản vệ da bị động (chuột nhắt trắng, chuột cống trắng) 2. Ngưng kết hồng cầu (chuột nhắt) 3. Miễn dịch trung gian tế bào
17. Bảo vệ gan	1. Tế bào gan cô lập 2. Tổn thương gan do CCl_4 , thiocetamid và galactosamin (chuột cống trắng)
18. Loét tiêu hóa	Thử trên chuột cống trắng
19. Kích thích miễn dịch	Chuột nhắt trắng, chuột cống trắng
20. Sinh thích ứng	Chuột cống trắng
21. Hàn gắn vết thương	Chuột cống trắng
22. Độc tính cấp	LD_{50} (chuột nhắt trắng, chuột cống trắng)

1.9. Nhận định về kết quả thử sinh học

- Phải đảm bảo tiêu chuẩn hóa các khâu
 - + Nguyên liệu gĩ
 - + Tính đúng của nguyên liệu

- + Cách thu hái đúng
- + Cách chế biến đúng
- + Chiết xuất ra dạng để nghiên cứu
- + Bảo quản dược liệu, bảo quản dạng thuốc chiết ra để thử
- + Các mô hình dược lý để nghiên cứu
- Những yếu tố khác ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu
- Tính tan của nguyên liệu thử nghiệm
 - + Hòa tan trong nước, trong nước muối sinh lý (NMSL).
 - + Hòa trong một ít cồn cho tan, rồi hòa vào nước hoặc NMSL.
 - + Nếu dùng *in vivo* thì có thể nghiền dưới dạng hỗn dịch (có thể thêm 1 - 2% gồm adragant) nhưng không dùng được trong hệ *in vitro*.
- Đường dùng thuốc
 - + Uống
 - + Tiêm dưới da, tiêm bắp, tiêm phúc mạc, tiêm tĩnh mạch...
- Điều kiện thí nghiệm
 - + Nhiệt độ, độ ẩm có ảnh hưởng lớn khi nghiên cứu thuốc lợi niệu, thuốc chống viêm.
 - + Thử *in vitro*, phải chú ý đến nhiệt độ, thành phần môi trường, pH...
- Thay đổi đáp ứng
 - + Trong thử nghiệm sinh học, kết quả có thể thay đổi 5 - 10% là bình thường.
 - + Thay đổi có ý nghĩa khi: bảo quản không tốt nguyên dược liệu, thành phẩm nghiên cứu, nguồn dược liệu thu hái, nơi thu hái, mùa thu hái, cách chiết ra thành phẩm nghiên cứu.

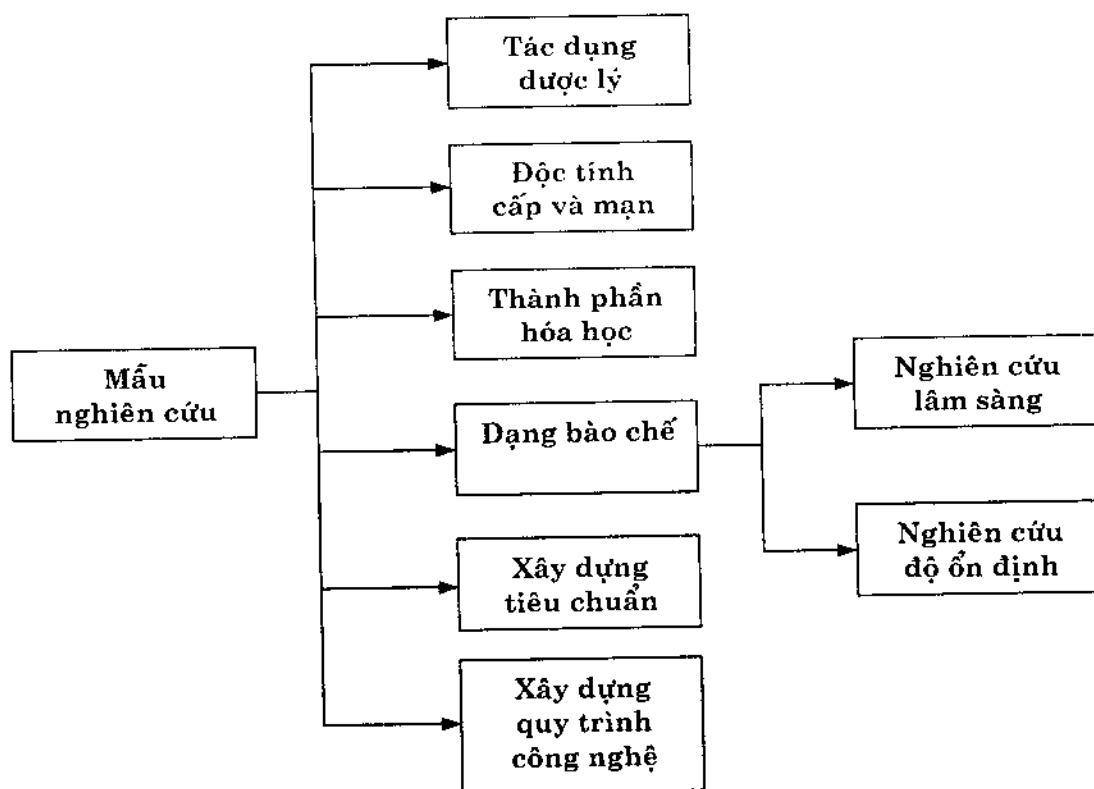
II. PHƯƠNG PHÁP CHUẨN BỊ MẪU SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG DƯỢC LÝ

2.1. Nguyên tắc chung

Yêu cầu: Mẫu nghiên cứu cần đáp ứng một số yêu cầu sau:

1. Mẫu thử sử dụng trong nghiên cứu dược lý phải là mẫu đồng nhất và ổn định, chế tạo theo một phương pháp thống nhất, ngoài việc sử dụng trong tất cả các

lô nghiên cứu về dược lý còn phục vụ cho các bước nghiên cứu tiếp theo như: thành phần hóa học, độc tính cấp và bán mạn, nghiên cứu dạng bào chế, thử lâm sàng, độ ổn định, nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn chất lượng và xây dựng quy trình công nghệ.



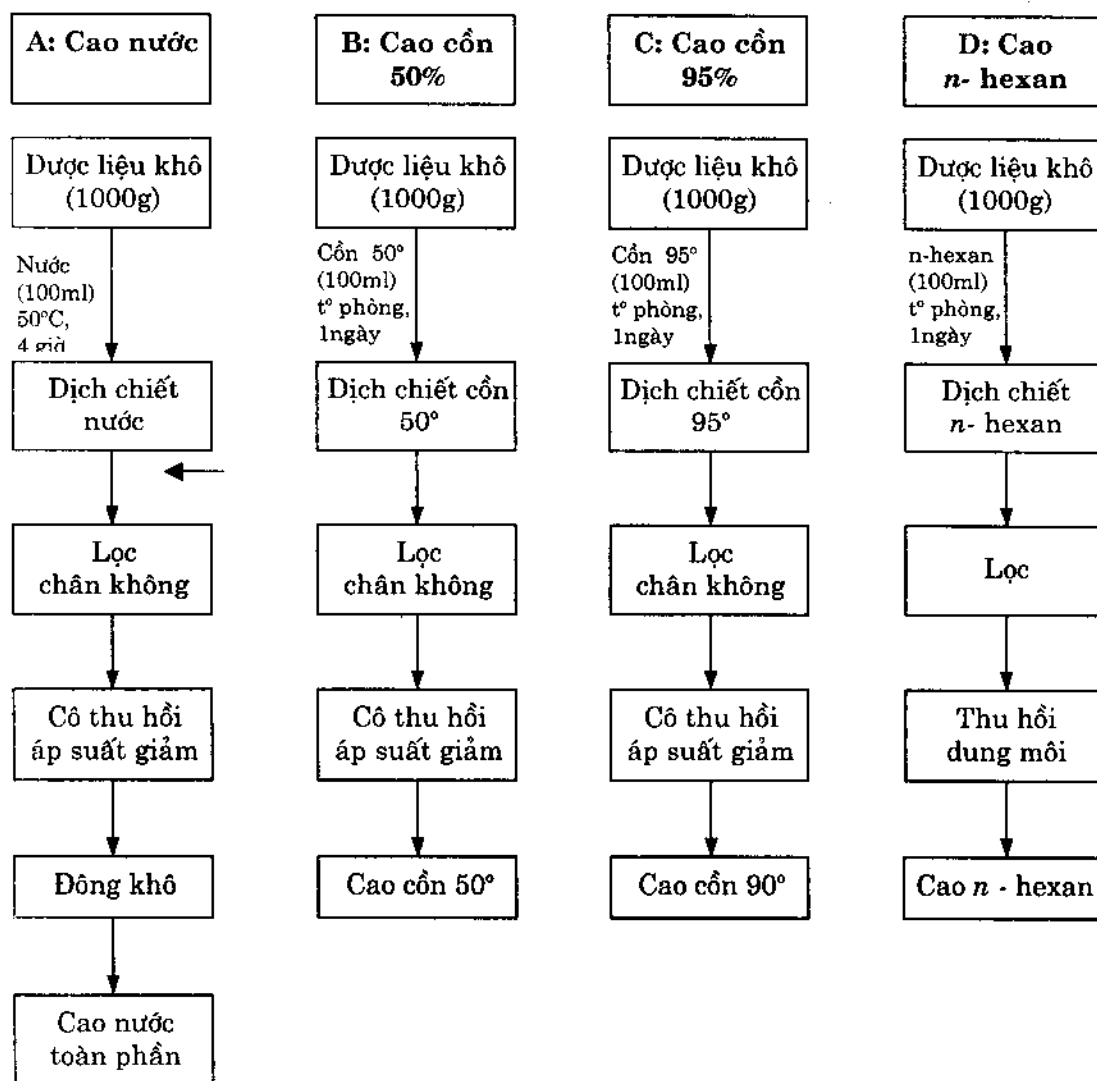
2. Thuận lợi khi đưa ra sản xuất: Tốt nhất là đơn chất hoặc nhóm hoạt chất (alcaloid, flavonoid, glycosid, saponin...). Nếu là dịch chiết hoặc cao toàn phần cần được loại tạp, để dạng bào chế sau này không bị chảy, hút ẩm, liều sử dụng thích hợp.

3. Dễ bảo quản

4. Hình thức đẹp ở mức độ cho phép

2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu phục vụ nghiên cứu sàng lọc tác dụng dược lý

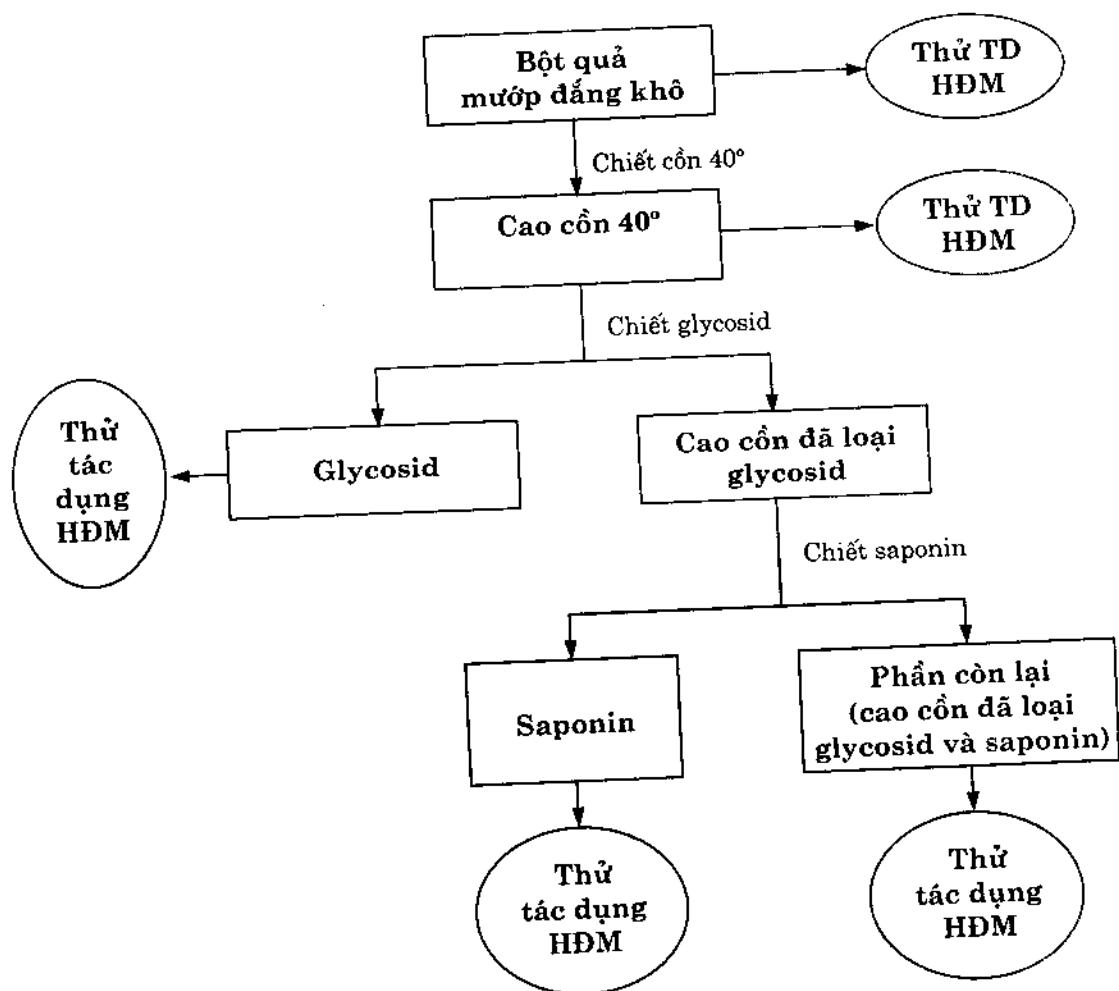
Có nhiều phương pháp chuẩn bị mẫu phục vụ nghiên cứu sàng lọc, tùy thuộc mục đích sử dụng. Song đa phần thường áp dụng theo nguyên tắc sau: Từng dược liệu chiết bằng 4 dung môi có độ phân cực khác nhau: lấy 4 phân đoạn phục vụ nghiên cứu sàng lọc về tác dụng dược lý.



2.3. Phương pháp chuẩn bị mẫu thử tác dụng sơ bộ để xác định nhóm hoạt chất trong một cây thuốc

Tham khảo phương pháp chuẩn bị mẫu nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của Viện Dược liệu đã áp dụng trên quả mướp đắng.

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH NHÓM HOẠT CHẤT



2.4. Thử dược lý để xác định nhóm hoạt chất của bài thuốc

Tham khảo phương pháp sau: Bài thuốc tiêu phong nhuận gan

- | | | |
|-------------------|---------------|-------------------|
| 1. Muồng trâu | 8. Lá dâu tằm | 15. Kim ngân hoa |
| 2. Rau má | 9. Hoàng đằng | 16. Lạc tiên |
| 3. Rau đắng biển | 10. Actisô | 17. Vông nem |
| 4. Nghệ vàng | 11. Bèo cái | 18. Cỏ mần trầu |
| 5. Hương phụ | 12. Dứa gai | 19. Mướp gai |
| 6. Chi tử | 13. Cỏ mực | 20. Quao nước |
| 7. Xuyên tâm liên | 14. Ô rô | 21. Bạch biển đậu |

Trong đó, đóng vai trò vị **Quân**: muồng trâu, rau má; **Thần**: xuyên tâm liên, chi tử; **Tá**: bèo cái, dưa gai, cỏ mực, ô rô, kim ngân; **Sứ**: quao nước, bạch biển đậu...

Để nghiên cứu phương thuốc, các tác giả đã chia làm hai bước:

Bước 1: Phân chia các vị thuốc theo nhóm hóa học, như các vị chứa alcaloid, flavonoid, saponin, anthraquinon... Độ tan của chúng trong dung môi nước cồn để chiết xuất. Các mẫu chiết đem thử nghiệm tác dụng lợi mật và nhuận tràng (mẫu thuốc 1).

Bước 2: Cải tiến phương pháp chế biến, chiết xuất và bào chế, thuốc mới (mẫu thuốc 2), sau đó thử nghiệm được lý.

Kết quả bước 1

Nguyên liệu bao gồm 2941,5 g của 21 vị dược liệu tương đương 10.000 viên bao đường. Đã được phân chia làm ba nhóm:

- 320 g bạch biển đậu, không xử lý sử dụng như tá dược độn.
- Quy trình chiết xuất cao cồn, gồm 4 dược liệu, khối lượng 705,9 g, hiệu suất chiết 10%, tương đương 70 g cao khô.
- Quy trình chiết xuất cao nước, gồm 16 dược liệu, khối lượng 1915,6 g, hiệu suất chiết 11,35%, tương đương 217,42 g cao khô.

Nhận xét

- Hiệu suất chiết thấp: cao nước mới đạt 73%, cao cồn đạt 50% alcaloid, hiệu suất thấp.
- Dạng bào chế: viên nang và viên bao phim dễ hút ẩm.
- Tác dụng lợi mật tăng 1,91 lần.
- Tác dụng nhuận tràng tăng 1,3 lần.
- Độc tính của thuốc thấp, không xác định được liều LD_{50} .

Kết quả bước 2

1. Dược liệu được chia thành năm nhóm:

- Cao cồn, chiết theo phương pháp ngâm kiệt, gồm 5 dược liệu với lượng 749,4 g.
- Cao nước, chiết theo phương pháp sắc, gồm 12 dược liệu với lượng 1524 g.
- Cao chứa hỗn hợp alcaloid với lượng dược liệu 87 g.

- Cao rau đắng biển, chứa iridoid dễ bị phân hủy, nên được chiết từ dược liệu tươi, thu được 32,7 g cao khô.
- Cao actisô, do dễ bị men phân hủy nhóm hoạt chất cynarin, chiết từ lá tươi hoặc khô đã ổn định hoạt chất, thu được 7,2 g cao khô.

2. Các cao thuốc được tiêu chuẩn hóa, chứa 90% lượng hoạt chất có trong mỗi dược liệu.

- Tác dụng lợi mật cao gấp 3,61 lần ($P < 0,01$).
- Tác dụng nhuận tràng cao gấp 1,5 lần dạng thuốc cũ ($P < 0,01$).
- Tác dụng chống viêm đạt 34,4% ở kháng viêm cấp và 58,3% ở kháng viêm dài ngày so với mẫu đối chứng ($P < 0,01$).
- Liều giảm xuống chỉ còn 12,5% (3 viên/ngày) (81.250 viên bao phim/10.000 viên bao đường)

Nhận xét

Lập công thức bào chế, tạo thành mẫu sử dụng trong nghiên cứu tác dụng dược lý và các nghiên cứu khác:

Công thức: Cho 1.250 viên bao phim, tương đương 10.000 viên bao đường (dạng cũ).

1. Cao cồn	:	100,91 g
2. Cao nước	:	218,70 g
3. Cao alcaloid	:	10,43 g
4. Cao rau đắng biển	:	32,70 g
5. Cao actisô	:	7,20 g
6. Bạch biển đậu	:	Vừa đủ

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dhawan BN., Srimal RC.(1984), The use of Pharmacological Techniques for the Evaluation of natural products, UNESCO, New Delhi.
2. Irwin S. (1962), Drug screening and evaluation procedure, Science, 136: 123-129.
3. Lawrence DR., Bacharach AL. (1964), Evaluation of Drug activities, Academic Press-London.
4. Mantegazza P., Piccinini F. (1966), Methods of Drug Evaluation, North Holland, Amsterdam.
5. Turner RA. (1965), Screening methods in Pharmacology, Academic Press, New York – London.
6. Sharma MI., Chandoke N., Ghatak BJR. (1978), Pharmacological Screening of Indian Medicinal Plants, Ind. J. Exper. Biol., 16: 228-234.

CHƯƠNG 3

NHỮNG THỬ NGHIỆM
TRÊN CÁC CƠ QUAN CÔ LẬP

GS. Đoàn Thị Nhu

MỞ ĐẦU

Những phương pháp thực hiện các thử nghiệm để đo sự co của một cơ quan rất giống nhau, không phụ thuộc vào cơ quan dùng để nghiên cứu. Cơ quan hoặc một phần của cơ quan được lấy ra khỏi con vật vừa bị giết và được treo trong bình đựng dung dịch ngâm mô. Một đầu được cố định vào một cái móc ở đáy bình ngâm, và đầu kia được cố định bằng một cái móc vào một đòn bẩy. Sau đó, đòn bẩy này được tiếp xúc với một máy ghi. Như vậy sẽ ghi được tất cả các sự co và giãn của mô cũng như thời gian co và giãn.

Dung dịch ngâm mô được cung cấp không khí bằng một dòng những bọt nhỏ được phun lên ở gần đáy của bình ngâm. Sự nổi của các bọt lên bề mặt có tác dụng hòa trộn không khí vào dung dịch ngâm. Đôi khi dùng khí oxy hoặc hỗn hợp 95% oxy và 5% carbon dioxide để làm thoáng khí dung dịch ngâm.

Nhiệt độ của dung dịch ngâm được duy trì ở 37°C, tuy rằng các nhiệt độ khác được quy định trong một số thử nghiệm. Những dung dịch thường được dùng nhiều nhất là dung dịch Locke và dung dịch Tyrode. Bình đựng dung dịch ngâm là bình ổn nhiệt. Ống dẫn từ bình chứa dung dịch, (ví dụ dung dịch Tyrode), đi qua những vòng cuộn trong bình ngâm, như vậy dung dịch được sưởi ấm đến nhiệt độ mong muốn trước khi vào bình ngâm. Dung dịch này được cho chảy tự do từ các vòng cuộn, vào trong đáy của bình ngâm mô, và rút ra ngoài qua miệng bình, khi thay dung dịch ngâm bằng dung dịch mới từ bình chứa.

Trong thử nghiệm, có thể có hoạt động co bóp tự nhiên ở mức độ yếu, là những sự co mà không có tác nhân kích thích rõ ràng. Có thể làm mất co bóp tự nhiên này

bằng cách hạ nhiệt độ. Những đoạn ruột từ mọi động vật nhỏ có thể tiếp tục cho đáp ứng trong nhiều giờ, nếu được giữ trong dung dịch Tyrode được thổi không khí vào. Với các đoạn hồi tràng chuột lang, có tương đối ít hoạt động co bóp tự nhiên, trong khi với ruột thỏ, có chuyển động có nhịp quả lắc đều, nghĩa là co và giãn liên tục (Turner, 1965).

I. CÁC PHƯƠNG PHÁP THỬ NGHIỆM TRÊN RUỘT CÔ LẬP

1.1. Thử nghiệm trên hồi tràng chuột lang

Giết một con chuột lang bằng một cú đánh mạnh vào đầu và cắt họng. Mở bụng và khi nâng mạnh tràng về phía trước, sẽ thấy hồi tràng được nối vào phía sau của manh tràng. Chiều dài hồi tràng được lấy đi và đặt trong một đĩa chứa dung dịch Tyrode; thường buộc một sợi chỉ ở đầu (nghĩa là ở đầu tá tràng hoặc ở đầu hồi tràng) để đánh dấu. Cần thận trọng để tránh làm tổn thương cơ ruột. Nên cầm bằng ngón tay hơn là giữ bằng kẹp. Cắt bỏ mạc treo ruột và cắt lấy những đoạn từ chiều dài hồi tràng theo nhu cầu. Mô của ruột có thể đáp ứng với thuốc ngay cả sau khi đã giết động vật 2 hoặc 3 giờ. Nếu động vật không vừa được cho ăn, ruột có thể tương đối sạch để được dùng trực tiếp. Nếu không, cần phải rửa bỏ những chất chứa trong ruột bằng cách đặt một đầu của ruột trên đầu một ống hút chứa dung dịch Tyrode, và bơm nhẹ bằng cách cầm nghiêng ống hút. Tránh bơm dung dịch rửa với áp suất quá cao, vì như vậy sẽ làm tổn thương mô một cách không thể phục hồi được. Điều cũng quan trọng là chỉ rửa ruột ở bên trong khi ruột đã có đủ thời gian để giãn hoàn toàn trong dung dịch Tyrode ở khoảng 37°C (Perry và cộng sự, 1968).

*** Lắp đặt tiêu bản theo phương pháp Magnus (1904)**

Cắt mạc treo ruột từ một đoạn ruột sao cho cơ hoàn toàn tự do, và buộc một sợi chỉ vào mỗi đầu bằng cách đâm một kim từ trong ruột ra ngoài. Không bao giờ để lòng ống ruột bị thắt hẹp lại. Buộc một sợi chỉ vào một cái ghim cố định trong bình ngâm cơ quan và buộc sợi kia vào một đòn bẩy có một đầu nhọn ghi ở phía trước. Đối với hồi tràng chuột lang, tải trọng khoảng 0,5 g và độ phóng to 5 đến 7 lần; đối với bình ngâm mà chiều dài là 5 - 8 cm, và thể tích khoảng 10 ml, chiều dài của đoạn hồi tràng là 2 đến 3 cm khi giãn ra.

Tiêu bản có thể co do đáp ứng với các thuốc tác động trên các hạch đối giao cảm, ở các thụ thể sau hạch của acetylcholin, hoặc ở các thụ thể nào khác trên cơ trơn. Vì hồi tràng chuột lang giãn hoàn toàn dưới tải lượng của nó, nên không thể giãn hơn nữa do đáp ứng với các thuốc tác động trên các thụ thể giao cảm sau hạch;

cũng như thế, vì không có chuyển động tự nhiên của hồi tràng, nên không thể thấy tác dụng ức chế của các thuốc này.

* Tiến hành thử nghiệm thuốc

Những thử nghiệm với tiêu bản này thường được thực hiện ở nhiệt độ 37°C trong dung dịch Tyrode được thổi không khí vào. Những thuốc như acetylcholin hoặc histamin gây một đáp ứng rất nhanh và có thể rửa đi sau 30 giây hoặc ít hơn. Chu kỳ thời gian thích hợp như sau:

0 phút: cho chạy máy ghi chuyển động; 1 phút: cho thuốc vào; 1 phút rửa; ngừng máy ghi chuyển động; 3 phút: cho chạy máy ghi chuyển động.

Đôi khi cần rửa tiêu bản lần thứ hai và kéo dài chu kỳ tới 4 phút, nhưng thường có thể thử nghiệm với chu kỳ ngắn hơn, mặc dù có nguy cơ mô không có đủ thời gian để hồi phục hoàn toàn, đặc biệt khi tác dụng mạnh được gây nên bởi liều trước đó. Tuy rằng hồi tràng chuột lang được chọn vì nó gây một đường cơ bản đều đặn, nhưng có phần nào chuyển động tự nhiên; điều này có khả năng giảm bớt, nếu cho thuốc vào mô ở những khoảng cách thời gian đều hơn là đợi với hy vọng mô tự nó ngừng chuyển động.

Tiêu bản này có thể cho những đáp ứng tương đối đều đặn trong khoảng 30 phút từ khi lắp đặt, đặc biệt nếu cho thuốc ở những khoảng cách thời gian đều nhau.

1.2. Thử nghiệm trên hồng tràng thỏ (*Perry và cộng sự, 1968*)

Bằng một cách tương tự như với chuột lang, lấy hồng tràng từ một con thỏ mới bị giết. Cắt ruột ở một điểm 5 đến 10 cm dưới dạ dày và lấy một đoạn từ đó hướng xuống phía dưới về phía manh tràng. Thường không cần rửa bên trong, một phần vì ruột này rộng hơn ruột chuột lang và một phần vì hoạt động co bóp tự nhiên làm ruột tự nó làm sạch. Đối với ruột thỏ, cần một bình ngâm hơi rộng hơn và thường có thể tích khoảng 20 ml. Độ phóng to nhỏ hơn, thường không quá 5 lần và tải trọng lớn hơn, thường khoảng 1 g, nhưng không lớn đến mức làm cơ giãn hoàn toàn. Các thuốc gây giãn hoặc gây ức chế hoạt động co bóp tự nhiên được thử nghiệm tốt hơn trên hồng tràng thỏ.

Hồng tràng thỏ cô lập được xử lý về cơ bản với cùng cách thức như hồi tràng chuột lang, nhưng vì là đoạn cơ dày hơn nên sẽ tốt hơn nếu thông khí bằng một hỗn hợp 95% oxy và 5% carbon dioxyd thay vì với không khí. Cũng có thể phải rửa thuốc khỏi mô trong thời gian dài hơn. Do đó không thể thử nghiệm với một chu kỳ ngắn dưới 3 phút mà phải kéo dài hơn. Đặc biệt có thể sử dụng lợi thế về chuyển động tự

nhiên của mô này để nghiên cứu tác dụng của các thuốc có tác dụng ức chế hoạt động co bóp như adrenalin.

1.3. Thử nghiệm trên hồng tràng chuột cống trắng (*Van Rossum và Ariens, 1959*)

Thử nghiệm này được dùng để nghiên cứu tác dụng kiểu muscarin. Hồng tràng chuột cống trắng có lợi thế hơn hồi tràng chuột lang ở chỗ nó chỉ cho những đáp ứng yếu với các thuốc kích thích hạch như nicotin. Một đoạn hồng tràng dài khoảng 2 cm được lấy từ một chuột cống trắng bị giết bằng một cú đánh mạnh vào đầu và cắt hòng, và được rửa trong dung dịch Tyrode. Nó được treo trong một bình ngâm chứa 10 ml dung dịch Tyrode ở 37°C và được thổi bọt không khí vào.

Các đáp ứng với các thuốc kiểu muscarin cho vào được ghi bằng một đòn bẩy trên máy ghi. Trong thử nghiệm này, đáp ứng với acetylcholin hoặc một chất chuẩn khác được xen kẽ với đáp ứng của thuốc thử.

1.4. Thử nghiệm trên tá tràng chuột cống trắng

Tiêu bản này khác với phần lớn những tiêu bản cơ quan cô lập khác ở chỗ đo sự giãn thay vì đo sự co, được dùng để phát hiện và đánh giá các kinin trong đó có các peptid đã được nghiên cứu về hóa học.

Một đoạn tá tràng 3 cm ở phía gần lấy từ một chuột cống trắng cân nặng 150 đến 250 g được treo trong một bình ngâm 10 đến 15 ml chứa dung dịch de Jalon được cho thêm atropin (1 mg/lít) ở 30 đến 31°C (Horton, 1959). Mô được bảo quản ở 4 đến 6°C trong 2 đến 3 giờ, vì sự bảo quản này tác động tốt đối với khả năng đáp ứng của mô. Dùng độ phóng to 15 lần với đòn bẩy ghi, mà lực căng là 0,5 g, đối với phần lớn các đoạn tá tràng. Chu kỳ thử nghiệm mỗi liều là 3 hoặc 4 phút với thời gian tiếp xúc 30 giây. Dung dịch được rửa bỏ bằng di chuyển lên trên và tràn ra ngoài.

Tá tràng cô lập giãn ra khi có mặt nồng độ thấp của kinin huyết tương và kinin nước tiểu. Vasopressin và oxytocin cũng gây giãn khi cho các liều lớn. Acetylcholin và serotonin gây co. Để nhận dạng một kinin, cần thực hiện xác định song song trên tử cung chuột cống trắng, đã được xử lý trước với stilbestrol.

1.5. Thử nghiệm trên hồi tràng chuột cống trắng

Một đoạn dài 3 cm từ phần cuối hồi tràng của một chuột cống trắng để nhin đói, cân nặng 150 đến 250 g, được treo trong một bình ngâm mô có thể tích 10

ml (Gaddum và Horton, 1959). Dung dịch nuôi là dung dịch de Jalon ở 31°C , được cho thêm atropin với 1 mg/ml. Chu kỳ thử nghiệm mỗi liều là 5 đến 10 phút, tùy theo mức độ nhanh của đáp ứng. Thời gian tác động của thuốc thử nghiệm là 40 đến 90 giây.

1.6. Thử nghiệm trên kết tràng chuột cống trắng

Một đoạn của kết tràng lên, dài 3 cm, được lấy từ một chuột cống trắng cân nặng 150 đến 250 g (Gaddum và Horton, 1959), được treo trong một bình ngâm mô có thể tích 10 ml. Trong dung dịch de Jalon ở 25°C , hoạt động co bóp tự nhiên giảm xuống dưới mức co bóp ở nhiệt độ cao hơn, nhưng vẫn còn tồn tại. Chu kỳ thử nghiệm mỗi liều là 3 hoặc 4 phút, với thời gian tiếp xúc 40 đến 60 giây (Gaddum và Horton, 1959).

II. CÁC THỬ NGHIỆM TRÊN CÁC CƠ QUAN CÓ CƠ TRƠN KHÁC

2.1. Thử nghiệm trên mảnh dạ dày chuột cống trắng (Vane, 1957)

Giết một chuột cống trắng bằng một cú đánh mạnh vào đầu, cắt họng và mở bụng. Có thể nhận biết dễ dàng phần đáy của dạ dày vì nó có màu xám, trong khi phần môn vị có màu hồng. Cắt lấy phần đáy, mở theo chiều dọc, đặt trong một đĩa chứa dung dịch Krebs và làm thành một mảnh dài khoảng 4 hoặc 5 cm bằng các nhát cắt ngang thích hợp.

Buộc một sợi chỉ vào mỗi đầu và lắp tiêu bản trong dung dịch Krebs ở 37°C , được thông khí với hỗn hợp 95% oxy và 5% carbon dioxyd. Bình ngâm mô tương đối dài (8 – 10 cm) nhưng có thể hẹp, sao cho thể tích vẫn có thể nhỏ (5 – 10 ml). Buộc một đầu của mảnh dạ dày vào một cái ghim cố định trong bình ngâm và đầu kia vào một đòn bẩy ghi ở mặt trước của máy ghi. Nên dùng một đòn bẩy tăng trương lực mà tải trọng tăng lên khi cơ co ngán lại. Tải trọng ở vị trí nằm ngang thường khoảng 1 g, và thường dùng độ phóng to 5 đến 7 lần. Cơ không giãn một cách tự nhiên sau khi được làm co cho nên phải được căng ra, để giúp cho sự phục hồi, bằng cách cho thêm 1 g vào tải trọng. Phải để tiêu bản trong 30 phút để giãn ra trước khi dùng.

Vì mô co chậm nên cần thử nghiệm với chu kỳ thời gian dài như sau: 0 phút: cho chạy máy ghi; 1 phút: cho thuốc vào; 2 phút rửa: cho ngừng máy ghi, rửa tiêu bản và cho thêm tải trọng phụ; 6 phút: bỏ tải trọng phụ ra và cho chạy máy ghi.

Do đó khoảng cách thời gian giữa các liều là 6 phút. Đôi khi mô chỉ phục hồi chậm sau khi kéo căng nên khó có một đường cơ bản đều đặn. Trong trường hợp đó, không kéo căng tiêu bản trong thời gian dài tới 3 phút rưỡi mà để phục hồi trong thời gian lâu hơn mà không kéo căng, ví dụ kéo căng tiêu bản trong 2 phút rồi để trong 5 phút rưỡi để phục hồi, như vậy khoảng cách thời gian giữa các liều cho vào là 10 phút.

2.2. Thử nghiệm trên tử cung chuột cống trắng (*De Jalon và cộng sự, 1945*)

Độ nhạy cảm của tử cung phụ thuộc vào tình trạng của cơ quan này. Trong thử nghiệm này, dùng chuột cống trắng non, cân nặng 120 đến 150 g và đang trong thời kỳ động dục. Có thể gây động dục cho chuột bằng cách tiêm dưới da, 24 giờ trước, một liều stilboestrol 0,1 mg/kg (0,6 – 0,75 ml/một chuột của dung dịch 20 µg/ml trong ethanol).

Giết chuột và mở bụng. Cắt lấy 2 sừng tử cung và để vào một đĩa chứa dung dịch De Jalon, tương tự như dung dịch Locke nhưng chứa nồng độ thấp ion calci. Tách rời hai sừng tử cung và cắt bỏ mỡ và cắt mở mỗi sừng tử cung theo chiều dọc, sao cho tiêu bản là một dải cơ, thay vì một ống hẹp. Thường cắt tiếp mỗi sừng theo chiều dọc, và như vậy có được 4 dải cơ tử cung từ một chuột. Buộc một sợi chỉ vào mỗi đầu của mỗi dải cơ và lắp tiêu bản trong dung dịch De Jalon được thông khí với 95% oxy và 5% carbon dioxyd. Buộc một sợi chỉ vào một cái ghim cố định và sợi chỉ kia và một đòn bẩy có gắn một đầu nhọn để ghi ở phía trước. Tải trọng trên đòn bẩy khoảng 0,5 g và độ phóng to khoảng 5 lần. Bình ngâm tương tự như bình dùng cho hồi tràng chuột lang, dài 5 - 8 cm và có thể tích khoảng 10 ml. Nhiệt độ thường ở giữa 30 và 32°C. Tiêu bản thường cần 15 - 30 phút để ổn định trước khi đạt được những đáp ứng đều đặn.

Những đáp ứng đạt được với mô này nhanh hơn so với đáp ứng của đáy dạ dày nhưng chậm hơn đáp ứng gây bởi hồi tràng vì có một thời gian tiềm tàng trước khi có đáp ứng. Một điểm khác nữa là đáp ứng thường không duy trì lâu và mô giãn ra một phần trong khi vẫn còn thuốc. Có thể đạt được những đáp ứng nhịp nhàng nếu để thuốc trong thời gian dài; nên tránh những sự co nhịp nhàn, bất cứ tự nhiên hoặc do thuốc gây nên, khi mà nồng độ calci trong dung dịch thấp hơn mức ở trong các dung dịch muối sinh lý khác. Thường tác dụng tối đa được gây nên trong vòng 30 giây nên chu kỳ sau đây là thích hợp: 0 phút, cho chạy máy ghi; 1 phút, cho thuốc vào; 1 phút rưỡi, cho ngừng máy ghi và rửa tiêu bản; 3 phút, cho chạy máy ghi.

2.3. Thử nghiệm trên chuỗi các vòng khí quản chuột lang (*Castillo và De Beer, 1947*)

Giết một chuột lang cân nặng 300 g hoặc hơn bằng một cú đánh mạnh vào đầu và cắt họng ở chỗ gần nhất với đầu có thể được, hoặc bằng một lượng quá mức một thuốc gây mê không kích thích, như oxyd nitơ. Cắt lấy khí quản, đưa vào một đĩa chứa dung dịch Krebs và cắt ngang giữa các khúc sụn, sao cho có một số vòng cơ khí quản.

Buộc một số vòng, thường khoảng 6, vào với nhau bằng chỉ bông, sao cho tạo thành một chuỗi, rồi lắp trong dung dịch Krebs ở 37°C, được thông khí với hỗn hợp 95% oxy và 5% carbon dioxyd. Bình ngâm cơ quan tương đối dài, giống như bình dùng cho dạ dày chuột cống trắng và động mạch chủ thỏ cô lập và thường có thể tích 10 đến 15 ml. Buộc một đầu của chuỗi vào một cái ghim cố định trong bình ngâm và đầu kia vào một đòn bẩy ghi. Tải trọng trên đòn bẩy tương đối nhỏ, 0,2 đến 0,5 g, và độ phóng đại cao, 10 đến 12 lần.

Các đáp ứng thu được với tiêu bản này xuất hiện chậm và kéo dài. Nếu thuốc gây tác dụng mạnh, có thể phải đợi 30 phút trước khi tiêu bản phục hồi hoàn toàn. Tuy nhiên, nếu các liều thuốc được chọn gây tác dụng yếu, có thể dùng chu kỳ 15 phút, trong đó thuốc được để tiếp xúc với mô trong 5 phút.

2.4. Thử nghiệm trên ống dẫn tinh chuột lang (*Leach, 1956*)

Giết một chuột lang dục trưởng thành, lớn bằng một cú đánh mạnh vào đầu và cắt họng. Cô lập ống dẫn tinh một cách cẩn thận mà không làm giãn ra, và đặt trong dung dịch Tyrode, được bơm bọt không khí, ở 37°C. Sau đó treo tiêu bản mô trong một bình ngâm 10 ml chứa dung dịch Tyrode được thông khí. Do các cơ cơ bằng một đòn bẩy mang tải trọng nhẹ, với độ phóng đại 8 lần. Để thuốc tiếp xúc với mô trong 1 phút, sau đó rửa bỏ nước ngâm để làm cho tiêu bản giãn ra. Với epinephrin (adrenalin) là chất chủ vận, đã đạt được những co cơ lớn nhất ở nhiệt độ 32 đến 34°C; với acetylcholin và histamin, ở nhiệt độ 36 đến 38°C.

2.5. Thử nghiệm trên túi tinh chuột cống trắng (*Leitch và cộng sự, 1954*)

Cắt lấy các túi tinh của chuột cống trắng và treo trong dung dịch Ringer - Locke sửa đổi có thành phần như sau (g/lít nước cất):

NaCl:	9,00	MgCl ₂ - 6H ₂ O:	0,005
KCl:	0,42	NaHCO ₃ :	0,50
CaCl ₂ .2H ₂ O:	0,24	Glucose:	0,50

Đầu tiên, cắt bỏ các tuyến đông mà không làm tổn thương các túi tinh. Sau khi cắt bỏ mô bên ngoài, cắt ngang các túi tinh ở xa nơi vào ống tinh.

Một bình ngâm mô 15 ml được dùng cho hai túi tinh. Nhiệt độ là 37,5°C. Bình được thông khí với 95% oxy và 5% carbon dioxyd, và dung dịch Ringer – Locke được cho chảy với tốc độ 100 ml trong 1 phút. Ngừng cho chảy dung dịch khi cho thuốc vào. Mười phút sau khi đặt các túi tinh vào bình ngâm, các liều 30 µg epinephrin, ở những khoảng cách thời gian 6 phút, gây những đáp ứng đều đặn. Tiêu bản này có lợi thế hơn túi tinh chuột lang ở chỗ không cảm ứng với histamin.

2.6. Thử nghiệm trên túi tinh chuột lang (*Brügger, 1945*)

Cơ dọc và cơ vòng của túi tinh chuột lang có sự phân bố thần kinh giao cảm. Dùng chuột lang trưởng thành về sinh dục nặng 450 đến 700 g. Hai ngày trước, cho chuột ăn hoa bia (houblon), như vậy tính dễ bị kích thích của túi tinh sẽ tăng lên và đều hơn. Giết chuột lang bằng một cú đánh mạnh vào đầu và cắt họng, cắt lấy cả hai túi tinh và đặt cẩn thận trong các bình ngâm mô kế nhau, được duy trì ở 38°C. Bình ngâm chứa dung dịch Ringer (pH 7,2 – 7,4). Các cơ cơ được ghi bằng cách hiệu chỉnh một đòn bẩy ghi để có độ phóng đại 5 lần. Trước khi thử nghiệm, để yên các túi tinh trong nửa giờ với một tải trọng thích hợp khoảng 1 đến 2 g. Oxy được bơm thành bọt nhỏ liên tục vào trong dung dịch ngâm mô.

Có thể thử nghiệm các thuốc có tác dụng giống thần kinh giao cảm trên túi tinh chuột lang, nhưng thường sử dụng nhiều hơn để thử các thuốc ức chế thần kinh giao cảm.

III. THỬ NGHIỆM TRÊN CƠ VÂN

3.1. Thử nghiệm trên cơ thẳng bụng ếch cô lập (*Perry và cộng sự, 1968*)

Mặc dù cơ này là cơ vân nhưng không tác động như các cơ vân động tự chủ khác mà đáp ứng với acetylcholin bằng một sự co chậm. Do vậy, đó là một tiêu bản rất có ích để chứng minh tác dụng của các chất phong bế sự dẫn truyền ở đường tiếp thần kinh – cơ bằng cách tác động theo kiểu như một liều quá mức của acetylcholin.

Tiêu bản cơ thẳng bụng ếch thường được lấy từ các loài ếch *Rana temporaria*, *Rana pipiens*, hoặc *Rana esculenta*, nhưng bất cứ loài ếch nào cũng có thể dùng được. Dùng những ếch nhỏ, trọng lượng không quá 50 g. Để ếch trong nhiều tuần ở 4°C mà không cho ăn. Đập cho ếch bất tỉnh và cắt bỏ đầu và phá hủy tủy sống.

Ghim ếch vào tấm ván gỗ. Kẹp bằng một cái kẹp vào da bụng (không phải là cơ bụng) và cắt da từ trên xương ức xuống dưới rồi cắt ngang để bộc lộ toàn bộ bụng ếch. Sẽ nhìn thấy rõ hai cơ thẳng, ở mỗi bên của đường giữa từ đáy của xương ức xuống dưới.

Cắt bỏ xương ức ngay trên mũi ức ở đáy của nó, cắt lấy hai cơ dính vào nó và để vào đĩa chứa dung dịch Ringer cho ếch ở nhiệt độ phòng. Các cơ được cắt chia ra, trừ phi cơ quá nhỏ và buộc chỉ vào đầu và đáy của mỗi mảnh cơ. Một sợi chỉ được buộc vào cái ghim trong bình ngâm cơ quan và sợi chỉ kia vào đòn bẩy. Đối trọng trên đòn bẩy là 0,5 g đến 1 g. Tiêu bản được giữ ở nhiệt độ phòng trong dung dịch Ringer dùng cho ếch được thổi không khí vào.

Dung tích của bình ngâm là 10 - 15 ml. Có thể phải gắn một máy rung để ngăn cản đầu nhọn ghi dính vào giấy và cách thuận tiện là lắp máy bơm không khí cho dung dịch ngâm vào trụ đứng trên đó lắp đòn bẩy ghi. Sau khi cơ được làm co, nó sẽ không giãn một cách nhanh chóng sau khi rửa bỏ thuốc, và phải được căng một cách nhẹ nhàng bằng tăng đối trọng. Thường buộc quả cân 1 g vào đòn bẩy ở cùng khoảng cách từ điểm tựa đòn bẩy như khoảng cách của tiêu bản, nhưng ở bên kia. Có thể tăng hoặc giảm trọng lượng này khi nào cần.

Để tiêu bản căng như vậy trong ít nhất 30 phút, thường để lâu hơn, trước khi bắt đầu thí nghiệm. Mô có thể hoạt động kéo dài trong 24 đến 48 giờ, hoặc lâu hơn nếu phòng thí nghiệm không quá nóng. Khi cắt chia cơ thẳng bụng của mỗi ếch để được hai tiêu bản không những tiết kiệm hơn mà thường còn tốt hơn vì tránh có một mảnh mô to và dày trong bình ngâm.

Một chu kỳ thao tác thích hợp khi dùng acetylcholin làm chất chủ vận như sau:

0 phút: Nâng quả cân 1 g lên và cho chạy máy ghi; 2 phút: Cho acetylcholin vào; 3 phút rửa: Ngừng máy ghi, rửa cơ và hạ quả cân 1 g xuống; 6 phút: Nâng quả cân 1 g lên và cho chạy máy ghi.

Với chu kỳ này, cứ 6 phút một lần cho một liều acetylcholin, nhưng với các thuốc khác có thể phải để lâu hơn để thuốc tác động và sau đó để rửa hết thuốc. Đối với một số hợp chất có tác dụng kiểu nicotin, chỉ có thể cho một liều cứ 30 phút một lần, để thuốc tác động trong 5 phút, và tiêu bản cần thời gian còn lại để phục hồi.

Vì khó rót đầy bình ngâm cơ quan (10 - 15 ml) một cách thật chính xác tới cùng một mức mỗi lần, nên thay vì cho thuốc vào bình ngâm bằng một ống hút, sẽ tốt hơn nếu pha thuốc chủ vận trong dung dịch Ringer cho ếch và thay dung dịch ngâm với dung dịch này vào thời gian thích hợp. Thể tích của dung dịch ngâm sẽ không quan trọng, với điều kiện là tiêu bản được ngập trong dịch ngâm; nồng độ sẽ được biết một cách chính xác. Vì cơ thẳng bụng ếch là một tiêu bản khỏe và chỉ co chậm,

nên có thể thay dung dịch bằng cách tháo rút và lại đổ đầy bình ngâm, không cần thay dung dịch bằng chảy tràn ra ngoài bình ngâm.

3.2. Tiêu bản dây thần kinh hoành - cơ hoành của chuột cống trắng

Tiêu bản này, được mô tả đầu tiên bởi Büllbring (1946), có thể dùng để nghiên cứu tác dụng của thuốc trên sự co cơ vân của cơ hoành do đáp ứng với kích thích điện dây thần kinh hoành.

Giết một chuột cống trắng bằng một cú đánh mạnh vào đầu; cắt họng và để chảy máu càng nhiều càng tốt vì cần phải để cho ngực không có máu. Loại bỏ lông và da ở giữa ngực. Dây thần kinh hoành trái của động vật để phẫu tích hơn là dây phải và mặc dù có thể phẫu tích cả hai dây thần kinh này, nhưng nên bắt đầu với dây thần kinh hoành trái để có được tối thiểu một tiêu bản có thể hoạt động được.

Tách các cơ từ quanh thành ngực phải về phía sườn bằng cách đưa kéo cùn vào giữa hai sườn và mở rộng ra. Cắt các xương sườn qua sát đáy của xương ức và kiểm tra xem thành ngực có thông ở bên trong; dây thần kinh hoành gắn vào một màng, màng này đôi khi bám chặt vào bên trong thành ngực, và trong trường hợp như vậy, phải làm màng đó bong ra bằng cách nâng thành ngực lên, hoặc chọc nhẹ nhàng với chiếc kẹp cùn mũi. Cắt các xương sườn về phía sườn của động vật. Phần trên của ngực bị loại bỏ hoàn toàn, và có thể nhìn rõ dây thần kinh hoành chạy từ cơ hoành đến tuyến ức. Rạch một đường ở thành bụng ngay dưới cơ hoành và cắt 2 nhát qua cơ hoành và các xương sườn gắn vào cơ này, về phía cột sống, một từ phía trước, và một từ sườn của động vật. Những lát cắt này có thể tạo ra một mảnh cơ hình cái quạt mà đỉnh là chất gân quanh tĩnh mạch chủ, và mảnh cơ này có các rễ của dây thần kinh hoành khoảng 2 – 4 mm từ đỉnh. Nếu mảnh cơ này được nâng lên nhẹ nhàng thì có thể giải phóng dây thần kinh hoành đến tuyến ức. Không cần phải cố gắng phẫu tích để loại bỏ hoàn toàn màng bám vào dây thần kinh. Cắt dây thần kinh ngay dưới tuyến ức và chuyển toàn bộ tiêu bản vào trong một đĩa phẳng chứa dung dịch Krebs.

Buộc một sợi chỉ một cách chắc chắn vào phần gân tạo nên đỉnh của miếng cơ hoành. Buộc một sợi chỉ thứ hai, tốt hơn là có màu khác, vào đầu cắt của dây thần kinh. Chế phẩm sẽ co khi buộc thắt nút. Cắt bỏ màng bám vào dây thần kinh ở gần cơ, sao cho dây thần kinh không còn bị bám dính và không bị kéo khi cơ co. Tiêu bản được nâng lên bởi sợi chỉ buộc vào cơ hoành - mà không phải bởi sợi chỉ buộc vào dây thần kinh - và các xương sườn được xiên vào đỉnh ghim đóng lên. Tiêu bản được hạ thấp một phần vào trong bình ngâm cơ quan và sợi chỉ từ cơ được buộc tạm

thời vào đòn bẩy. Sau đó tiêu bản được treo một cách chắc chắn, một phần ngập trong dịch ngâm, trong khi sợi chỉ buộc vào dây thần kinh, chứ không phải là bản thân dây thần kinh, được xâu qua điện cực. Lúc này hạ thấp hoàn toàn tiêu bản, và dây thần kinh được kéo một cách nhẹ nhàng vào trong điện cực; cần thận trọng nhìn để dây thần kinh không bị căng.

Việc phẫu tích dây thần kinh hoành bên phải phức tạp vì dây này chạy sát cạnh tĩnh mạch chủ và chỉ thu được một đoạn ngắn hơn. Khó tách dây thần kinh khỏi tĩnh mạch chủ và không cần phải cố gắng làm điều này, mặc dù cần phải đảm bảo rằng dây thần kinh sẽ không bị kéo khi cơ co.

Dùng dung dịch ngâm mô là dung dịch Krebs, được thông khí tốt với oxy (95 phần trăm) và carbon dioxyd (5 phần trăm) và thường làm thí nghiệm ở 37°C; ở nhiệt độ này, tiêu bản có thể sống sót trong vài giờ. Các sự co của cơ được ghi với một đòn bẩy có một lò xo nhẹ với một đầu nhọn ghi ngang. Dây thần kinh thường được kích thích với tần số khoảng 12 lần trong một phút bằng các xung sóng hình chữ nhật có thời gian kéo dài khoảng 0,5 phần nghìn giây. Nếu tiêu bản ở tình trạng tốt, người ta sẽ thấy tác dụng của cường độ của kích thích trên cường độ của sự co hầu như là tất cả hoặc không có gì. Những kích thích hết sức nhỏ gây một đáp ứng tối đa, và chỉ có thể đạt được những đáp ứng lớn hơn bằng cách tăng thời gian kéo dài kích thích, điều này gây kích thích nhiều ở một số sợi cơ.

Bình ngâm có đường kính 30 - 40 mm; thể tích dung dịch ngâm thường khoảng 40 ml. Vì các thuốc thường được cho thêm vào bằng ống hút, bình ngâm phải được đổ đầy tới cùng một mức mỗi lần. Sẽ thuận tiện nếu bao giờ cũng đổ đầy bình ngâm đến mức của điện cực trên, điều này bảo đảm là dây thần kinh được giữ ẩm và không có một lượng quá mức dịch trong bình ngâm trong đó liều thuốc bị pha loãng. Tác dụng thường được quan sát thấy trên tiêu bản này là sự phong bế thần kinh cơ và cần sắp đặt chu kỳ thời gian sao cho thuốc có nhiều thời gian để tác động; và thuốc cũng cần có nhiều thời gian để phục hồi. Nếu thuốc cần có 3 phút để gây tác dụng, thì sẽ không thể cho thêm một liều nhiều hơn một lần trong 10 phút, như vậy sau khi ghi sự co bình thường trong 1 phút và tác dụng của thuốc trong 3 phút, sẽ cần để 6 phút để hồi phục sau khi đã rửa sạch thuốc. Nếu để thuốc tác động lâu hơn (5 phút, hoặc 8 phút), có thể dùng những liều thuốc nhỏ hơn và thời gian cần để phục hồi không dài hơn một cách quá mức. Chu kỳ thời gian thí nghiệm như sau:

- | | |
|--------|----------------------------------|
| 0 phút | : Khởi động máy ghi. |
| 1 phút | : Cho thuốc vào. |
| 6 phút | : Ngừng máy ghi và rửa tiêu bản. |

8 phút : Rửa tiêu bản.

10 phút : Khởi động máy ghi.

Nhưng cần phải để thời gian lâu hơn để phục hồi nếu cơ không trở về độ lớn ban đầu.

Các dung dịch muối sinh lý

Các bảng sau đây trình bày thành phần bằng g/lít của những dung dịch muối sinh lý được dùng phổ biến nhất.

Bảng 1. Các dung dịch muối sinh lý dùng ngâm mô, thành phần bằng g/lít (theo Perry và cộng sự, 1968)

	Krebs (1950)	Krebs- Henseleit (1932)	Locke (1901)	Tyrode (1910)	Ringer (1894)	Clark- Ringer cho ếch
NaCl	5,5	6,87	9,0	8,0	9,0	6,5
KCl	0,35	0,4	0,42	0,2	0,42	0,14
MgCl ₂	-	-	-	0,1	-	-
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,11	0,14	-	-	-	-
CaCl ₂	0,28	0,28	0,24	0,2	0,24	0,12
NaH ₂ PO ₄	-	0,14	-	0,05	-	0,01
KH ₂ PO ₄	0,16	-	-	-	-	-
NaHCO ₃	2,1	2,1	0,15	1,0	0,5	0,2
Glucose	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0	2,0
Acid pyruvic	0,27	Chuyển thành muối natri với NaHCO ₃				
Acid fumaric	0,62					
Acid glutamic	0,45					
Khí dùng để thông khí	O ₂ + 5%CO ₂	O ₂ + 5%CO ₂	O ₂	O ₂ hoặc không khí	O ₂ hoặc không khí	Không khí

Bảng 2. Thành phần các dung dịch dùng ngâm các mô (theo Turner, 1965)

Hợp chất	Dung dịch (nồng độ bằng g/lít)						
	Ringer-Locke	Locke	Ringer cho ếch	Tyrode	De Jalon	Mc Ewen	Krebs
NaCl	9,15	9,00	6,50	8,00	9,00	7,60	6,90
KCl	0,42	0,42	0,14	0,20	0,42	0,42	0,35
CaCl ₂	0,24	0,24	0,12	0,20	0,06	0,24	0,28
NaHCO ₃	0,15	0,50	0,20	1,00	0,50	2,10	2,10
MgCl ₂ , 6H ₂ O	-	-	-	0,10	-	-	0,11
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	-	-	0,01	0,05	-	0,142	0,14
Glucose	1,00	1,00	2,00	1,00	0,50	2,00	2,00
Sucrose	-	-	-	-	-	4,50	-

Trong bảng này là dung dịch Krebs-Hensleit, có những sự khác nhau sau đây so với dung dịch Krebs: MgSO₄, 7H₂O thay vì MgCl₂, 6H₂O và KH₂PO₄ thay vì NaH₂PO₄, H₂O.

CHƯƠNG 4

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC GIẢM ĐAU

GS. Đoàn Thị Nhu

MỞ ĐẦU

Các thuốc giảm đau ức chế các phản ứng đối với kích thích có hại. Các thuốc giảm đau được phân biệt với thuốc gây tê, là chất ngăn cản sự dẫn truyền kích thích có hại từ điểm áp dụng đến hệ thần kinh trung ương. Các thuốc giảm đau được chia làm hai loại: (a) các thuốc giảm đau gây ngủ và (b) các thuốc giảm đau không gây ngủ, vì vậy, các phương pháp nghiên cứu dược lý thuốc được chia thành các phương pháp nghiên cứu thuốc giảm đau gây ngủ và các phương pháp nghiên cứu thuốc giảm đau không gây ngủ (Turner, 1965).

Các thuốc giảm đau gây ngủ làm giảm hoặc làm mất các cảm giác đau đớn do tác dụng trên các trung tâm vùng đồi của hệ thần kinh trung ương. Bên cạnh các thuốc giảm đau thiên nhiên: thuốc phiện và các alcaloid phenanthren của thuốc phiện, có các thuốc giảm đau được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp.

Morphin là alcaloid giảm đau điển hình, có tác dụng đặc biệt trên các đau nội tạng. Morphin ức chế vỏ não, là thuốc giảm đau mạnh, làm tăng ngưỡng nhận cảm đau, ở các liều thấp, đối với các đau tự nhiên hoặc đau gây nên, làm mất các phản ứng và làm mất lo lắng do đau. Những tác dụng bất lợi của các alcaloid của thuốc phiện (gây khoái cảm và gây nghiện) hướng việc nghiên cứu tổng hợp những thuốc giảm đau khác.

Các thuốc giảm đau không gây ngủ, ví dụ như natri salicylat và acid acetylsalicylic, làm tăng ngưỡng nhận cảm đau. Các thuốc này có tác dụng yếu hơn nhiều so với morphin, nhưng không gây khoái cảm và không gây nghiện. Chúng tác dụng trên

các hệ cảm thụ ngoại biên, gây ức chế các phản ứng đau đớn ở chó gây bởi tiêm bradykinin vào động mạch lách (Schmitt, 1970).

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC GIẢM ĐAU GÂY NGỦ

1.1. Thử nghiệm kẹp đuôi (*Bianchi và Franceschini, 1954*)

Một nhóm chuột nhắt được tiêm dưới da hoặc tĩnh mạch một liều thuốc thử nghiệm. Ba mươi phút sau, đặt kẹp, làm bằng cách bọc các gọng của một cái kẹp động mạch trong cao su mỏng, vào gốc của đuôi chuột trong 30 giây. Các chuột không được cho thuốc có những cố gắng liên tục để làm bật kẹp ra bằng cách cắn vào kẹp. Các thuốc giảm đau làm cho chuột nhắt trở nên thờ ơ với việc kẹp. Dĩ nhiên cần phải hiệu chỉnh áp lực của việc kẹp sao cho vừa đủ để làm cho tất cả chuột đối chứng đều đáp ứng bằng cố gắng làm bật kẹp ra.

Tỷ lệ phần trăm chuột nhắt trong một nhóm không có cảm giác biểu thị hiệu lực của liều, và có thể tìm thấy liều tác dụng 50% (ED_{50}) bằng cách thử nghiệm với một loạt liều. Đường tiêm dưới da được ưa dùng hơn vì với đường cho thuốc này, độc tính thấp hơn, và hiệu lực giảm đau mạnh hơn. Thử nghiệm này có thể tốt hơn thử nghiệm bản (tắm) nóng, được mô tả ở dưới, vì một kích thích có hại gây bởi nhiệt độ cao ảnh hưởng đến tùy sống ở động vật, trong khi cảm giác đau ở người được trung gian qua vùng đồi và vỏ não. Như vậy nên thử nghiệm tác dụng giảm đau bằng một phương pháp có liên quan với các trung tâm cao cấp của hệ thần kinh.

Phương pháp này được nghiên cứu tiếp bởi Bianchi và David (1960), dùng các chuột nhắt trắng đục. Trong một số thử nghiệm, cho thuốc bằng đường uống, và để chuột nhịn đói qua đêm. Sàng lọc lấy những chuột không đáp ứng bằng thử nghiệm tất cả chuột nhắt với việc kẹp đuôi; loại bỏ các chuột không bắt đầu những cố gắng liên tục để loại bỏ kẹp trong vòng 15 giây. Các chuột nhắt có đáp ứng được thử nghiệm lại ngay trước khi cho các dung dịch nước, 0,5 ml cho 20 g thể trọng.

Sau 30, 60 và 90 phút, lại đặt kẹp. Một đáp ứng giảm đau dương tính được ghi nếu không có cố gắng loại bỏ kẹp trong 15 giây, ở bất cứ lần nào trong 3 lần quan sát. Tính liều ED_{50} .

Liều ED_{50} uống của pethidin hydroclorid là 27 mg/kg. Qua đường tiêm dưới da, morphin hydroclorid, với liều 12,5 mg/kg, gây giảm đau sau 60 phút ở 21/25 chuột nhắt; pethidin hydroclorid tiêm dưới da, gây giảm đau với liều 35,0 mg/kg, ở 10/25 chuột nhắt.

1.2. Sự ép đuôi được đo (*Green và cộng sự., 1951*)

Trong phương pháp này, dùng một giống chuột cống trắng do giao phối thân thuộc sinh ra. Dụng cụ để gây nên một áp lực tăng lên một cách đồng đều trên đuôi chuột cống trắng gồm có hai bơm tiêm, nối các đầu với nhau bằng một ống chất dẻo dễ uốn, không đàn hồi, chứa đầy một chất lỏng. Một nhánh bên của ống được nối với một áp kế. Bơm tiêm thứ nhất được đặt thẳng đứng, đầu hướng lên trên. Đuôi chuột được đặt dưới pittông của bơm tiêm này. Khi áp lực được tác động trên pittông của bơm tiêm thứ hai, áp lực này được truyền qua hệ thống thủy lực đến bơm tiêm thứ nhất và từ đó đến đuôi chuột. Sự ấn xuống đồng đều của bơm tiêm thứ hai như vậy làm tăng áp lực trên đuôi chuột.

Mặt của pittông tiếp xúc với đuôi là một hình tròn có đường kính 25 mm và hơi lõm. Đọc số ghi trên áp kế khi chuột đáp ứng, đầu tiên là cổ vùng ra, sau đó kêu chít chít. Đầu của đuôi là chỗ tốt nhất để đạt đáp ứng nhanh chóng. Để so sánh, lấy các số ghi trên áp kế bằng milimet thủy ngân, ở tư thế nghỉ, đối với chuột đối chứng và chuột được cho morphin hoặc các thuốc giảm đau khác. Dùng một dụng cụ truyền động cơ học thuận tiện để chuyển động bơm tiêm thứ hai sao cho áp lực tăng một cách đồng đều ở 20 mm thủy ngân cho một giây và có thể ngay lập tức thả ra sau đáp ứng kêu chít chít.

Con số trung bình logarit của trị số ngưỡng bằng milimet thủy ngân làm cho chuột kêu chít chít là 57. Con số trung bình logarit đối với một nhóm chuột 30 phút sau khi cho morphin sulfat với liều 3 mg/kg là 151. Khi vẽ sơ đồ logarit của ngưỡng trung bình đối với logarit của liều, người ta được một đường thẳng. Nếu muốn có những kết quả định lượng, dùng các nhóm chuột ở những liều khác nhau. Một con vật được coi là thể hiện sự giảm đau dương tính khi ngưỡng của nó lớn gấp hai lần ngưỡng trung bình của nhóm đối chứng. Liều ED_{50} đối với morphin sulfat cho chuột cống trắng 10 tuần tuổi là 6,9 mg/kg. Liều ED_{50} đối với đáp ứng vùng vẩy cũng tương tự như với đáp ứng kêu chít chít.

Blair và Stephenson (1960) đã sử dụng phương pháp này với thiết kế thử nghiệm chéo nhau. Đo áp lực trên đuôi cần thiết để làm chuột cống trắng kêu chít chít như mô tả ở trên. Một thuốc thử nghiệm được tiêm dưới da vào sườn dưới dạng hòa tan trong 0,2 ml dung dịch NaCl đẳng trương cho 50 g thể trọng. Đo nhắc lại 6 lần ở khoảng cách 10 phút. Tính chỉ số giảm đau bằng cách chia áp lực sau khi tiêm để làm kêu chít chít cho áp lực trước khi tiêm. Con số trung bình của 6 chỉ số được dùng để so sánh. Áp lực cao nhất được dùng là 3 lần trị số đối chứng (trước khi tiêm) trung bình.

Dandiya và Menon (1963a) đã áp dụng phương pháp ép đuôi sửa đổi. Dùng chuột cống trắng cả đực và cái cân nặng 100 – 150 g. Cho đuôi chuột vào một cái kẹp bằng kim khí. Một cái nút làm quay đỉnh vít đẩy tẩm kim khí từ một bên của kẹp sang bên kia, như vậy sẽ ép đuôi chuột vào bên đối diện. Phần này của đuôi (dài 2,5 cm từ đầu của đuôi) được đặt dưới miếng kim khí di động này, và nút được vận cho tới khi miếng kim khí vừa chạm vào bề mặt của đuôi. Sau đó, xác định số vòng các vòng quay tiếp sau cần thiết để gây đáp ứng kêu chút chút. Một dấu trên nút vận giúp đếm chính xác các vòng quay hoàn toàn của đỉnh vít và các vòng quay không hoàn toàn. Các động vật không biểu lộ dấu hiệu về cảm giác đau nào sau khi đã tăng gấp 2 lần (hoặc hơn 2 lần) số vòng trung bình các vòng quay đỉnh vít trước khi cho thuốc được coi là có tác dụng giảm đau đáng kể.

Morphin (1,5 mg/kg) làm tăng số vòng các vòng quay đỉnh vít từ 0,95 (trước khi cho thuốc) lên 1,80 (40 phút sau khi cho thuốc). Đã nhận xét thấy sự giảm đau có ý nghĩa ở 7/20 chuột. Với liều 3 mg/kg, các trị số là 1,0 và 2,55, với 12/20 chuột biểu lộ sự giảm đau (Dandiya và Menon, 1963a).

Liều 1,0 mg/kg morphin được coi là dưới mức gây giảm đau. Cho thuốc an thần cùng với liều dưới mức giảm đau để chứng minh sự tăng tác dụng của morphin. Với liều 10 mg/kg clorpromazin, số vòng quay 40 phút sau khi cho thuốc là 2,0 so với 1,2 trước khi cho thuốc. Với liều 3,0 mg/kg reserpin, các trị số là 0,45 và 0,65.

1.3. Thử nghiệm kích thích bằng nhiệt

Phần lớn các thử nghiệm về đáp ứng đối với kích thích nhiệt bao hàm việc đặt động vật trên một bề mặt nóng hoặc nhúng đuôi trong nước nóng. Kỹ thuật của Janssen và Jageneau (1957) đặc biệt đơn giản và có hiệu quả. Buông rơi nhẹ nhàng chuột nhắt trắng đực cân nặng 20 – 30 g trên một bản nóng, trên đó đặt một ống thủy tinh hình trụ để cầm giữ. Bản nóng được duy trì ở 55° đến 55,5° bằng một bình ngâm bằng đồng chứa một hỗn hợp sôi của các phần bằng nhau của aceton và ethyl format. Thời gian phản ứng là khoảng cách từ lúc chuột được đặt trên bản nóng đến lúc chuột liếm chân hoặc nhảy ra ngoài ống hình trụ. Không để ý đến những dấu hiệu khó chịu khác như đá và nhảy lên của chuột. Dùng những nhóm 6 chuột nhắt trắng.

Đo thời gian phản ứng với sai số 1/5 giây, ở 10 và 5 phút trước khi tiêm dưới da hoặc cho uống thuốc, và ở 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 và 240 phút sau khi tiêm hoặc cho uống. Thể tích dung dịch dùng là 0,1 ml cho 10 g thể trọng. Thời gian "bình thường" là số trung bình của thời gian phản ứng 10 phút và 5 phút trước khi cho thuốc. Đáp ứng là dương tính khi thời gian phản ứng sau khi tiêm thuốc dài

hơn 30 giây ở ít nhất một lần, hoặc khi ba hoặc nhiều hơn số ghi lớn hơn thời gian phản ứng bình thường gấp ít nhất ba lần. Thời gian phản ứng bình thường trung bình cho 10.000 chuột nhất trắng là khoảng 5 giây. Hầu hết các chuột liếm chân trong vòng 10 giây (Janssen và Jageneau, 1957).

Cũng có thể dùng chuột cống trắng một cách tương tự, với một bản nóng lớn (đường kính 26 cm, chiều cao của ống hình trụ 25 cm). Có thể xác định liều ED_{50} là liều thuốc đủ để làm cho 50% động vật thể hiện đáp ứng dương tính ở 30 phút sau khi cho thuốc. Tỷ lệ của các liều ED_{50} của một số thuốc so với ED_{50} của morphin hydroclorid là: methadon hydroclorid, 2,32; và pethidin hydroclorid, 0,43.

Phương pháp bản nóng của Woolfe và Macdonald (1944), được sửa đổi bởi Eddy và Leimbach (1953) là phương pháp thường được dùng. Dùng chuột cống trắng cả hai giống, cân nặng 100 – 150 g. Để chuột trên bản nóng trong thời gian tối đa 30 giây. Những chuột thử thuốc có thời gian phản ứng tăng lên ít nhất hai lần so với thời gian phản ứng trung bình của các chuột đối chứng được coi là biểu hiện sự giảm đau có ý nghĩa.

1.4. Thử nghiệm về sự hợp đồng với thuốc giảm đau

Có thể sử dụng phương pháp bản nóng để chứng minh không những hoạt tính giảm đau mà cả hoạt tính an thần. Một thử nghiệm về sự hợp đồng tác dụng với pethidin đã được Smith (1961) mô tả. Có thể thử nghiệm tất cả các chất có hoạt tính giảm đau, an thần. Smith (1961) cho biết tất cả các thuốc gây trấn tĩnh đều thể hiện hoạt tính dương tính.

Các nhóm 20 chuột được chia thành các phân nhóm 10 con cho mỗi liều trong 3 liều của pethidin: 2,4, và 8 mg/kg. Đối với một liều pethidin, một phân nhóm được cho pethidin đơn độc, một phân nhóm được cho pethidin và thuốc thử nghiệm với liều bằng 25% liều gây chết 50% (LD_{50}). Tỷ lệ phần trăm giảm đau được tính bằng một thử nghiệm về nhiệt.

1.5. Thử nghiệm về sự đối kháng với nalorphin

Thử nghiệm này được thiết kế để chứng minh các tác dụng tương tự morphin của một thuốc. Nalorphin có tác dụng nổi bật là có thể làm mất phần lớn các tác dụng của morphin.

Chuột nhắt, chuột cống trắng, hoặc chó được cho một liều độc của một thuốc, tiếp theo sau là được tiêm tĩnh mạch 0,5 đến 10 mg/kg nalorphin ngay khi quan sát thấy tác dụng tối đa. Một thuốc, là piritramid, gây các đáp ứng: làm mất các phản xạ đứng thẳng lên, phản xạ giác mạc, và phản xạ của loa tai, cũng như nhịp thở

chậm; các tác dụng này đã bị đối kháng trong 1 phút bởi việc tiêm tĩnh mạch 1,25 mg/kg nalorphin (Smith, 1961).

Theo lý thuyết, nalorphin có thể đẩy morphin khỏi các vị trí của thụ thể và như vậy làm mất các tác dụng của morphin. Có thể cho rằng nalorphin cũng có khả năng đối kháng các tác dụng của những thuốc giảm đau khác với cùng cơ chế. Nalorphin với liều 5 mg/kg làm đảo ngược sự giảm đau gây bởi 10 mg/kg morphin. Trong thực tế, tất cả các thuốc giảm đau gây ngủ mạnh đều bị đối kháng bởi nalorphin.

1.6. Thử nghiệm về sự co cứng cơ do oxytocin

Đã nghiên cứu thấy oxytocin, hormon của thùy sau tuyến yên, gây các co tử cung, gây sự "co cứng cơ" ở chuột cống trắng. Đáp ứng co cứng cơ gồm các co bụng, sự căng ra của thân động vật và các chân sau, và sự vận của cơ thể ở hông với sự quay về phía trong của một chân sau. Có thể dự phòng đáp ứng này bằng việc cho trước morphin và các chất có liên quan.

Các chuột cống trắng cái, cân nặng 120 đến 140 g, được cho estrogen bằng cách cấy dưới da một viên nén 15 mg diethylstilbestrol vào bắp đùi của chuột. Sau 10 tuần, ta có các chuột sẵn sàng cho thử nghiệm giảm đau. Thuốc thử nghiệm được tiêm dưới da 15 phút trước khi tiêm vào màng bụng 2 đơn vị oxytocin (một liều ED₅₀). Dùng các nhóm 10 chuột. Xác định tỷ lệ % giảm trong tỷ lệ trường hợp bị co cứng cơ, và đánh giá các trị số ED₅₀.

1.7. Thử nghiệm nhúng đuôi trong nước nóng

Sau khi tiêm vào màng bụng thuốc thử nghiệm, đặt một nhóm 10 chuột nhất trắng trong các túi cá nhân hình nón, làm từ một mảnh giấy cứng hình vuông, được gấp và đóng bằng đinh kẹp để tạo thành một hình nón hoặc hình chóp (Ben - Bassat và cộng sự., 1959). Đuôi chuột thò ra từ một cạnh. Ở những khoảng cách thời gian, giữ chuột sao cho đuôi được nhúng hoàn toàn trong nước ngâm ở nhiệt độ 58°C. Ghi thời gian cho tới khi có phản ứng điển hình - sự giật mạnh đuôi - với mức sai số 1/10 giây. Nhắc lại thử nghiệm cứ 30 phút một lần, bắt đầu 15 phút sau khi tiêm. Thực hiện hai số đọc liên tiếp ở mỗi khoảng cách và ghi số đọc lớn hơn. Số đọc trung bình lớn nhất được lấy để chỉ thời gian của hoạt tính tối đa. Nếu chuột nhất không đáp ứng trong 6 giây, nhắc chuột ra khỏi nước ngâm.

Liều ED₅₀ là liều gây cho 50% động vật không đáp ứng trong vòng 5 giây. Các liều cần thiết của các thuốc để gây thời gian không đáp ứng 5 giây hoặc hơn là: morphin hydroclorid, 5,5 mg/kg; và pethidin hydroclorid, 12,5 mg/kg (Ben-Bassat

và cộng sự., 1959). Một phương pháp tương tự (Janssen và cộng sự., 1963) dùng chuột cống trắng cái non và nước ở nhiệt độ 55°C. Thời gian phản ứng là 1 đến 5 giây khi chuột được cho dung dịch NaCl đẳng trương. Nếu một chuột có thời gian phản ứng 6 giây hoặc dài hơn, hiệu quả giảm đau được coi là dương tính, và tính ED₅₀ cho nhóm 10 chuột. Liều ED₅₀ tiêm dưới da đối với morphin hydroclorid là 3,5 mg/kg; đối với pethidin hydroclorid là 11,0; đối với piritramid là 3,6 mg/kg.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC GIẢM ĐAU KHÔNG GÂY NGỦ

2.1. Thử nghiệm trên sự quặn đau gây bởi hóa chất

Thử nghiệm gây quặn đau có thể là thử nghiệm thường được dùng nhất để khảo sát tác dụng của các thuốc giảm đau không gây ngủ. Trong thử nghiệm gây quặn đau của Koster và cộng sự (1959), dùng chuột nhắt trắng đực cân nặng 18–22 g, gây quặn đau bằng cách tiêm màng bụng cho chuột 0,1 ml dung dịch acid acetic 1% trong nước. Thuốc thử được cho uống hoặc tiêm dưới da 30 phút trước khi tiêm acid acetic cho những nhóm 6 chuột nhắt. Đặt mỗi chuột trong một cốc vại rộng miệng, và đếm số lượng những cơn quặn đau trong từng thời gian 5 phút, và tổng cộng thời gian quan sát và đếm các cơn quặn đau với mỗi chuột là 35 phút. Chuột đối chứng được cho dung dịch NaCl đẳng trương.

2.2. Thử nghiệm đo độ đau ở chân

Phương pháp để đo tác dụng giảm đau này dùng dòng điện làm tác nhân kích thích có hại (Charlier và cộng sự, 1961). Dùng một chuồng cho chuột nhắt mà sàn được làm bằng các dải kim khí nhận dòng điện có điện áp được biết.

Đặt một chuột nhắt trắng trong chuồng, và xác định điện áp tối thiểu của dòng điện làm cho chuột phát ra một tiếng kêu. Ngắt điện áp. Thực hiện việc đo cứ 10 phút một lần trong 1 giờ. Để có kết quả có giá trị thống kê, dùng nhóm chuột 10 con. Sau lần xác định thứ hai hoặc thứ ba, điện áp trung bình trở nên đều đặn ở khoảng 20 vôn. Tiếp sau đó, cho thuốc thử nghiệm cho chuột, và thực hiện xác định cứ 10 phút một lần. Thuốc có tác dụng giảm đau làm tăng điện áp cần thiết để làm chuột phát ra tiếng kêu. Tiếp tục việc xác định cho tới khi trị số điện áp trở về trị số đối chứng.

Vẽ sơ đồ sự khác nhau giữa điện áp trung bình, sau khi cho thuốc và điện áp đều đặn, đối chứng là tung độ, đối lại với thời gian là hoành độ. Đường cong cho

phép sự đánh giá cường độ và thời gian kéo dài tác dụng giảm đau. Diện tích dưới đường cong cho phép đo đồng thời hai tính chất, bằng đơn vị tùy ý quy định

2.3. Thử nghiệm đo độ đau ở trực tràng

Đặt một chuột cống trắng trong một chuồng nhốt nhỏ, có một tấm đồng làm sàn, được nối với một cuộn cảm ứng. Cực thứ hai của cuộn cảm ứng được nối với một điện cực bằng đồng hình trụ được đưa vào trực tràng. Một von kế, nhạy cảm với thay đổi 0,1 von, được nối với các dây dẫn tới cuộn cảm ứng. Điện cực ở trực tràng được cố định tại chỗ bằng cách buộc nó vào đuôi chuột, sau đó được nối dài ra ngoài chuồng. Cách tiến hành và sự tính toán được thực hiện giống như trong thử nghiệm đo độ đau ở chân, đã được mô tả ở trên. Điện áp cần thiết để gây tiếng kêu là 1 đến 2 von (Charlier và cộng sự., 1961).

CHƯƠNG 5

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CHỐNG CƠ GIẬT

PGS. Phạm Duy Mai

MỞ ĐẦU

Trong y học lâm sàng những thuốc chống cơ giật được dùng để khống chế các cơn cơ giật xuất hiện trong bệnh động kinh, nhiễm trùng uốn ván, xuất huyết não, kinh giật và ngộ độc các thuốc gây cơ giật. Thuốc được sử dụng nhiều nhất trong bệnh động kinh thể nhỏ (petit mal), thể lớn (grand mal) và cơn cơ giật tâm thần vận động. Theo lý thuyết thần kinh học thì các cơn động kinh là cơn loạn nhịp não kích phát. Động kinh kèm theo những dấu hiệu không bình thường trên điện não đồ và những cơn động kinh nghiêm trọng có thể gây nên trạng thái mất tri thức. Phần lớn những thí nghiệm dùng để phát hiện tác dụng chống cơ giật của thuốc là dựa trên cơ sở gây nên những cơn giật nhân tạo và ức chế chúng bằng thuốc nghiên cứu. Những hóa chất thường dùng để gây cơ giật gồm có pentylentetrazol, strychnin, tremorin, acid glutamic; ngoài ra người ta còn dùng sốc điện để gây cơ giật. Những thí nghiệm này còn có sử dụng chủ yếu khác là dùng phát hiện các thuốc gây giãn cơ.

1. NGHIỆM PHÁP GÂY CƠ GIẬT BẰNG PENTYLENTETRAZOL

Pentylentetrazol là một thuốc được sử dụng làm chất kích thích thần kinh trung ương. Thuốc còn có tên là metrazol, leptazol, cardiazol và corazol. Liều lượng gây cơ giật thay đổi tùy theo động vật thí nghiệm và đường dùng thuốc. Sau đây giới thiệu một số phương pháp.

1.1. Thí nghiệm về tác dụng chống co giật do pentylentetrazol gây nên trên thỏ

1.1.1. Nguyên lý chung

Tiêm truyền chậm bằng đường tĩnh mạch pentylentetrazol cho thỏ gây nên các cơn giật rung cơ mi mắt và sự xuất hiện trùng khớp với những thay đổi trên điện não đồ. Dùng thuốc cho động vật thí nghiệm những chất có tác dụng chống co giật đã dùng điều trị động kinh thể nhỏ thì có thể bảo vệ động vật hoàn toàn hoặc ở mức độ nhất định đối với hiện tượng trên mà ta có thể xem như giai đoạn đầu của cơn động kinh.

1.1.2. Nguyên liệu, vật tư dùng cho thí nghiệm

Động vật dùng cho thí nghiệm thỏ đực, cân nặng khoảng 2,5 kg. Thuốc pentylentetrazol dùng dung dịch 0,4% trong nước muối sinh lý đã được tiệt trùng. Máy bơm dùng tiêm truyền của hãng Braun - Melsungen. Đồng hồ bấm giây để xác định thời gian tiêm truyền. Bộ dụng cụ tiểu phẫu thuật dùng để cắt da, bóc lộ tĩnh mạch, luồn ống canun tiêm truyền và khâu vết mổ. Thuốc sát trùng thường dùng.

1.1.3. Cách tiến hành thí nghiệm

Thỏ thí nghiệm trong trạng thái tỉnh táo, buộc lên bàn mổ ở tư thế nằm ngửa, tiến hành cạo lông và sát trùng một chân sau của thỏ, dùng kéo kim kẹp rách da vùng đùi, bóc lộ tĩnh mạch hiển (saphena) luồn ống canun vào tĩnh mạch theo chiều hướng tâm, nối kết ống canun với máy bơm tiêm truyền. Dung dịch pentylentetrazol 0,4% được tiêm truyền với tốc độ 1 ml/phút, cho phép ta quan sát đầy đủ những giai đoạn kế tiếp nhau của tác dụng gây co giật như : kích động không yên, đa tiết nước bọt, hàm răng và ria mép cử động, vận động hô hấp tăng, cơn giật rung cơ mi mắt, co dím cơ mi mắt ở một mắt sau đó chuyển sang mắt khác, cơn co giật động kinh gồm các cơn co cứng và giật rung với nghiến răng kèn kẹt, rung rẩy, bài niệu và có thể dẫn tới tử vong.

Đồng hồ bấm giây được khởi động từ khi bắt đầu tiêm truyền dung dịch pentylentetrazol và tiếp tục cho đến khi xuất hiện cơn giật rung cơ mi mắt đầu tiên, trùng khớp với sự xuất hiện trên điện não đồ những sóng chậm và các sóng nhọn là biểu hiện về điện não đồ một trạng thái hoạt động quá mức những trung tâm gây co giật ở gian não, được thừa nhận là có liên quan đến động kinh thể nhỏ.

Tác dụng của pentylentetrazol có thể lặp lại, trên cùng một con vật (thỏ) sau khi tiêm cùng một liều thuốc gây co giật thì các cơn giật rung cơ mi mắt xuất hiện, sau một vài ngày nghỉ có thể tiêm truyền cho thỏ liều thứ hai và từ đó tiến hành so

sánh những cơn giật rung cơ mi mắt trên cùng một con thỏ ở thời điểm trước và sau khi dùng một thuốc bảo vệ có tác dụng chống co giật.

Có một số thỏ ở tình trạng trơ không nhạy cảm với thí nghiệm, không xuất hiện những cơn giật rung cơ mi mắt sau khi tiêm pentylentetrazol, những thỏ này được loại bỏ sau vòng tiêm truyền lần thứ nhất. Những thỏ nhạy cảm được nhốt tách riêng từng con một trong các lồng riêng rẽ trong vòng 3 – 4 ngày, chuồng được tẩy uế thường xuyên để giảm nguy cơ nhiễm trùng cho thỏ.

Lần tiêm truyền thứ hai pentylentetrazol được tiến hành 1 giờ sau khi dùng thuốc nghiên cứu có tác dụng chống co giật. Thuốc được dùng bằng đường uống. Thí nghiệm được tiếp tục theo dõi cho đến khi động vật chết để phát hiện ảnh hưởng của thuốc đối với các tác dụng khác của thuốc gây co giật pentylentetrazol.

1.1.4. Kết quả

Khoảng thời gian tiến hành tiêm truyền để làm xuất hiện cơn giật rung cơ mi mắt trong các điều kiện trên và tiến hành trước khi dùng thuốc nghiên cứu là 12 – 18 phút, tương ứng với liều 20 – 25 mg/kg pentylentetrazol.

Sự tăng liều lượng pentylentetrazol trong liều tiêm truyền lần thứ hai để gây nên sự xuất hiện cơn giật rung cơ mi mắt, hay nói một cách khác, sự tăng ngưỡng tối thiểu gây giật rung cơ mi mắt dưới tác dụng của thuốc nói lên cường độ tác dụng của thuốc.

Đối với mỗi liều lượng thuốc nghiên cứu được tiến hành thí nghiệm trên ít nhất 4 thỏ, lấy trị số trung bình của các liều thí nghiệm. Hoạt tính của thuốc được biểu thị theo công thức sau.

$$\text{Hoạt tính} = \frac{\text{liều trung bình pentylentetrazol (2)} - \text{liều trung bình pentylentetrazol (1)}}{\text{liều trung bình pentylentetrazol (1)}}$$

Liều lượng dùng trong thí nghiệm được biểu thị bằng mg/kg.

Liều trung bình pentylentetrazol (2) là liều gây giật rung đầu tiên cơ mi mắt ở lần tiêm truyền hai.

Liều trung bình pentylentetrazol (1) là liều gây giật rung đầu tiên cơ mi mắt ở lần tiêm truyền đầu.

Dưới đây xin giới thiệu kết quả đạt được của 6 loại thuốc chống co giật được dùng điều trị bệnh động kinh dùng với các liều chọn lọc thích hợp biến thiên theo liều lượng dùng trong lâm sàng.

Thuốc sử dụng	Liều điều trị (mg)	Liều dùng thí nghiệm (mg/kg)	Hoạt tính
Paramethadion-Paradion	300	300	220
Ethosuximid-Zarontin	250	250	118
Natri valproat-Depakin	200	100	54,7
		500	65,5
		1000	210
Phenacemid-Epiclase	300	75	32,4
		50	43,1
		100	58,2
Phenytoin-Di-Hydan	100	100	0
		250	19
Beclamid-Posedrin	330	300	6,4

Phương pháp đề xuất trên cho phép chúng ta dự đoán được tác dụng đối kháng với động kinh thể nhỏ của thuốc vì những thuốc đặc trị bệnh này đều tỏ ra có tác dụng bảo vệ tốt, rõ rệt còn các thuốc như phenytoin và beclamid được sử dụng trong các thể động kinh khác đều chứng tỏ là không có khả năng nâng cao ngưỡng tối thiểu gây giật rung cơ.

1.2. Thí nghiệm về tác dụng chống co giật do pentylentetrazol gây nên trên chuột nhắt trắng

1.2.1. Nguyên lý chung

Dùng pentylentetrazol gây co giật trên chuột nhắt trắng, với các liều lớn nhỏ khác nhau, thuốc gây nên những tỷ lệ co giật khác nhau trong các lô động vật thí nghiệm, từ đó xác định được liều gây co giật 50% (CD_{50}) của pentylentetrazol. Thuốc có tác dụng chống co giật sẽ làm tăng cao liều CD_{50} của pentylentetrazol ở nhóm động vật dùng thuốc thí nghiệm.

1.2.2. Vật liệu, dụng cụ thí nghiệm

Động vật thí nghiệm chuột nhắt trắng có trọng lượng 18 – 22 g, đực cái đều dùng, dung dịch tiêm pentylentetrazol 4‰ (4 phần nghìn) nước muối sinh lý 9‰, bơm tiêm 1 ml.

1.2.3. Tiến hành thí nghiệm

Chia chuột nhắt thành hai nhóm, nhóm 1 dùng làm đối chứng gồm 40 chuột, nhóm 2 dùng thuốc nghiên cứu, ví dụ hoạt chất của thiên ma, cũng gồm 40 chuột.

Nhóm chuột đối chứng cho uống nước muối sinh lý, mỗi chuột 0,5 ml. Nhóm còn lại uống dung dịch thuốc nghiên cứu trong cùng thể tích 0,5 ml. Sau đó 30 phút mỗi nhóm trên lại chia thành 4 lô, mỗi lô được tiêm phúc mạc pentylentetrazol với các liều lớn nhỏ khác nhau để gây nên tỷ lệ co giật khác nhau. Nhóm chuột đối chứng được dùng pentylentetrazol với những liều nhỏ, còn nhóm thí nghiệm thuốc nghiên cứu được dùng pentylentetrazol với những liều lớn, ví dụ, trong thí nghiệm với hoạt chất thiên ma các liều pentylentetrazol dùng cho nhóm đối chứng là 55,4 ; 61,6 ; 68,4; 76,0 mg/kg, còn dùng cho nhóm thuốc nghiên cứu là các liều 68,4 ; 76,0 ; 84,4 ; 93,8 mg/kg. Từ số động vật xuất hiện co giật trong các lô ta tìm được liều gây co giật 50% - CD_{50} của pentylentetrazol trong các nhóm đối chứng và nhóm dùng thuốc nghiên cứu theo phương pháp Kärber (tham khảo chương nghiên cứu độc tính).

So sánh liều CD_{50} ở 2 nhóm, căn cứ mức tăng cao liều CD_{50} ở nhóm dùng thuốc nghiên cứu mà xác định cường độ chống co giật của thuốc.

Ví dụ sau đây là kết quả thí nghiệm chống co giật của thiên ma qua tác dụng tăng cao liều CD_{50} của pentylentetrazol ở nhóm dùng thuốc so với nhóm đối chứng.

Nhóm thí nghiệm	Liều dùng pentylentetrazol	Số chuột mỗi lô	Số chuột co giật	CD_{50} mg/kg	Tỷ lệ tăng cao CD_{50} (%)
Đối chứng					
Lô 1	55,4 mg/kg	10	3	$62,27 \pm 7,14$	
Lô 2	61,6	10	6		
Lô 3	68,4	10	7		
Lô 4	76,0	10	8		
Dùng thiên ma					
Lô 1	68,4	10	2	$84,37 \pm 8,55$	35,5%
Lô 2	76,0	10	3		
Lô 3	84,4	10	6		
Lô 4	93,8	10	7		

Căn cứ theo kết quả thí nghiệm trên, phương pháp thí nghiệm này cho phép ta đánh giá được cường độ chống co giật của thuốc nghiên cứu.

Ngoài ra pentylentetrazol còn dùng cho các thí nghiệm sau đây.

1.3. Thí nghiệm về tác dụng chống co giật do tiêm bắp pentylentetrazol trên chuột cống trắng

1.3.1. Nguyên lý chung

Theo các tác giả Echaque và Lim (1962) thì pentylentetrazol tiêm bắp cho chuột cống trắng với liều 112 mg thì gây co giật rõ rệt. Những thuốc có tác dụng chống co giật thì bảo vệ hoàn toàn động vật thí nghiệm đối với cơn co giật trên.

1.3.2. Vật liệu, dụng cụ thí nghiệm

Chuột cống trắng, dung dịch thuốc nghiên cứu, dung dịch pentylentetrazol 0,5%, bơm tiêm.

1.3.3. Tiến hành thí nghiệm

Dùng chuột đã trưởng thành, tương đối đồng đều nhau, có trọng lượng 180 - 200g. Chuột được chia thành nhiều lô dùng thuốc nghiên cứu và lô chứng.

Thuốc nghiên cứu được dùng bằng đường uống hoặc đường tiêm bắp với những liều lượng đã lựa chọn trước. Thể tích thuốc dùng bằng đường tiêm bắp không quá 0,5 ml cho mỗi chuột và bằng đường uống không quá 5 ml. Lô đối chứng dùng nước muối sinh lý có cùng thể tích và cùng cách thức dùng thuốc như trên. Sau khi dùng thuốc nghiên cứu 45 phút, tiêm pentylentetrazol với liều gây co giật (112 mg/kg) cho toàn bộ chuột trong các lô dùng thuốc và lô đối chứng. Quan sát phản ứng của chuột trong vòng 60 phút, ở những chuột đối chứng chỉ dùng pentylentetrazol đều xuất hiện những cơn co giật đầu tiên ở vùng cơ đầu, cơ mặt sau đến cơ lưng, cơ bụng. Chuột ở các lô dùng thuốc tùy theo liều dùng khác nhau thì tỷ lệ phản ứng cũng khác nhau.

Tác dụng chống co giật của thuốc nghiên cứu được đánh giá bằng khả năng bảo vệ hoàn toàn động vật thí nghiệm, không xuất hiện những cơn co giật trên. Tính tỷ lệ phần trăm (%) số động vật được bảo vệ hoàn toàn ở những lô dùng thuốc nghiên cứu. Từ những số liệu đạt được ta xác định liều lượng có tác dụng bảo vệ được 50% động vật thí nghiệm - ED_{50} bằng phương pháp Tainter (tham khảo chương nghiên cứu độc tính của thuốc). Trong những điều kiện thí nghiệm trên người ta đã xác định được ED_{50} của trimethadion là 318 mg/kg và của phenobarbital là 35 mg/kg. Đây là những số liệu dùng để tham khảo so sánh khi nghiên cứu một thuốc chống co giật mới.

1.4. Nghiên cứu tác dụng chống co giật do tiêm tĩnh mạch pentylentetrazol trên chuột nhắt trắng

1.4.1. Nguyên lý chung

Tương tự như phương pháp nêu trên, tác giả Barnes (1961) dùng phương pháp gây co giật trên chuột nhắt trắng bằng cách tiêm pentylentetrazol qua tĩnh mạch đuôi.

1.4.2. Vật liệu, dụng cụ thí nghiệm

Động vật dùng cho thí nghiệm chuột nhắt trắng đã trưởng thành, có trọng lượng 18 – 22g, bơm tiêm 0,25 ml, kim tiêm số 27, pentylentetrazol pha trong nước dung dịch 0,5%, dung dịch thuốc nghiên cứu chống co giật.

1.4.3. Tiến hành thí nghiệm

Chuột được chia thành nhiều lô tương đối đồng đều nhau, mỗi lô 10 chuột. Trước tiên dùng thuốc nghiên cứu co giật cho chuột bằng đường uống với các liều lớn nhỏ khác nhau. Thể tích dung dịch thuốc cho mỗi chuột uống không quá 1 ml. Lô chuột đối chứng cho uống nước muối sinh lý có cùng thể tích. Sau khi uống thuốc 30 phút thì dùng pentylentetrazol với liều 38 mg/kg bằng đường tiêm tĩnh mạch đuôi. Thể tích dung dịch tiêm pentylentetrazol không được quá 0,25 ml cho mỗi chuột và thời gian tiêm phải hoàn thành trong 4 giây hoặc ít hơn. Sau khi tiêm pentylentetrazol quan sát ngay các cơn co giật xuất hiện trong vòng nửa giây. Chuột xem như được bảo vệ khi một chất nghiên cứu chống co giật cho trước có thể ngăn ngừa sự xuất hiện các cơn co cứng duỗi thẳng hai chân sau của chuột.

1.4.4. Kết quả

Ở lô đối chứng toàn bộ động vật đều xuất hiện cơn co cứng duỗi thẳng hai chân sau. Ở các lô dùng thuốc tùy theo liều dùng khác nhau tỷ lệ động vật được bảo vệ không xuất hiện cơn co cứng được thể hiện ở các mức độ khác nhau.

II. THÍ NGHIỆM VỀ TÁC DỤNG CHỐNG CO GIẬT DO STRYCHNIN GÂY NÊN TRÊN CHUỘT

2.1. Nguyên lý chung

Strychnin kích thích một cách có chọn lọc tủy sống, gây co giật hệ cơ làm ngừng hô hấp dẫn đến tử vong. Theo tác giả Kerley (1961) thì strychnin sulfat tiêm xoang bụng có liều gây chết 99% (LD_{99}) động vật thí nghiệm là 2 mg/kg. Thuốc chống co giật có tác dụng đối kháng với hiện tượng trên, bảo vệ được động vật khỏi tử vong.

2.2. Vật liệu, dụng cụ thí nghiệm

Động vật dùng chuột nhắt trắng, dung dịch strychnin sulfat 0,1 mg/ml, dung dịch thuốc nghiên cứu, bơm tiêm và kim tiêm.

2.3. Tiến hành thí nghiệm

Dùng chuột đã trưởng thành, có trọng lượng 20 ± 2 g, đồng đều nhau chia làm 2 lô, một lô dùng thuốc và một lô đối chứng. Thuốc nghiên cứu được hòa tan trong nước muối sinh lý hoặc dung môi thích hợp, cho chuột uống trước khi dùng strychnin với khoảng cách sao cho thuốc phát huy tác dụng tối đa ở thời điểm trên strychnin. Lô đối chứng dùng nước muối sinh lý có cùng thể tích với liều thuốc nghiên cứu. Strychnin được tiêm xoang bụng với thể tích 0,4 ml tương ứng với liều 2 mg/kg là liều gây chết 99% (LD_{99}). Tiêm xong, quan sát khả năng thuốc bảo vệ động vật thoát khỏi tử vong.

2.4. Kết quả

Ở lô đối chứng sau khi tiêm strychnin thì trên toàn bộ động vật xuất hiện co giật dẫn đến tử vong ; còn ở lô dùng thuốc chuột được bảo vệ không xuất hiện tử vong. Tác dụng chống co giật được thể hiện bằng tỷ lệ động vật được bảo vệ càng cao thuốc có tác dụng càng mạnh.

Ngoài ra nghiệm pháp này còn dùng để phát hiện nhanh tác dụng gây giãn cơ của một thuốc mới.

Tuy tác giả Domino (1956) cho rằng mối quan hệ giữa tác dụng đối kháng với strychnin và sự ức chế các tế bào thần kinh tủy sống là khá nghèo nàn nhưng người ta cho rằng tác dụng bảo vệ khỏi tử vong do strychnin gây nên là một nghiệm pháp hữu ích để sàng lọc nhanh các thuốc có tác dụng gây giãn cơ. Mephenesin là một thuốc giãn cơ mới có tác dụng đối kháng với strychnin (Berger và Bradley, 1916). Tác dụng của thuốc là thông qua sự ức chế tính hưng phấn của các phản xạ tủy sống và chỉ với liều rất cao mới có tác dụng phong bế hệ thần kinh - cơ.

Tiến hành thí nghiệm như sau: dùng chuột nhắt trắng đã trưởng thành có trọng lượng 18 – 20g, tương đối đồng đều nhau, chia thành nhiều lô mỗi lô 10 chuột. Thuốc nghiên cứu được dùng bằng đường uống với các liều tăng dần nhằm gây tỷ lệ phản ứng khác nhau ở các lô dùng thuốc. Sau khi dùng thuốc ở một thời điểm nhất định (ví dụ 30, 40, 50, 60 phút) hoặc tốt nhất ở thời điểm thuốc phát huy tác dụng tối đa, tiêm vào tĩnh mạch đuôi mỗi chuột dung dịch strychnin sulfat với liều 0,75 mg/kg với dung dịch 0,01%, tốc độ tiêm là 0,02 ml/giây. Sau khi tiêm xong quan sát phản ứng của chuột ở mỗi lô.

Kết quả: Ở lô đối chứng không dùng thuốc chỉ dùng nước muối sinh lý, sau khi tiêm xong strychnin thì toàn bộ chuột xuất hiện co cứng dẫn tới tử vong. Còn ở các lô dùng thuốc chuột được bảo vệ khỏi tử vong ở mức độ khác nhau tùy theo liều dùng của thuốc. Tính tỷ lệ % số chuột được bảo vệ trong các lô dùng thuốc, từ đó ta xác định liều bảo vệ 50% động vật thí nghiệm hay còn gọi là liều có hiệu lực 50% (ED_{50}). Trong thí nghiệm này ED_{50} của mephenesin ở phút thứ 30 là 580 mg/kg.

III. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CHỐNG CO GIẬT DO TREMORIN GÂY NÊN TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG

3.1. Nguyên lý chung

Người ta đã biết chất tremorin-1,4 dipyrrolidin-2-butyn dihydroclorid bằng đường tiêm xoang bụng gây run rẩy toàn thân trên chuột. Hiện tượng này bị đối kháng bởi các thuốc dùng điều trị bệnh Parkinson (Everett và cộng sự, 1956).

3.2. Vật liệu, dụng cụ thí nghiệm

Động vật chuột nhắt trắng, dung dịch tremorin 1 mg/ml, dung dịch thuốc nghiên cứu, bơm tiêm, kim tiêm.

3.3. Tiến hành thí nghiệm

Dùng chuột đã trưởng thành, đồng đều nhau, có trọng lượng $20 \pm 2g$, chia chuột thành 2 lô: một lô dùng thuốc và một lô đối chứng. Thuốc được dùng bằng đường tiêm xoang bụng với liều lượng đã chọn trước. Lô đối chứng dùng nước muối sinh lý có cùng thể tích với liều dùng của thuốc nghiên cứu.

Sau đó một giờ tiêm xoang bụng dung dịch tremorin cho cả 2 lô chuột, mỗi chuột với liều 0,4 ml. Với liều đã dùng tremorin gây run rẩy nhanh và nhỏ trên động vật thí nghiệm. Cầm lấy đuôi giữ chuột nằm im để đánh giá mức độ chống run rẩy của thuốc theo quy định sau: Khi hiện tượng run rẩy xuất hiện giống như ở lô đối chứng thì tác dụng chống run rẩy được đánh giá là không có, nếu cường độ run rẩy có giảm chút ít thì tác dụng được coi là ở mức độ nhẹ, còn nếu run rẩy xuất hiện ở mức độ nhẹ thì tác dụng được coi là vừa và nếu run rẩy không xuất hiện thì tác dụng được coi là hoàn hảo.

3.4. Kết quả

Ở lô đối chứng sau khi tiêm tremorin với liều dùng trên thì toàn bộ chuột xuất hiện run rẩy toàn thân, còn ở lô dùng thuốc tùy theo cường độ tác dụng chống co giật của thuốc được thể hiện qua bốn mức: không có tác dụng, tác dụng nhẹ, tác dụng vừa và tác dụng hoàn hảo.

Phương pháp thí nghiệm này có giá trị trong việc nghiên cứu sàng lọc phát hiện các thuốc có tác dụng điều trị bệnh Parkinson.

Tremorin với liều dùng trên, ngoài tác dụng gây run rẩy còn có tác dụng kích thích hệ thần kinh đối giao cảm ngoại vi do đó, phương pháp này cũng có thể dùng để nghiên cứu các thuốc có tác dụng ức chế hệ cholin ngoại vi.

IV. THÍ NGHIỆM VỀ TÁC DỤNG CHỐNG CO GIẬT DO NATRI GLUTAMAT GÂY NÊN TRÊN CHUỘT

4.1. Nguyên lý chung

Acid glutamic là chất dẫn truyền thần kinh hưng phấn và cũng là tiền chất để tổng hợp GABA. Hai chất này giữ vai trò quan trọng trong việc duy trì chức năng hoạt động của hệ thần kinh trung ương. Khi sự cân bằng giữa 2 chất trên bị rối loạn, lượng acid glutamic trong não tăng cao có thể gây co giật.

4.2. Vật liệu, dụng cụ, động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng, bộ dụng cụ tiểu phẫu thuật, máy khoan xương cực nhỏ, bơm tiêm vi lượng, thuốc nghiên cứu, nước muối sinh lý, dung dịch hydantoin có nồng độ 1 mg/1 ml, dung dịch natri glutamat 3,2 µg/µl.

4.3. Tiến hành thí nghiệm

Dùng chuột nhắt trắng có trọng lượng 18 – 20 g, chia thành 3 lô, mỗi lô 10 chuột. Lô I dùng thuốc thí nghiệm bằng đường uống, mỗi ngày một liều, mỗi liều 1 ml cho mỗi chuột, liên tục dùng trong 6 ngày. Lô II và III mỗi ngày cho uống nước muối sinh lý một lần, mỗi lần 1 ml cho mỗi chuột. Đến ngày thứ sáu ở lô I sau lần dùng thuốc cuối cùng 40 phút thì tiến hành phẫu thuật, ở lô II được dùng hydantoin bằng đường uống với liều 50 mg/kg, sau 40 phút tiến hành phẫu thuật, ở lô III đối chứng cho uống nước muối sinh lý mỗi chuột 1 ml, sau 40 phút tiến hành phẫu thuật như 2 lô trên. Phẫu thuật được tiến hành bằng cách cắt bỏ da ở giữa 2 mắt và phía sau của chuột, sau đó 15 phút ở vị trí cách giao điểm khớp xương trán về phía phải và phía sau 1 mm, dùng khoan cực nhỏ khoan một lỗ bé, sau khi khoan xong thì ngay lập tức dùng bơm tiêm vi lượng tiêm vào não thất chuột 5 µl dung dịch natri glutamat hòa tan trong nước muối sinh lý, độ sâu của kim tiêm khoảng 3 mm. Quan sát chuột ngay lập tức, chuột chạy nhảy hoặc lên cơn co giật. Tính số chuột không chạy nhảy, không lên cơn co giật trong mỗi lô, rồi từ đó tính tỷ lệ chống co giật của thuốc.

4.4. Kết quả

Sau đây là kết quả chống co giật do natri glutamat gây nên trên chuột.

Lô thí nghiệm	Số chuột không chạy nhảy không co giật	Số chuột chạy nhảy, lên cơn co giật	Tỷ lệ chống co giật, (%)
Thuốc nghiên cứu	8	2	80
Hydantoin	7	3	70
Nước muối sinh lý	0	10	0

Theo kết quả trên ở lô chuột dùng nước muối sinh lý tiêm vào não thất vì lượng natri glutamat thì toàn bộ chuột xuất hiện phản ứng chạy nhảy, lên cơn co giật. Còn ở lô dùng thuốc nghiên cứu và dùng hydantoin thì ức chế được phản ứng trên, tỷ lệ chống co giật đạt 80% đối với thuốc nghiên cứu và 70% đối với hydantoin.

Ghi chú:

- Hydantoin là một thuốc chống động kinh đã được sử dụng trong điều trị trên lâm sàng.
- Thí nghiệm này có thể tiến hành trên chuột cống trắng, lỗ khoan hộp sọ cách giao điểm khớp xương trán và vế phía sau 2 mm, cách đường giữa 1 – 2 mm, độ sâu của kim tiêm 4 mm, thể tích cho vào não thất 10 – 20 μ l cho một chuột và phải tiêm từ từ.
- Cơ chế gây co giật của natri glutamat đã rõ nên phương pháp thí nghiệm còn giúp ta hiểu biết tác dụng thuốc nằm ở khâu nào.

V. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CHỐNG CO GIẬT DO SỐC ĐIỆN GÂY NÊN

5.1. Nguyên lý chung

Dùng dòng điện có cường độ yếu kích thích đại não trong thời gian ngắn gây co giật trên động vật thí nghiệm.

5.2. Vật tư, dụng cụ thí nghiệm

Động vật dùng chuột nhắt trắng hoặc chuột cống trắng, dung dịch thuốc nghiên cứu, máy gây sốc điện chuyên dùng cho chuột, bơm và kim tiêm.

5.3. Tiến hành thí nghiệm

Dùng chuột nhắt trắng đực đã trưởng thành có trọng lượng 20 ± 2 g hoặc chuột cống trắng có trọng lượng 180 – 200 g. Trước lúc gây sốc điện với khoảng cách thời gian nhất định, thuốc nghiên cứu được dùng với dung môi thích hợp để hòa tan, tiêm dưới da hoặc bằng đường uống. Thể tích dung dịch thuốc dùng bằng đường tiêm dưới da là 0,1 ml cho chuột nhắt trắng và 0,2 ml cho chuột cống trắng, còn bằng đường uống thể tích thuốc không được quá 1 ml cho chuột nhắt và 4 ml cho chuột cống trắng.

Gây sốc điện bằng máy gây sốc điện chuyên dùng cho chuột, kẹp vào 2 tai chuột điện cực chuyên dùng. Các thông số kích thích điện gồm dòng điện xoay chiều 60 Hz, điện áp 50 V, thời gian kích thích 0,25 giây dùng cho chuột nhắt, dùng cho chuột cống thì điện áp 100 V, thời gian kích thích 0,5 giây, hoặc dùng dòng điện 50 mA cho chuột nhắt trắng và 150 mA cho chuột cống trắng kích thích trong vòng 0,2 giây. Tuyển chọn súc vật trước khi thí nghiệm, loại bỏ những chuột khi kích thích không xuất hiện phản ứng. Phản ứng của chuột do sốc điện gây nên là co giật toàn thân và cuối cùng là co cứng duỗi thẳng 2 chân sau. Tác dụng chống co giật của thuốc được thể hiện bằng khả năng xóa bỏ được cơn co cứng duỗi thẳng chân sau của chuột.

5.4. Kết quả

Ở lô đối chứng không dùng thuốc chỉ dùng nước muối sinh lý thì sốc điện gây co giật trên toàn bộ động vật, cuối cùng là co cứng duỗi thẳng 2 chân sau, còn ở lô dùng thuốc thì động vật được bảo vệ thoát khỏi cơn co giật co cứng trên.

Ghi chú. Một số tác giả đã chứng minh rằng trong thí nghiệm này thuốc phenobarbital với liều dùng 10 – 30 mg/kg thể hiện rõ rệt tác dụng chống co giật do sốc gây nên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. O. Foussard-Blanpin et M. R Brou Koffi – (1980) Etude experimentale des substances anticonvulsivantes actives contre le petit mal. J. Pharmacol (Paris) 1980; 11, 4, 475-477
2. Cheymol J. (1950) Crises convulsives experimentales et medicaments antiepileptiques. Act Pharmacol. 2,1-55
3. Mercier J. (1956) Acquisitions nouvelles experimentales et therapeutiques dans le domaine des antiepileptiques. Act. Pharmacol. 9, 83-132
4. Trần Kỳ – (1993) Trung dược dược lý nghiên cứu phương pháp học. Nhà xuất bản Vệ sinh Nhân dân - 662-67 (Trung Văn).

CHƯƠNG 6

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC
TÁC DỤNG TRÊN HỆ THẦN KINH ĐỐI GIAO CẢM***GS. Đoàn Thị Nhu***I. NGHIÊN CỨU CÁC THUỐC TÁC DỤNG GIỐNG THẦN KINH ĐỐI
GIAO CẢM**

Các chất có ái lực với những thụ thể đối giao cảm là những chất có tác dụng giống muscarin hoặc có tác dụng giống thần kinh đối giao cảm. Van Rossum và Ariens (1959) cho rằng có ba loại chất này: những chất gây thay đổi nồng độ acetylcholin ở vùng lân cận các thụ thể, những chất tác động với thụ thể, và những chất tác động với các thụ thể khác, nghĩa là những thụ thể trong hệ thống không bị ảnh hưởng bởi acetylcholin. Một chất thuộc loại sau cùng là bari clorid.

Theo sự sắp xếp này, có những thuốc bản thân không có hoạt tính, nhưng gây sự thay đổi trong tiến trình của các sự kiện từ các thụ thể đối giao cảm đến tác dụng cuối cùng. Những thuốc như thế là những chất đối kháng không cạnh tranh của các thuốc tác dụng giống muscarin, như papaverin. Một trong những phương pháp đơn giản nhất để phát hiện hoạt tính kiểu muscarin là dùng thử nghiệm trên hồi tràng cô lập chuột lang (Chương 3, mục 1.1) hoặc trên hồng tràng chuột cống trắng (Chương 3, mục 1.3).

Những phương pháp đặc trưng hơn được mô tả ở dưới.

**1.1. Thử nghiệm trên mắt cô lập động vật gặm nhấm (*Beaver* và
Riker, 1962)**

Lựa chọn những chuột cống trắng, chuột nhắt trắng, hoặc chuột lang có mống mắt có màu. Ngay trước khi dùng, giết chuột, và các nhãn cầu được bóc nhân nhanh chóng bằng kéo phẫu thuật cong cùn mũi. Những cấu trúc sau nhãn cầu được tách sạch sẽ và cẩn thận khỏi nhãn cầu. Khi cần loại bỏ giác mạc, thực hiện chọc rạch hoàn toàn để dẫn lưu với dao Wheeler. Giác mạc được cắt ngang

và cắt rời dọc theo bờ rìa. Rửa nhanh mắt trong dung dịch Krebs - Ringer, rồi lắp vào các lỗ hình bán cầu có kích thước thích hợp đặt trong các khay Lucite đen. Các khay được chìm ngập trong 20 ml dung dịch đệm bicarbonat Krebs - Ringer, một phòng Lucite trong được thiết kế sao cho khớp với bàn soi cơ học của kính hiển vi. Một hỗn hợp 95% oxy và 5% carbon dioxyd được bơm liên tục qua dung dịch để duy trì pH ở 7,4.

Nhiệt độ được duy trì ở $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ bằng một đèn sưởi 75 oát, được kiểm soát bởi một nhiệt kế chuyển hóa thủy ngân và một role điện tử. Độ đường kính của đồng tử bằng một kính hiển vi mà thị kính có một đĩa trác vi kế; độ phóng đại khoảng 30 lần. Các mắt được đặt trong phòng và sau thời gian 30 phút để tiêu bản ổn định, đo đường kính đồng tử làm đối chứng và thay dung dịch Krebs bằng dung dịch Krebs mới chứa nồng độ thuốc thử được định trước. Để dung dịch tác động trong 30 phút rồi đo đường kính đồng tử. Đáp ứng được biểu thị bằng tỷ lệ của đường kính này so với đường kính đối chứng.

Sơ đồ của tỷ lệ này đối với logarit của nồng độ phân tử của thuốc thử là một đường thẳng. Đường kính đồng tử giảm từ 100% của đối chứng xuống 40% với 10^{-6} M carbamylcholin, và với 10^{-3} M pilocarpin.

1.2. Thử nghiệm trên khí quản cô lập chuột cống trắng (*Jamieson, 1962*)

Cô lập khí quản từ một chuột cống trắng mới bị giết, đặt trong dung dịch Krebs - Henseleit và cắt bỏ mô không liên quan. Một đầu được gắn với một ống hình U, đầu kia gắn với một ống mao dẫn có đường kính bên trong là 1 mm. Thiết bị được đặt trong bình ngâm cơ quan 10 ml chứa dung dịch Krebs - Henseleit ở 37°C được thông khí với 95% oxy và 5% carbon dioxyd. Ống mao dẫn, dài 200 mm, được lắp đặt ở vị trí thẳng đứng trên khí quản thẳng đứng, và được lắp với một thước milimet. Dịch lỏng trong ống mao dẫn được thay rửa từ ống hình U, rồi được hiệu chỉnh ở 70 đến 100 mm trên mức của bình ngâm. Sau đó ống hình U được đóng lại bằng một khóa vòi tách khỏi dịch lỏng trong khí quản, sao cho các thay đổi về chiều cao của dịch lỏng trong ống mao dẫn là do những sự co và giãn của khí quản. Sau 10 phút, đọc mức ổn định của chiều cao của dịch lỏng trong ống mao dẫn. Dịch lỏng trong bình ngâm cơ quan được thay từ bên dưới, như vậy sẽ tránh không để mô phơi ra ngoài không khí.

Quan sát những hiện tượng xảy ra khi khí quản co lại. Dùng các ký hiệu: **D** là đường kính khí quản khi nghỉ; **C** là đường kính ở trạng thái co; **L** là chiều dài; và **V** là thể tích của khí quản. Dùng ký hiệu **h** là chiều cao chất lỏng trong ống mao dẫn, có đường kính 1 mm. **D** được cho là hằng định.

Tính sự thay đổi thể tích khí quản khi co theo công thức sau:

$$\Delta V = \pi \frac{C^2}{4} L - \pi \frac{D^2}{4} ; \quad L = \pi \frac{1}{4} \Delta h ; \quad C^2 = \frac{\Delta h}{L} + D^2$$

Như vậy trị số của C, đường kính khí quản khi co, tỷ lệ với căn bậc hai của sự thay đổi chiều cao của dịch lỏng trong ống mao dẫn.

Thời gian tiếp xúc của khí quản với các chất gây co là 1,5 đến 3,0 phút, và thử nghiệm với các liều kế tiếp ở các khoảng cách 5 đến 8 phút. Dung dịch ngâm cơ quan được thay rửa ít nhất 2 lần giữa các liều. Nồng độ tối thiểu của một số thuốc (g/ml) trong dịch ngâm gây co khí quản cô lập động vật gặm nhấm được trình bày ở bảng sau đây:

Bảng kê nồng độ tối thiểu trong dịch ngâm của một số thuốc gây co khí quản cô lập động vật gặm nhấm

Thuốc	Khí quản chuột cống trắng	Khí quản chuột lang
Acetylcholin	10^{-8}	2×10^{-8}
Serotonin	$2,5 \times 10^{-8}$	5×10^{-8}
Histamin	$> 10^{-3}$	4×10^{-8}
Epinephrin	$> 10^{-3}$	10^{-9}
Aminophyllin	$> 10^{-3}$	10^{-5}

Những kết quả trong thử nghiệm này tương tự như các kết quả trong thử nghiệm với các vòng khí quản (Castillo và de Beer, 1947) (Chương 3, mục 2.3).

II. NGHIÊN CỨU CÁC THUỐC LIỆT THẦN KINH ĐỐI GIAO CẢM

Các thuốc có tác dụng đối kháng với tác dụng của acetylcholin ở các khớp thần kinh (si-náp) tận cùng được gọi là thuốc ức chế thần kinh đối giao cảm (kháng acetylcholin, kháng muscarin). Có thể chứng minh hoạt tính của các thuốc này bằng thử nghiệm giãn đồng tử và thử nghiệm ức chế sự tiết các dịch đường tiêu hóa (nước bọt, dịch vị, v.v...)

2.1. Thử nghiệm về tác dụng gây giãn đồng tử

Chuột nhắt trắng được dùng nhiều nhất để nghiên cứu hoạt tính giãn đồng tử, nhưng thỏ cũng được dùng. Trong phương pháp của Jong và cộng sự (1955); chuột nhắt trắng được tiêm màng bụng dung dịch thuốc thử. Trong giờ thứ nhất sau khi tiêm, đo các đường kính của đồng tử, được biểu thị bằng đơn vị 0,04 mm, cứ 10 phút

một lần, và đo lại ở 90 và 120 phút, bằng thị kính của một kính hiển vi phẫu tích có thước chia độ. Tác dụng giãn đồng tử dương tính nếu đường kính đồng tử vượt quá 30/25 mm ở mọi lần sau khi tiêm. Để có kết quả định lượng, dùng tối thiểu 4 liều và 60 chuột nhất trắng.

Blackman và cộng sự (1956) dùng những bóng đèn huỳnh quang dài, có công suất thấp làm nguồn chiếu sáng. Chuột được đặt trong các cốc đứng thành, để trên giấy bóng trắng, trong 30 phút, trước khi các đường kính của đồng tử được đọc với một kính hiển vi phẫu tích.

Phương pháp sau đây (Edge, 1953) có thể cho những kết quả định lượng. Chỉ dùng chuột nhất trắng của một giống, cả đực và cái, cân nặng 15,5 đến 16,5g. Chuột nhất được để riêng trong các vại thủy tinh trên một bàn trắng, dưới ánh sáng huỳnh quang trong một phòng tối khác. Sau nửa giờ, đo đường kính của đồng tử chuột bằng một thang chia độ trong thị kính của kính hiển vi phẫu tích.

Sau đó tiêm trong màng bụng cho chuột liều thuốc 0,01 ml cho 1g thể trọng. Đo lại đường kính của đồng tử sau 10; 20 và 30 phút. Dùng một nhóm 5 chuột nhất cho mỗi mức liều.

Dùng hexamethonium dibromid và hoạt tính tương đối được biểu thị là sự tăng tổng cộng trung bình đường kính đồng tử. Các thuốc có hoạt tính có thể được thử nghiệm thêm trên tiêu bản mí mắt thứ ba của hạch thần kinh cổ trên của mèo. Sự phối hợp hai thử nghiệm này có thể cho phép phát hiện một thuốc phong bế hạch đối giao cảm.

Các thuốc phong bế hạch đối giao cảm gây giãn đồng tử ở động vật có vú, mà các sợi hình vòng tròn của móng mắt là những cơ không có vân. Các sợi của dây thần kinh vận nhãn chung sau mắt đi tới hạch thần kinh mi và tận cùng ở đó xung quanh các tế bào thần kinh, các tế bào này gửi một sợi trục tận cùng ở các cơ hình vòng tròn của móng mắt. Đường tiếp cơ – thần kinh tận cùng bị ức chế khi có mặt atropin và các thuốc ức chế thần kinh đối giao cảm khác, vì, khi các xung động của dây thần kinh thể mi bị gián đoạn (giữ đồng tử bị co ở mức vừa), cơ thất giãn ra và đồng tử giãn.

Đó là kết quả của sự mất cân bằng thần kinh các xung động, vì các sợi giao cảm bắt nguồn từ dây thần kinh cổ dưới đi qua hạch thần kinh hình sao và hạch thần kinh cổ dưới và tận cùng ở hạch thần kinh cổ trên, từ đó các sợi đi ra qua dây thần kinh mũi – mi và tận cùng ở các sợi cơ tỏa tia của móng mắt. Các cơ này làm giãn đồng tử.

Stone và cộng sự (1958) đánh giá hoạt tính tương đối bằng cách xác định, trên đường biểu diễn liều – đáp ứng, liều của một thuốc gây đường kính đồng tử bằng 10 đơn vị của trục vi kế, hoặc 0,82 mm.

Trong phương pháp của Edge (1953), hoạt tính giãn đồng tử của một số thuốc phong bế hạch là: hexamethonium dibromid, 100; tetra – ethylammonium bromid 33,2 ; pentamethonium dibromid, 28,4.

Phương pháp của Edwards và cộng sự (1960) đã được áp dụng cho thỏ. Nhỏ vào mắt trái của 3 thỏ 2 giọt dung dịch nước 0,1% atropin sulfat; nhỏ vào mắt trái của 3 thỏ khác 2 giọt (0,2 ml) dung dịch nước 0,1% của thuốc thử nghiệm. Mắt phải của mỗi thỏ được dùng làm đối chứng. Các đường kính đồng tử của cả hai mắt ở tất cả thỏ được đo ở những khoảng cách thời gian, và sự giãn mạch trung bình được biểu thị bằng tỷ lệ % tăng hoặc giảm của đường kính đồng tử thử thuốc so sánh với đồng tử đối chứng. Atropin sulfat gây giãn đồng tử 42%, kéo dài trong 50 giờ.

Thử nghiệm này còn có thể cho thấy thuốc thử có tác dụng kích ứng mắt thỏ hay không. Do đó, nên kiểm tra mắt thử thuốc và mắt đối chứng về các hiện tượng sung, đỏ hoặc các dấu hiệu kích ứng khác. Nếu thấy có kích ứng, nên thử thuốc thêm về tác dụng gây kích ứng trên da và niêm mạc, cũng như về tác dụng gây mẫn cảm.

2.2. Thử nghiệm về tác dụng chống chảy nước bọt

Brown và Quinton (1957) đã phát triển một phương pháp định lượng trên thỏ. Dùng thỏ trắng cân nặng ít nhất 1,5 kg. Cho uống urethan với liều 500 đến 625 mg/kg để gây an thần, liều này được pha trong 25 ml dung dịch NaCl đẳng trương. Mỗi thỏ được đặt trong một cái cùm, sao cho đầu ở trên một cái phễu để hứng nước bọt vào đó, sau khi tiêm dưới da một liều pilocarpin nitrat 5 mg/kg cho thỏ, ở thời điểm 30 phút sau khi cho uống urethan. Các thuốc đối kháng với acetylcholin được cho tối đa là 70 phút trước khi tiêm pilocarpin, mặc dù khoảng cách thời gian này quá dài đối với atropin.

Nếu trong các thí nghiệm sơ bộ, thỏ nào không giảm 50% sự tiết nước bọt khi cho atropin 25 µg/kg 15 phút trước pilocarpin, thì sẽ không được dùng. Người ta cho rằng các động vật không nhạy cảm với atropin có lượng lớn atropinesterase trong huyết tương. Khoảng một nửa số thỏ được kiểm tra có thể bị loại, không dùng cho thử nghiệm được.

Đáp ứng trong một thí nghiệm được biểu thị bằng tỷ lệ % giảm tổng thể tích nước bọt, thu thập trong 90 phút, khi đã cho một liều thuốc ức chế thần kinh đối giao cảm, so với trị số trung bình của các thể tích đạt được từ cùng động vật trong 2 thí

thử nghiệm đối chứng. Mỗi lô thử nghiệm gồm 8 thỏ. Các động vật được dùng 2 lần mỗi tuần.

Liều ED_{50} đối với atropin khác nhau giữa các nhóm thỏ khác nhau, vì độ nhạy cảm của thỏ với atropin thay đổi khá nhiều. Như vậy phải so sánh các thuốc kháng acetylcholin với atropin trên cùng lô thỏ.

2.3. Thử nghiệm về tác dụng dự phòng co thắt ruột

Thử nghiệm tác dụng ức chế thần kinh đối giao cảm trên ruột bằng phương pháp của Becker và McCarthy (1960). Thử nghiệm trên những nhóm 20 chuột nhắt trắng Swiss cả đực và cái được cho uống những liều thuốc khác nhau bằng ống thông dạ dày. Các muối hòa tan được cho uống dưới dạng dung dịch nước, và các phức chất nhựa (các thành phần có tác dụng kéo dài) được pha thành dịch treo trong 0,5% carboxymethylcellulose. Điều chỉnh nồng độ thuốc sao cho thể tích của liều là 50 ml/kg thể trọng. Tất cả các liều chỉ được tính theo ion có hoạt tính. Nửa giờ sau khi cho các muối hòa tan và 2 giờ sau khi cho dịch treo phức hợp nhựa, gây mê chuột bằng tiêm màng bụng natri pentobarbital (2 mg trong 0,2 ml). Khi chuột không còn đáp ứng với sự kẹp đuôi mạnh, bộc lộ ruột bằng việc cắt một vạt ở thành bụng. Methacholin 0,25 μ g chứa trong 0,2 ml, được áp dụng tại chỗ vào ruột bộc lộ và quan sát ruột trong thời gian đúng 3 giây. Ghi 2 điểm nếu co thắt ruột do methacholin được dự phòng hoàn toàn; ghi 1 điểm nếu co thắt giảm về cường độ hoặc chỉ xảy ra ở một vùng hạn chế. Các số điểm của nhóm được chuyển thành tỷ lệ phần trăm của số điểm trung bình lý tưởng (2 điểm), và tính liều bảo vệ trung bình bằng phương pháp Litchfield và Wilcoxon (1949). Đo thời gian kéo dài tác dụng bằng điều trị các nhóm 20 chuột nhắt trắng với ED_{50} , được xác định từ đường cong thể hiện log liều - tác dụng, và thử các nhóm chuột ở những khoảng cách thời gian chọn lọc theo cách thông thường (chú thích: tất cả các liều đều được biểu thị bằng cation có hoạt tính).

Thời gian trung bình tính được đối với đáp ứng của chuột nhắt không điều trị cộng với 2,303 lần của độ lệch chuẩn (SD) không bao giờ lớn hơn 2,51 giây ở 14 ngày khác nhau. Do đó, thời gian quan sát được lựa chọn là 3 giây. Các liều có tác dụng 50% (ED_{50}) của atropin sulfat, scopolamin hydrobromid, methylatropin nitrat, methylscopolamin nitrat, và methandelin bromid là theo thứ tự tương ứng 42; 34; 6,2; 9,0 và 63 mg/kg (Becker và McCarthy, 1960).

2.4. Thử nghiệm trên sự chảy nước mắt

Thử nghiệm này được thiết kế để chứng minh tác dụng phong bế thần kinh đối giao cảm trên sự chảy nước mắt (de Jongh và cộng sự, 1955).

Dùng chuột cống trắng Wistar cân nặng 150 đến 225g. Động vật được giữ ở 36°C trong 10 phút trước khi dùng để gây giãn mạch. Sau đó tiêm thuốc thử nghiệm vào tĩnh mạch đuôi, thể tích dung dịch là 1 ml/kg thể trọng, và thời gian tiêm là 20 giây. Một liều 0,5 mg/kg carbamylcholin được tiêm trong màng bụng sau 15, 45, 75 và 105 phút, hoặc cho đến khi đạt được một kết quả dương tính. Sự xuất hiện của một vết có màu trên một miếng bông ép vào mắt, trong vòng 3 phút sau khi tiêm carbamylcholin, được coi là một đáp ứng dương tính. Nếu không thu được một vết có màu ở khoảng cách thời gian thích hợp thì coi như thuốc thử nghiệm có hoạt tính ức chế thần kinh đối giao cảm.

Liều ED₅₀, liều cần thiết để dự phòng sự xuất hiện một vết có màu ở một nửa số chuột sau 105 phút, bằng $\mu\text{mol/kg}$ là 13,8 đối với atropin và 3,5 đối với 2,2-diphenyl-4-diisopropylamino-butylamid methyliolid. Các đơn vị xác suất của tỷ lệ phần trăm động vật được bảo vệ được vẽ sơ đồ đối với logarit của các liều để được các trị số này (de Jongh và cộng sự, 1955).

2.5. Các thử nghiệm *in vitro*

Các thuốc gây tê, giảm đau và các chất có hoạt tính kiểu quinidin có được các tác dụng dược lý nhờ vào hoạt tính đối kháng với acetylcholin.

2.5.1. Thử nghiệm trên cơ thẳng bụng ếch có lập

Cơ lập cơ thẳng bụng ếch (chương 3, mục 3.1) và treo trong bình ngâm chứa 7 ml dung dịch Ringer dùng cho ếch (de Elio, 1948). Thay dịch ngâm cứ 5 phút một lần bằng dung dịch Ringer dùng cho ếch chứa acetylcholin $1:10^{-7}$. Ghi tác dụng kích thích của acetylcholin trong 90 giây. Sau khi rửa với dung dịch Ringer dùng cho ếch thường, cơ trở về trạng thái không bị kích thích. Đáp ứng với acetylcholin này không thay đổi, nhưng được quan sát 3 lần khi bắt đầu mỗi thí nghiệm. Sau đó, ở thời điểm 90 giây trước lần cho acetylcholin tiếp sau, thay dịch bằng dịch mới chứa dung dịch thuốc thử. Có thể quan sát tác dụng trên sự kích thích tiếp sau của acetylcholin. Ghi nồng độ của thuốc thử làm mất tác dụng của acetylcholin, hoặc ghi nồng độ làm giảm đáp ứng 50%.

2.5.2. Thử nghiệm trên hồi tràng có lập chuột nhắt trắng

Dùng 4 mảnh hồi tràng chuột nhắt trắng khác nhau (de Jongh và cộng sự, 1955). Cho thêm acetylcholin clorid vào dịch ngâm trong đó mảnh hồi tràng được treo, sao cho nồng độ là 0,2 $\mu\text{g/ml}$ dịch ngâm. Một phút sau, cho thêm dung dịch thuốc. Cho những nồng độ thuốc tăng dần vào cho đến khi sự co cơ gây bởi acetylcholin mất đi. Dung dịch ngâm được rửa sạch nhiều lần sau mỗi thử nghiệm và hồi tràng được để cho nghỉ trong một khoảng thời gian cố định giữa các thử

nghiệm. Xác định nồng độ cao nhất không có tác dụng của thuốc, và sau đó thử các nồng độ gấp hai lần và năm lần. Ít nhất bốn liều atropin, với nồng độ ở giữa $5,6 \times 10^{-9}$ và $5,6 \times 10^{-8}$ được cho thêm vào dịch ngâm giữa các liều của thuốc thử. Như vậy có thể đánh giá thuốc có hoạt tính bằng bao nhiêu phần trăm so với hoạt tính của atropin.

2.5.3. Thử nghiệm trên hồi tràng cô lập của thỏ

Hai đoạn hồi tràng được treo trong một bình ngâm 70 ml, và cho thêm vào 0,07 mg acetylcholin bromid trong 0,7 ml nước (De Jongh và cộng sự, 1955). Sau 1 phút, một liều thuốc ức chế đối giao cảm hòa tan trong 0,5 ml nước được để tác động trong đúng 2 phút. Dịch ngâm được rửa sạch trong 5 phút, và sau đó bắt đầu một thử nghiệm mới.

Atropin sulfat được dùng làm chất chuẩn đối chiếu. Thử nghiệm với 3 nồng độ của thuốc thử và 3 nồng độ của chất chuẩn. Các kết quả được dựa trên ít nhất 64 đáp ứng tất cả hoặc không có gì đạt được từ 8 đoạn hồi tràng hoặc nhiều hơn. Áp dụng phương pháp đồ thị (Litchfield và Wilcoxon, 1949) để có tỷ lệ hoạt lực phân tử gam so với atropin sulfat.

Hoạt lực của một số thuốc như sau: atropin sulfat, 100; scopolamin methylbromid, 160; propanthelin bromid, 280; diphemanil methylsulfonat, 30; và panthienat bromid, 144 (de Jongh và cộng sự, 1955).

2.6. Thử nghiệm trên sự đẩy về phía trước ở đường tiêu hóa

Thử nghiệm được thiết kế để chứng minh tác dụng ức chế hoặc kích thích nhu động (Janssen và Jageneau, 1957).

Chuột nhắt trắng cái, 2 đến 4 tháng tuổi, được để nhịn đói qua đêm, rồi được tiêm trong màng bụng thuốc chứa trong 0,1 ml/10g thể trọng. Một giờ sau, chuột được cho bằng ống thông dạ dày 0,3 ml một dịch treo trong nước chứa 10% than và 5% gôm acacia. Hai giờ sau khi cho ăn than, giết chuột, cắt lấy ruột từ tâm vị đến hậu môn. Ruột được để duỗi thẳng trên một tấm kính trắng sạch và được đo từ môn vị đến manh tràng. Chuột đối chứng có manh tràng đen (trong 300 chuột nhắt đối chứng cho dung dịch muối, manh tràng chứa đầy than). Các thuốc chống co thắt làm cho manh tràng không có than, nghĩa là có màu tự nhiên.

Tiêu chuẩn "tất cả hoặc không có gì" được coi là tốt hơn việc đo khoảng cách mà than đã đi ngang qua theo tỷ lệ với chiều dài của ruột, vì các số đo không chính xác, và vì đường cong liều lượng - tác dụng rất phẳng.

Các thuốc chống co thắt, các thuốc giảm đau, và các loại thuốc khác như các thuốc kháng histamin gây giảm sự đẩy về phía trước ở ruột, rất có thể do có sự liên

quan với các thụ thể cholinergic trong đường tiêu hóa. Như vậy hoạt tính dương tính biểu hiện bởi manh tràng không có than có thể chỉ cho thấy hoạt tính liệt đối giao cảm, ức chế thần kinh mạnh, v.v.

Một sự sửa đổi của thử nghiệm này (Witkin và cộng sự, 1961) như sau: Chuột nhắt trắng không được cho ăn trong 17 đến 22 giờ nhưng được cho uống nước. Ở một thời điểm định rõ sau khi tiêm thuốc dưới da, chuột được cho uống 0,25 ml dịch treo 5% bồ hóng trong 5% gồm adragan. Ba mươi phút sau khi cho chuột uống bồ hóng, giết chuột bằng cloroform. Lấy dạ dày và ruột non và căng ra bằng cách treo một quả cân 3g từ một đầu trong 20 giây. Ghi tỷ lệ phần trăm của ruột non mà bồ hóng đã đi qua.

Không có mối tương quan được giải thích giữa sự giảm đau và sự đẩy về phía trước ở đường tiêu hóa. Tuy nhiên tất cả các thuốc giảm đau đã biết đều ức chế có ý nghĩa sự đẩy về phía trước của than cho chuột nhắt trắng ăn (Janssen và Jageneau, 1957).

III. NGHIÊN CỨU CÁC THUỐC KHÁNG CHOLINESTERASE

Các thuốc kích thích những cơ quan được phân bố các dây thần kinh sau hạch của hệ thần kinh đối giao cảm có thể được phân loại thành ba nhóm. Nhóm thứ nhất gồm acetylcholin và các ester có liên quan, có tác dụng giống như tác dụng kích thích các sợi trước hạch của các hệ thần kinh giao cảm và đối giao cảm và các sợi sau hạch của hệ thần kinh đối giao cảm. Nhóm thứ hai gồm muscarin, pilocarpin, và arecolin là các thuốc tác dụng giống thần kinh đối giao cảm kiểu muscarin, không có tác dụng trên các sợi thần kinh trước hạch. Nhóm thứ ba gồm các chất ức chế cholinesterase, là enzym xúc tác sự thủy phân acetylcholin, khiến cho chất trung gian hóa học bị phân hủy nhanh chóng. Các thuốc kháng cholinesterase gây những tác dụng giống như khi acetylcholin được giải phóng và tồn tại ở nơi giải phóng. Ví dụ, physostigmin, do tác dụng ức chế cholinesterase, gây co đồng tử, làm tăng trương lực và hoạt động của ruột, gây co phế quản, kích thích tiết nước bọt, nước mắt, và sự thoát mồ hôi, và sự co các cơ, hoặc cơ trơn hoặc cơ vân.

Physostigmin được gọi là chất ức chế thuận nghịch của cholinesterase vì tác dụng nhất thời. Các phosphat có thể gây tác dụng kéo dài do sự ức chế dần dần không hồi phục và được gọi là các chất ức chế không thuận nghịch. Một số các chất sau có độc tính cao, lúc đầu đã được phát triển để dùng trong chiến tranh hơi độc. Công dụng chính của các thuốc kháng cholinesterase là dùng trong điều trị bệnh nhược cơ nặng, mất trương lực sau phẫu thuật (của ruột hoặc bàng quang) và bệnh tăng nhãn áp.

Phương pháp nghiên cứu

Burgen (1949) xây dựng một phương pháp đơn giản phát hiện các thuốc kháng cholinesterase là xác định sự giảm mức liều ngưỡng của acetylcholin cần thiết để gây chảy nước mắt có máu. Chuột cống trắng là động vật được lựa chọn vì đáp ứng rõ ràng và dễ phát hiện ở loài vật này.

Chuột cống trắng đực cân nặng 100 đến 200g được chia thành các nhóm, mỗi nhóm 6 con, có trọng lượng ± 15 g hoặc ít hơn, so với trọng lượng trung bình của nhóm.

Pha chế dung dịch acetylcholin bằng cách hòa tan 100 mg acetylcholin clorid và 100 mg $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ trong 100 ml một dung dịch nước chứa 0,8g natri clorid. Dung dịch acetylcholin này ổn định trong tủ lạnh trong vài tuần, có pH từ 4,1 đến 4,3.

Xác định liều ngưỡng của acetylcholin đối với mỗi chuột. Các liều dung dịch acetylcholin được tiêm dưới chỗ da không chắc ở sườn của chuột. Liều bắt đầu là 160 μg . Sau 3 phút, đưa một miếng giấy lọc vào túi kết mạc. Phản ứng dương tính là sự xuất hiện một vết đỏ nâu trên giấy, vì các thuốc muscarinic gây tiết nước mắt màu đỏ nâu, một hiện tượng gọi là huyết lệ. Nếu phản ứng dương tính, liều tiếp sau sẽ rút bớt 40 μg . Nếu không đạt được phản ứng dương tính, tăng liều acetylcholin thêm 40 μg cho đến khi một phản ứng dương tính xảy ra trong vòng 3 phút. Bằng cách này, xác định được liều tối thiểu gây huyết lệ. Liều ngưỡng xê dịch trong phạm vi 80 đến 250 μg đối với hầu hết tất cả chuột cống trắng.

Liều ngưỡng được lấy cho nhóm là liều mà ở đó một nửa số chuột của nhóm cho đáp ứng dương tính. Đối với một nhóm quy định, phạm vi xê dịch của độ nhạy cảm hẹp, phạm vi xê dịch của các liều ngưỡng cá nhân chỉ là ± 30 μg so với trị số trung bình. Có thể thực hiện thử nghiệm với acetylcholin cứ nửa giờ một lần.

Sau khi đã xác định được liều ngưỡng cho một nhóm, động vật được để trong lồng trong 30 phút. Chuột được tiêm màng bụng một thuốc ức chế cholinesterase, ví dụ, eserine sulfat, neostigmine methylsulfat (0,02 μg). Sau thời gian có hoạt tính tối đa (được xác định với hai hoặc nhiều nhóm hơn nếu cần), thử nghiệm với acetylcholin được nhắc lại.

Trước khi được dùng, mỗi chuột cống trắng được thử nghiệm với 0,25 mg/kg eserine sulfat, acetylcholin được cho 20 phút sau. Điều này thường gây giảm liều ngưỡng cá nhân từ khoảng 200 μg xuống khoảng 20 μg acetylcholin. Các thuốc được đánh giá bằng cách xác định liều ED_{50} , là liều thuốc mà ở đó 50% số động vật của một nhóm cho kết quả dương tính khi mỗi động vật được cho một nửa của liều ngưỡng acetylcholin của nó hoặc một phần năm của liều ngưỡng acetylcholin của nó.

CHƯƠNG 7

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC
TÁC DỤNG TRÊN HỆ THẦN KINH GIAO CẢM***GS. Đoàn Thị Nhu***I. NGHIÊN CỨU CÁC THUỐC TÁC DỤNG GIỐNG THẦN KINH
GIAO CẢM****MỞ ĐẦU**

Thuốc tác dụng giống thần kinh giao cảm là hợp chất có hoạt tính giống với epinephrin (adrenalin) ở ngoại biên. Epinephrin hoặc kích thích điện dây thần kinh giao cảm có thể gây nên một đáp ứng nào đó trong các đáp ứng sau đây: giãn đồng tử; tăng nhịp tim; tăng thể tích tâm thu ở tim; giãn mạch vành; co mao mạch ở da và niêm mạc; co mạch phổi, giãn cơ phế quản; ức chế tiết dịch vị; co cơ thắt dạ dày ruột; kích thích tử cung; co bao lách; sự phân hủy glycogen ở gan; sự tăng huyết áp.

Khi tiêm tĩnh mạch epinephrin cho động vật, cả huyết áp tâm thu và tâm trương đều tăng nhanh và sau đó cũng hạ xuống nhanh. Sự tăng nhịp tim có thể bị đảo ngược trong thời gian thí nghiệm do tác dụng đền bù của dây thần kinh phế vị ở tim. Tác dụng của dây thần kinh phế vị này có thể được dự phòng bởi một thuốc liệt thần kinh đối giao cảm. Đáp ứng tăng huyết áp tỷ lệ thuận với lượng epinephrin tiêm, nên có thể thực hiện định lượng sinh học các mẫu epinephrin bằng cách đo đáp ứng tăng huyết áp ở chó được tiêm atropin.

Trong một chương trình nghiên cứu sàng lọc, đôi khi có thể nhận ra một thuốc tác dụng giống thần kinh giao cảm bởi sự hiện diện của các tác dụng như giãn đồng tử, tăng độ sâu và tần số hô hấp, tăng hoạt động vận động, sự rụng lông, và sự nhạy cảm với việc sờ tay vào. Sự nhận biết hoạt tính giống thần kinh giao cảm đòi hỏi phải làm thực nghiệm nhiều sau khi phát hiện để chứng minh xem thuốc có

những tác dụng giao cảm nào, mức độ giống với epinephrin và các thuốc tương tự về tác dụng dược lý, và đáp ứng có phải là thứ phát đối với hoạt tính khác. Epinephrin được coi là có tác dụng do kích thích trực tiếp các thụ thể đặc hiệu, nhưng các thuốc khác có thể tác dụng do những cơ chế ít đặc hiệu và ít trực tiếp hơn.

CÁC PHƯƠNG PHÁP

1.1. Thử nghiệm tác dụng gây giãn đồng tử

Kích thước của đồng tử được điều chỉnh bởi hai lực đối lập: sự kéo do trương lực của các cơ tỏa tia làm giãn đồng tử và sự kéo của cơ thắt gây co đồng tử. Các sợi giao cảm, có các khớp thần kinh ở hạch cổ trên là sợi vận động đối với cơ tỏa tia. Các thuốc adrenergic tác dụng giống thần kinh giao cảm gây giãn đồng tử. Trương lực của cơ thắt được duy trì bởi các sợi đối giao cảm có các khớp thần kinh ngoại biên ở hạch mi. Vì thế, đồng tử có thể bị giãn bởi các thuốc liệt đối giao cảm, có tác dụng tại chỗ rõ rệt.

Những thuốc này cũng gây liệt cơ thể mi, làm đình chỉ sự điều tiết. Các thuốc tác dụng giống thần kinh giao cảm chỉ gây giãn đồng tử mà không gây đình chỉ sự điều tiết hoặc làm mất phản xạ với ánh sáng (co đồng tử đáp ứng với ánh sáng). Những thuốc này đối với người là: cocain, phenylephrin, ephedrin, và amphetamin, tất cả đều gây giãn đồng tử.

Để phát hiện hoạt tính giống thần kinh giao cảm, có thể do sự giãn đồng tử của chuột nhắt trắng, như đã được mô tả để phát hiện hoạt tính liệt đối giao cảm. Có thể sử dụng chuột cống trắng để nghiên cứu tác dụng gây giãn đồng tử một cách chính xác hơn. Sau khi tiêm tĩnh mạch 0,04 mg/kg epinephrin cho chuột cống trắng, đã xảy ra tác dụng giãn đồng tử ngắn. Đỉnh của tác dụng là sự tăng đường kính của đồng tử 2 mm, xuất hiện trong 30 giây và kéo dài trong 8 phút. Tác dụng mạnh hơn và kéo dài hơn sau khi tiêm dưới da từ 2 đến 3 mg/kg morphin. Các thuốc tác dụng giống thần kinh giao cảm có hoạt tính giống với epinephrin cũng có thể có tác dụng mạnh hơn sau khi tiêm morphin.

1.2. Thử nghiệm trên tử cung và kết tràng lên của chuột cống trắng

Tử cung chuột cống trắng được coi là nhạy cảm với epinephrin, nhưng có thể có hoạt động tự phát quá mức, được làm giảm bằng cách hạ nhiệt độ và giảm calci trong dung dịch Ringer (Gaddum và cộng sự, 1949). Thành phần bằng gam trong một lít là: NaCl 9,0; KCl 0,42; NaHCO₃ 0,5; glucose 0,5; CaCl₂ 0,06. Nhiệt độ của dung dịch ngâm là 29 đến 30°C, thể tích của nó là 2 ml. Các tử cung lớn nhạy cảm hơn tử cung nhỏ, nhưng gần đây các tử cung mang thai đã bị loại bỏ, vì chúng có nhiều hoạt động tự phát.

Acetylcholin (0,5 đến 1,0 μg) được cho vào dịch ngâm cứ 2 phút một lần, và được rửa sạch khi tác dụng ở mức tối đa (30 đến 40 giây). Các liều epinephrin, trong 0,21 ml dung dịch hoặc ít hơn, được cho vào dung dịch ngâm 1 phút trước một liều acetylcholin. Một liều epinephrin khác được cho vào ngay khi đáp ứng với acetylcholin bình thường. Sự trệch khỏi đáp ứng thông thường với acetylcholin là mức đo hoạt tính của epinephrin hoặc của một thuốc giống thần kinh giao cảm tương tự. Norepinephrin tương đối không có tác dụng trên tiêu bản này.

Một kỹ thuật tương tự đã được áp dụng cho 3 cm đầu của kết tràng lên. Không dễ dàng làm cho tiêu bản này trở nên yên tĩnh như tử cung. Nhiệt độ dung dịch ngâm được thay đổi, và dung dịch Ringer giống như dung dịch dùng cho tử cung, hoặc đôi khi như sau (g/lít): NaCl 9,0; KCl 0,4; CaCl_2 0,03; NaHCO_3 0,15; glucose 1. Nhiệt độ luôn ở trong phạm vi $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và được điều chỉnh để làm giảm hoạt động tự phát xuống mức độ yếu. Liều acetylcholin là 0,001 đến 0,01 μg (1 đến 10 ng). Như vậy cơ quan này nhạy cảm hơn với acetylcholin.

Để sàng lọc, liều thấp nhất của epinephrin hoặc thuốc thử nghiệm làm giảm đáp ứng của acetylcholin xuống một nửa, được lấy để đo hoạt tính giống như epinephrin.

1.3. Thử nghiệm trên manh tràng trực tràng của gà

Phần hẹp của manh tràng trực tràng được lấy ra từ một gà mái hoặc gà trống, 14 đến 20 tuần tuổi và bảo quản trong dung dịch Tyrode sửa đổi ở 4°C trong 2 đến 40 giờ (Cleugh và cộng sự, 1961). Thời gian bảo quản tối ưu là 18 giờ. Một đoạn dài 4 đến 5 cm được treo trong bình ngâm mô có thể tích 3 đến 5 ml. Các chuyển động của cơ dọc được ghi với độ phóng đại 15, và sức căng 1 đến 5g. Nhiệt độ tối ưu là 34 đến 35°C . Dịch ngâm chứa, bằng gam trong 1 lít: NaCl, 8; KCl, 0,2; CaCl_2 , 0,2; MgCl_2 , 0,01; NaHCO_3 , 1; NaH_2PO_4 , 0,05; glucose, 1. Thông khí với 95% oxy - 5% carbon dioxyl. (Dung dịch giống như dung dịch Tyrode trừ hàm lượng 10% thường có của magnesi clorid).

Các chu kỳ thí nghiệm chiếm 4 phút. Để thuốc tác động trong 30 giây trước khi rửa. Ephedrin, pha loãng $1:5 \times 10^6$, gây giãn cơ và ức chế các chuyển động tự nhiên.

Tiêu bản nhạy cảm với epinephrin gấp 40 lần so với norepinephrin. Để đối kháng với acetylcholin, dùng atropin. Để đối kháng với 5-hydroxytryptamin và catecholamin, dùng ephedrin.

Để thử thuốc, đáp ứng của mô trực tràng với sự có mặt của thuốc thử được so sánh với đáp ứng với epinephrin. Để xác định rõ thêm hoạt tính, những thuốc khác được cho vào dịch ngâm. Như vậy, để loại trừ đáp ứng do hoạt tính giống thần kinh

đối giao cảm, atropin được cho vào dịch ngâm với nồng độ 1×10^{-7} . Tương tự như vậy, để đối kháng với catecholamin và 5-hydroxytryptamin, ephedrin với nồng độ 5×10^{-6} được cho vào dịch ngâm. Methysergid với nồng độ 5×10^{-8} , làm giảm độ nhạy cảm của 5-hydroxytryptamin xuống 1/100 của trị số ban đầu.

1.4. Thử nghiệm trên lách cô lập của mèo

Lách được lấy từ mèo được gây mê bằng Nembutal (30 mg/kg) (De Gues và cộng sự, 1956). Sau một ngày để trong tủ lạnh ở 4°C , lách được phẫu tích thành những mảnh mô dài 4 cm và rộng 0,5 cm. Mảnh mô được cố định trong bình ngâm mô bằng thủy tinh, một đầu buộc vào bình ngâm, đầu kia buộc vào một đòn bẩy, cân nặng 2 gam. Ghi các co của mô trên máy ghi với độ phóng đại gấp 20 lần. Bình ngâm chứa 50 ml dung dịch Tyrode được đưa dần lên nhiệt độ hằng định $37,5^{\circ}\text{C}$. Thực hiện sự thông khí với oxy chứa 3 phần trăm thể tích carbon dioxyd. Sau thời gian giãn 2 giờ, tiến hành thử nghiệm trên mảnh lách bằng cách cho thuốc vào dịch ngâm.

Các chất sau đây gây co: epinephrin, $1:10^7$ (với một ít hoạt động nhịp nhàng chồng lên trên một sự co tăng trương lực); norepinephrin, $1:10^7$; phenylephrin hydroclorid, $1:10^5$; vasopressin, 5 đơn vị. Oxytocin không có tác dụng (De Gues và cộng sự, 1956).

II. NGHIÊN CỨU CÁC THUỐC PHONG BẾ THỤ THỂ α - ADRENERGIC

Mở đầu

Một số yếu tố góp phần vào các tác dụng sinh lý của các thuốc adrenergic. Các yếu tố gồm có các quá trình hấp thu và thay đổi do enzym, điều hòa nồng độ của các amin tác dụng giống thần kinh giao cảm ở vị trí của thụ thể (Trendelenburg, 1966, 1968). Ngoài ra, những thay đổi tự nhiên về độ nhạy cảm của mô và tương tác của thuốc ở các vị trí ngoài các thụ thể có thể gây sự hiểu sai trong đánh giá hoạt tính của các chất đối kháng (Furchgott, 1968). Cuối cùng, xét vì có rất nhiều vị trí tác dụng trong hệ thống adrenergic, các thử nghiệm có thể giúp phát hiện tác dụng của các thuốc không những ở các thụ thể mà còn ở các hạch và tế bào thần kinh giao cảm. Nét đặc trưng cuối cùng này có nhiều khả năng xảy ra trong các nghiên cứu trên động vật nguyên vẹn hơn là trên các mô nghiên cứu *in vitro* là điều có thể hiểu được.

Do đó, không thể sử dụng những phương pháp thực nghiệm được coi là lý tưởng về mọi mặt. Sự lựa chọn một phương pháp đặc biệt nhất thiết phải là sự điều hòa

giữa tính tiện lợi và ý nghĩa định tính hoặc định lượng của các dữ liệu thu được. Ví dụ, có thể xác định các tác dụng phong bế thụ thể khi nghiên cứu hoạt tính tim mạch của hợp chất. Tuy nhiên, sự đánh giá chi tiết các tác dụng đối kháng của các thuốc thử nghiệm, có liên quan tới việc xác định các chỉ số định lượng, luôn cần sử dụng các nghiên cứu *in vitro* và sự đánh giá cẩn thận các biến số thực nghiệm có thể có.

CÁC PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thử nghiệm trên các hệ cơ quan cô lập

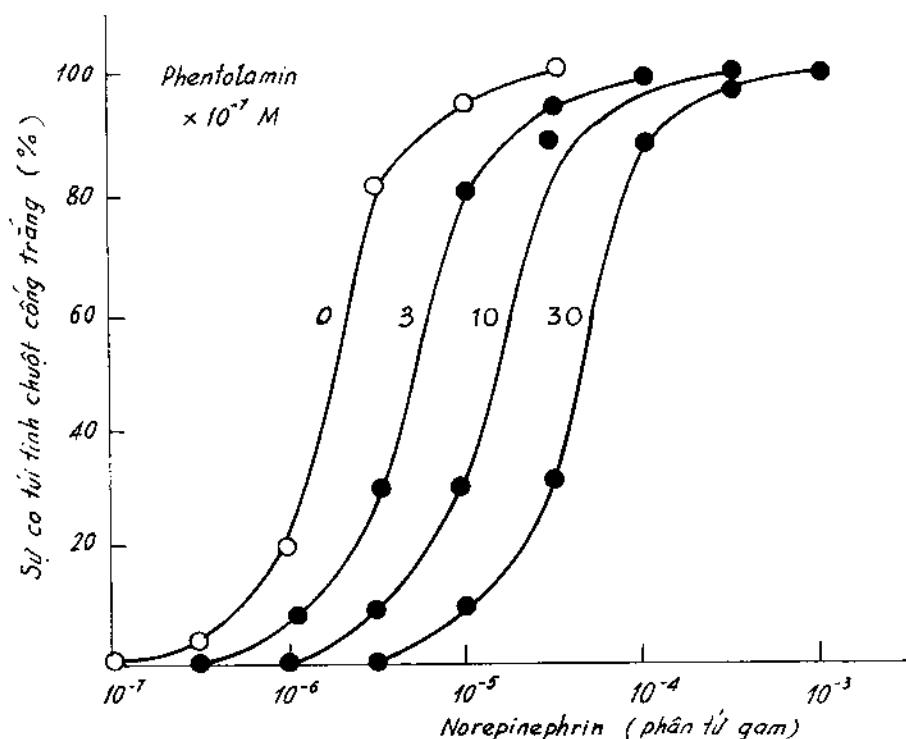
Việc sử dụng các hệ cơ quan cô lập có những lợi thế rõ rệt hơn các nghiên cứu *in vivo*. Có thể đo các đáp ứng tương đối chính xác từ nhiều tiêu bản, thường thu được từ một động vật. Những yếu tố làm phức tạp gặp phải *in vivo* như sự phân phối thuốc, hoạt tính thể dịch, và hoạt tính phản xạ được giảm thiểu nhiều hoặc tránh được. Cuối cùng, những phương pháp này có thể dùng để xác định và đánh giá so sánh các tác dụng phong bế thụ thể của các thuốc thử.

Sự kích thích các thụ thể alpha thường gây co cơ trơn có thể được ghi qua các hệ thống đẳng trương hoặc cùng kích thước. Tốt nhất khi các mô dùng trong thí nghiệm chỉ chứa các thụ thể alpha và có những thay đổi tối thiểu về độ nhạy cảm trong suốt thời gian thí nghiệm. Việc sử dụng phenylephrin, thay cho các chất chủ vận thường dùng như norepinephrin thích hợp hơn vì nó kết hợp ái lực thấp với các vị trí trước khớp thần kinh (Burgen và Iversen, 1965) với tác dụng mạnh, ưu tiên ở các thụ thể alpha.

Phương pháp thí nghiệm gồm vẽ sơ đồ một loạt các đường cong liều lượng - đáp ứng, một đường cong không có mặt chất đối kháng và những đường cong khác với sự có mặt của những nồng độ thay đổi của chất đối kháng.

Mô được gây co tối đa 2 hoặc ba lần ở lúc đầu thí nghiệm. Tiến hành xây dựng các đường cong liều lượng - đáp ứng bằng phương pháp mô tả bởi van Rossum và van den Brink (1963), trong đó các liều kế tiếp của chất chủ vận được cho vào bình ngâm khi mô đã đạt trạng thái cân bằng ổn định với liều trước. Sau khi đã đạt đáp ứng tối đa, chất chủ vận được rửa sạch khỏi bình ngâm và sự giãn hoàn toàn của mô xảy ra. Lúc đó cho chất đối kháng vào bình ngâm và để cho cân bằng với mô trong một thời gian quy định. Rồi cho chất chủ vận tác động trên mô và đạt được một đường cong liều lượng - đáp ứng mới, sử dụng một phạm vi thay đổi của liều đủ để lập lại đường cong liều lượng - đáp ứng ban đầu. Những đường cong liều lượng - đáp ứng tương tự được vẽ sơ đồ cho một phạm vi rộng các nồng độ của chất đối kháng.

Nếu các đường cong song song với nhau, có thể giải thích là có sự đối kháng cạnh tranh (hình dưới đây).



Tác dụng của phentolamin trên đáp ứng co của ống tinh chuột cống trắng với norepinephrin. Đáp ứng với norepinephrin đạt được khi có các nồng độ khác nhau của phentolamin. Sự đối kháng cạnh tranh được biểu lộ bằng sự chuyển dịch song song của các đường cong liều - đáp ứng của norepinephrin (van Rossum, 1965).

2.1.1 Thử nghiệm trên cơ trơn mạch máu

Một tiêu bản thường dùng trong loại này là sử dụng các mảnh cắt theo đường xoắn ốc của động mạch chủ thỏ (Furchgott và Bhadrakom, 1953; Furchgott, 1960). Tiêu bản này được dùng nhiều trong phân tích tác dụng của amin tác dụng giống thần kinh giao cảm và các chất đối kháng của chúng ở các vị trí của thụ thể (Bevan, 1960; Furchgott, 1954, 1967). Nó có nhiều lợi thế của một hệ cơ quan cô lập. Ví dụ, có thể thu được 3 hoặc 4 tiêu bản mô từ mỗi động mạch chủ, làm cho có thể thực hiện các nghiên cứu có đối chứng cặp đôi. Tiêu bản nhạy cảm với các liều thấp của thuốc chủ vận adrenergic, và mô vẫn ổn định sau khoảng thời gian dài. Thời gian cần thiết để mô ổn định là khoảng 2 giờ trước khi cho thuốc vào. Ngoài ra, các đáp

ứng co với các thuốc chủ vận α -adrenergic chậm, và sau khi rửa sạch thuốc, tiêu bản giãn ra chậm.

Thỏ cân nặng 2 - 3 kg bị giết bằng một cú đánh mạnh vào đầu, và ngực được mở để bộc lộ động mạch chủ. Rạch một đường ở phần xuống của động mạch chủ, và một que thủy tinh (3 - 4 mm đường kính) được luồn chậm vào. Động mạch chủ được lấy đi một cách cẩn thận, dùng que thủy tinh để hướng dẫn, và cắt theo đường xoắn ốc để có những mảnh mô rộng 2 - 3 mm và dài 3 cm. Các mảnh động mạch chủ được để cân bằng trong 2 giờ trong các bình ngâm cơ quan chứa dung dịch Krebs được bơm khí oxy ở 37°C. Thực hiện đo sự co của động mạch chủ bằng đòn bẩy đẳng trương (1: 10; 3,0 gam) hoặc qua một máy biến năng chuyển dịch lực. Các đường cong liều lượng - đáp ứng được vẽ sơ đồ đối với riêng thuốc chủ vận, và với sự có mặt của chất đối kháng. Sự chuyển dịch của đường cong liều lượng - đáp ứng sau khi đường cong đối chứng cho biết trị số ước lượng của tỷ lệ của liều, tỷ lệ này sau đó được dùng để tính pA_2 .

Trị số pA_x được định nghĩa là số âm của logarit cơ số 10 của nồng độ phân tử gam của một chất đối kháng có khả năng làm giảm tác dụng của một bội số liều x của một thuốc xuống bằng tác dụng của một liều đơn. Như vậy, nếu sự có mặt của một nồng độ $10^{-5.8}$ M pethidin trong dịch của một bình ngâm mô làm giảm tác dụng của 2 μ g histamin xuống bằng tác dụng gây bởi 1 μ g histamin khi không có pethidin, pA_2 của hệ pethidin - histamin là 5,8. Trị số pA_2 phải liên quan với một cặp thuốc - chất đối kháng được nêu rõ tác dụng trên một tiêu bản rõ ràng, ví dụ, hồi tràng chuột lang.

Những đoạn vòng tròn của động mạch chủ chuột cống trắng được dùng trong các thí nghiệm của Wohl và cộng sự (1967). Các đoạn động mạch chủ được treo giữa các móc không gỉ gài vào lòng ống sao cho các cơ của cơ vòng làm tăng áp lực không đẳng trương được đo bằng máy biến năng chuyển dịch lực. Để các mô cân bằng dưới áp lực 2 g trong 1 giờ trước khi đo các đáp ứng với thuốc. Cơ thể đạt được các đường cong liều lượng - đáp ứng tốt với norepinephrin bằng việc cho lũy tích catecholamin với thể tích 0,05 ml hoặc ít hơn. Các đáp ứng của mô vẫn ổn định và có thể thể hiện lại trong khoảng thời gian dài. Các thuốc đối kháng được cho vào sau khi 2 hoặc 3 đường cong liều lượng - đáp ứng với norepinephrin thể hiện gần giống nhau.

Một tiêu bản động mạch có độ nhạy cảm cao với norepinephrin đã được mô tả bởi de la Lande và Harvey (1965). Thỏ có tai thông xuống được gây mê với urethan (1,76 g/kg, tiêm trong màng bụng); động mạch trung tâm của tai được bộc lộ, và một đoạn 5 - 7 cm chiều dài của động mạch này được treo trong bình ngâm cơ quan. Động mạch được luồn canun ở đầu gần, và lòng ống được truyền với dung dịch

bicarbonat Krebs được duy trì ở 37°C và chứa 5-hydroxytryptamin creatinin sulfat (0,4 µg/ml). Dịch chảy ra từ động mạch được để tháo đi bằng dịch chuyển về phía trên; tốc độ truyền được duy trì ở khoảng 8 ml/phút. Các thuốc được tiêm vào hệ thống qua ống cao su lắp vào đầu gần của canun. Thay đổi về đường kính của động mạch gây bởi norepinephrin dẫn đến thay đổi về áp lực truyền có thể đo được bằng áp kế thủy ngân hoặc bằng máy biến năng áp lực. Lợi thế chủ yếu của tiêu bản này là sự ổn định của các đáp ứng và độ nhạy cảm cao với epinephrin (1 – 2 nanog/ml). Các đáp ứng với norepinephrin kiên định trong 6 giờ sau khi bắt đầu truyền, và có thể dùng mô sau khi bảo quản ở 4°C qua đêm. Có thể nghiên cứu các đáp ứng với norepinephrin với sự có mặt của các chất đối kháng bằng cách cho chất đối kháng vào dịch truyền.

2.1.2. Thử nghiệm trên túi tinh

Túi tinh cô lập của chuột cống trắng và chuột lang được dùng để đánh giá sự phong bế adrenergic gây bởi nhiều chất (Brugger, 1945; Rothlin và Brugger, 1945; Stone và Loew, 1952; Lewis và Miller, 1966). Túi tinh của chuột lang là mô đặc biệt thích hợp để nghiên cứu vì nó co khi có mặt catecholamin, histamin và acetylcholin, có ít hoặc không có hoạt động tự nhiên nhịp nhàng (Meier, 1950; Stone và Loew, 1952).

Chuột lang được cân nặng 300 - 600g bị giết, và túi tinh được lấy đi. Lượng chất chứa trong túi tinh có thể gây căng quá mức và ngăn cản sự co tối đa. Do đó chọc một lỗ nhỏ vào lòng ống ở đầu gần và thắt lại ở đó. Các túi chuẩn bị như thế này là những cấu trúc hình ống thẳng thay đổi từ 4 đến 7 cm chiều dài. Các mô được treo trong bình ngâm mô chứa dung dịch Locke được bơm khí oxy với 0,1% dextrose và duy trì ở 39°C. Ghi sự co gây bởi các amin tác dụng giống thần kinh giao cảm qua một hệ đòn bẩy đẳng trương (1:15, 1,0g) hoặc qua máy biến năng.

Các túi tinh chuột cống trắng được lấy đi bằng cách thức tương tự như với chuột lang. Cần có thêm sự thận trọng là phẫu tích cẩn thận các tuyến đồng khối vùng lân cận của túi tinh. Việc loại bỏ các tuyến đồng phải được thực hiện mà không gây tổn thương các túi tinh để tránh các đáp ứng không bình thường và sự giảm độ nhạy cảm. Các túi tinh được để cân bằng trong 15 - 30 phút trước khi được kích thích với thuốc. Ghi sự co gây bởi thuốc bằng một hệ đòn bẩy đẳng trương (1:10, 0,3g) hoặc bằng máy biến năng dịch chuyển lực.

Có thể sử dụng đáp ứng co của cơ quan này với catecholamin để nghiên cứu hoạt tính đối kháng của các hợp chất thử.

2.1.3. Thử nghiệm trên lách

Các mảnh lách mèo cô lập nhạy cảm với các catecholamin khi được treo trong dung dịch Tyrode hoặc dung dịch Mc Ewen thiếu hụt glucose và thích hợp để phân tích hoạt tính của các chất đối kháng α -adrenergic (Bickerton và cộng sự, 1962; Bickerton, 1963; Bickerton và cộng sự, 1966). Lách được lấy đi từ mèo qua một nhát rạch ở bụng và rửa trong dung dịch Tyrode ấm chứa một nửa các lượng thường dùng của natri bicarbonat và dextrose. Các cạnh và các đầu của lách được xén bớt, và phần trung tâm hình chữ nhật được chia thành 2 mảnh hoặc nhiều hơn của cơ trơn lách, mỗi mảnh dài khoảng 4,5 cm và rộng 1,5 cm. Các mô được để cân bằng 30 phút trong dung dịch Tyrode thiếu glucose được bơm oxy và duy trì ở 39°C. Có thể ghi sự co của các mảnh lách bằng một hệ đòn bẩy đẳng trương (1: 15; 5,0 g). Đáp ứng của tiêu bản này với các liều quy định của catecholamin tăng lên về biên độ trong giờ đầu của 5 thử nghiệm và sau đó vẫn tương đối đồng đều trong nhiều giờ (Bickerton và cộng sự, 1962).

Đáp ứng của cơ trơn lách với catecholamin chậm. Một sự co ban đầu nhanh được tiếp sau bởi một giai đoạn chậm hơn đạt một đỉnh kéo dài trong 3 - 5 phút. Những thay đổi có ý nghĩa về độ nhạy cảm xảy ra khi cho epinephrin và norepinephrin với liều lũy tích (Bickerton, 1963). Những thay đổi lớn nhất về độ nhạy cảm trên 2 đường cong liều lượng - đáp ứng lũy tích liên tiếp được nhận xét thấy ở các mức liều thấp của catecholamin, nghĩa là dưới một nửa đáp ứng tối đa. Điều này có thể gây nhầm lẫn khi đánh giá hoạt tính của một chất đối kháng thuận nghịch vì sự di chuyển của các đường cong do các thay đổi về độ nhạy cảm có thể được cho là một tác dụng của chất đối kháng. Có thể khắc phục khó khăn này bằng cách dùng các mảnh cặp đôi từ mỗi lách, một mảnh nhận chất đối kháng và một mảnh dùng làm đối chứng.

2.1.4. Thử nghiệm trên ruột

Hồi tràng thỏ cô lập với các dây thần kinh mạc treo ruột nguyên vẹn cung cấp một mô hình đơn giản và hữu ích để quan sát tác dụng của các chất đối kháng ở các tế bào thần kinh adrenergic và các thụ thể sau khớp thần kinh (Finkleman, 1930, Bowman và Hall, 1970). Thỏ non để nhịn đói trong 24 giờ bị giết và bụng được mở. Các đoạn (2 - 3 cm) ruột non (tá tràng, hỗng tràng, hoặc hồi tràng) và mạc treo ruột, gồm cả động mạch và dây thần kinh giao cảm đi kèm theo của mạc treo ruột, được lắp trong một bình ngâm cơ quan chứa dung dịch Tyrode hoặc Krebs được bơm khí (95% O₂ + 5% CO₂) ở 37°C. Thắt quanh đầu trung tâm của động mạch mạc treo ruột, và mạc treo ruột được luồn qua các điện cực nối với một máy kích thích. Sự kích thích (15 hertz) dây thần kinh adrenergic quanh động mạch nên giới hạn trong thời gian dưới 30 giây ở các khoảng cách dưới 3 phút để tránh sự mệt mỏi của tiêu

bản. Các cử động du đưa của ruột có thể được ghi trên máy ghi với một hệ đòn bẩy đẳng trương (1:20; 2,0 g) hoặc với máy biến năng chuyển dịch lực. Có vẻ như không có sự khác nhau giữa sự ghi đẳng trương và ghi cùng kích thước (Bowman và Hall, 1970).

Sự kích thích dây thần kinh giao cảm hoặc sự có mặt của các catecholamin ngoại sinh ức chế sự co của ruột. Tác dụng ức chế này được trung gian bởi các thụ thể α và β và bị phong bế bởi cả hai loại thuốc đối kháng với thụ thể adrenergic. Sự phân biệt các tác dụng ức chế α -adrenergic với các tác dụng trung gian bởi các thụ thể β dựa trên quan sát thực nghiệm là sự kích thích các thụ thể α -adrenergic gây sự bắt đầu ức chế nhanh, trong khi sự bắt đầu tác dụng ở các vị trí của thụ thể β chậm (van Rossum và Mugic, 1965; Bowman và Hall, 1970). Sự đánh giá các chất đối kháng α -adrenergic có thể tiến hành tốt nhất bằng việc dùng phenylephrin, một thuốc chủ vận của thụ thể α -adrenergic mà tác dụng ức chế bị phong bế bởi phentolamin trong khi vẫn không bị ảnh hưởng bởi các chất đối kháng với thụ thể β như propranolol (Bowman và Hall, 1970). Đầu trên, thu được các đáp ứng với phenylephrin và tiếp theo sau là rửa bỏ chất chủ vận khỏi hệ thống. Sau đó chất đối kháng được cho vào bình ngâm, và hoạt tính phong bế của nó được xác định bằng cách kích thích mô với các liều phenylephrin đã dùng lúc đầu. Do các biến đổi về độ nhạy cảm của mô, chỉ có thể ước lượng trị số gần đúng của pA_2 . Tuy nhiên tiêu bản này là một mô hình đơn giản và thuận tiện để thử nghiệm định tính nhanh các hợp chất ở các thụ thể adrenergic.

2.1.5. Thử nghiệm trên tử cung

Tử cung của các thỏ không mang thai đáp ứng với sự kích thích thụ thể α bằng sự co mạnh, và đáp ứng co này có thể dùng để đánh giá hoạt tính của các chất đối kháng với thụ thể α (Broom và Clark, 1923). Thỏ cân nặng ít nhất 2 kg bị giết và mở bụng. Kéo ruột sang một bên để bộc lộ hai sừng của tử cung được phẫu tích để loại bỏ mạc treo ruột dính vào. Cắt mỗi sừng tử cung thành những đoạn dài 2 – 3 cm, và mỗi phần được chia dọc để có 2 mảnh xứng hợp. Lợi thế của tiêu bản tử cung cô lập này là có thể có được một số (12 – 16) tiêu bản từ mỗi thỏ. Các mô được ngâm trong dung dịch Ringer được bơm oxy. Nếu cần, cho thêm magnesi clorid để ức chế co bóp tự nhiên. Một hệ thống đòn bẩy (1:5; 1,0 g) được dùng để ghi các co tử cung.

2.2. Thử nghiệm trên các hệ động vật nguyên vẹn

2.2.1. Thử nghiệm trên huyết áp động mạch

a. Thử nghiệm trên mèo và chó gây mê. Lợi thế chính của phương pháp thực nghiệm này là giúp phát hiện hoạt tính của thuốc thử ở những điểm khác nhau

trong hệ tác động thần kinh giao cảm (Smith, 1961). Có thể gây mê chó hoặc mèo bằng barbiturat, mặc dù α -cloralose được ưa dùng hơn cho mèo vì tác dụng gây mê ổn định và thường có tác dụng ức chế yếu hơn trên các chức năng tự quản. Đặt canun vào khí quản như thường lệ và cắt các thân thần kinh phế vị – giao cảm ở hai bên. Ghi huyết áp từ các động mạch đùi hoặc cảnh, và cho thuốc qua các tĩnh mạch đùi hoặc cảnh.

Epinephrin là một chất kích thích mạnh các thụ thể α và β . Sự kích thích các thụ thể alpha gây co mạch với đáp ứng tăng huyết áp là hậu quả, trong khi giãn mạch và đáp ứng hạ huyết áp là hậu quả của sự hoạt hóa các thụ thể β ở mạch máu. Một chất đối kháng adrenergic như phentolamin hoặc phenoxybenzamin chuyển đổi đáp ứng tăng huyết áp bình thường của epinephrin thành đáp ứng hạ huyết áp do phong bế các thụ thể α và do đó làm cho các tác dụng β của epinephrin thắng thế. Một trình tự thực nghiệm để chứng minh sự đối kháng α -adrenergic như vậy có thể (1) gây sự đảo ngược của đáp ứng tăng huyết áp của epinephrin thành đáp ứng hạ huyết áp và (2) làm giảm, nhưng không đảo ngược, đáp ứng tăng huyết áp của epinephrin ở động vật được điều trị trước với một thuốc đối kháng với thụ thể β , ví dụ, propranolol (1 – 3 mg/kg, tiêm tĩnh mạch).

b. Thử nghiệm trên chuột cống trắng bị chọc thần kinh trung ương

Phương pháp này có độ nhạy cảm tốt và thuận tiện để thử các chất tăng huyết áp (Shipley và Tilden, 1947; Brown và Gillespie, 1957) và đã được dùng để thử các thuốc có hoạt tính phong bế α -adrenergic (Graham, 1962). Chuột cống trắng cân nặng 200 – 300 g được cho atropin (3 mg/kg, tiêm trong màng bụng) 10 – 15 phút trước khi gây mê với ether. Thực hiện đưa canun vào khí quản và cắt dây thần kinh phế vị theo thường lệ. Chọc não bằng cách giữ đầu động vật căng ra và thẳng hàng với đốt sống và đưa que chọc vào qua hốc mắt và xuống ống sống. Động vật được nối ngay với máy hô hấp và tần số hô hấp được duy trì ở 50 – 60 lần thở vào/phút. Tĩnh mạch đùi được đặt canun để tiêm thuốc, và động mạch cảnh luồn canun để đo đáp ứng tăng huyết áp. Chuột cống trắng được tiêm heparin và hexamethonium (5 mg/kg) và được để cân bằng trong 30 phút.

Chuột cống trắng bị chọc thần kinh trung ương có huyết áp ổn định giữa 30 và 50 mmHg và đáp ứng một cách kiên định với việc tiêm tĩnh mạch norepinephrin hoặc epinephrin trong 4 – 6 giờ. Có thể đánh giá hoạt tính của các thuốc đối kháng α -adrenergic theo các trị số ED_{50} , có nghĩa là lượng của thuốc cần thiết để làm giảm 50% đáp ứng tăng huyết áp của một liều chuẩn của epinephrin hoặc norepinephrin. Cần chú ý hiệu chỉnh máy hô hấp để tránh tăng thông khí phổi hoặc căng phổi. Giới hạn các dung dịch tiêm ở dưới 0,2 ml.

2.2.2. Thử nghiệm trên mí mắt thứ ba

Đáp ứng co của mí mắt thứ ba của mèo với norepinephrin hoặc epinephrin cung cấp một phương pháp chứng minh hoạt tính phong bế giao cảm. Các thụ thể adrenergic của mí mắt thứ ba phần lớn thuộc typ α , mặc dù có sự hiện diện của chức năng β .

Gây mê mèo và cặp chắc đầu vào bàn mổ. Đưa canun vào khí quản, và cắt dây thần kinh phế vị và chuỗi giao cảm cổ ở hai bên. Một hệ đòn bẩy đẳng trương (1:10 ; 7,0 g), được mắc vào mí mắt thứ ba của một mắt, có thể được dùng để ghi đáp ứng co. Có thể đo đồng thời huyết áp từ động mạch đùi, và tiêm thuốc vào tĩnh mạch đùi và tĩnh mạch cảnh.

Đáp ứng co của mí mắt thứ ba bị đối kháng bởi phentolamin và phenoxybenzamin. Có thể tiêm thuốc trực tiếp vào động mạch cảnh ngoài qua một động mạch lười lượn canun (Morrison và Paton, 1953; Trendelenburg, 1959). Phương pháp này cho phép một nồng độ tương đối cao của thuốc tới mí mắt thứ ba và còn tránh sự thay đổi rõ rệt của huyết áp do tác dụng toàn thân.

III. NGHIÊN CỨU CÁC THUỐC PHONG BẾ THỤ THỂ β -ADRENERGIC

CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Thử nghiệm trên chứng tim đập nhanh gây bởi isoprenalin

Phương pháp chọn lọc nhất và thường dùng để thử tác dụng phong bế β -adrenergic là sự đối kháng với chứng tim đập nhanh gây bởi isoprenalin. Trong phương pháp của Levy và Ahlquist (1961), gây mê cho chó với morphin sulfat (10 mg/kg) và atropin sulfat (1 mg/kg) tiêm dưới da, và 30 phút sau tiêm tĩnh mạch pentobarbital natri (30 mg/kg). Nhịp tim được ghi liên tục với một huyết tốc kế điện tử, gây nên bởi máy ghi điện tim, nhưng một hệ thống ghi ít tinh vi hơn cũng có thể phù hợp. Tiêm vào tĩnh mạch cảnh 2 μ g/kg của một dung dịch 0,001 M của isoprenalin. Nhịp tim thay đổi từ khoảng 160 đến 250 tiếng đập/phút. Nếu cho trước dicloroisoprenalin (2 mg/kg), chứng tim đập nhanh sẽ chỉ ở mức nhẹ.

Thời gian tăng tối đa nhịp tim là sau 10 phút. Trong vòng 30 phút, nhịp tim trở về trị số trước khi tiêm. Thử nghiệm được nhắc lại ở các khoảng cách 30 phút sau khi cho các thuốc phong bế β -adrenergic.

Black và cộng sự (1965) thử nghiệm trên nhịp tim ở mèo gây mê. Mèo cân nặng 2 – 3 kg được gây mê bằng tiêm tĩnh mạch cloralose (80 mg/kg). Sau khi đưa canun vào khí quản, đo huyết áp đùi bằng một áp kế thủy ngân, và nhịp tim, bằng một máy đếm tiếng đập tim, và ghi trên máy ghi. Tiêm isoprenalin (0,2 μ g/kg) vào tĩnh mạch đùi ở các khoảng cách 8 phút. Nhịp tim tăng từ khoảng 190 đến 250

tiếng đập/phút. Sau khoảng 5 phút, nhịp tim giảm trở lại 190 tiếng đập/phút. Việc lặp lại các mũi tiêm isoprenalin sau khi bắt đầu truyền tĩnh mạch propranolol (2,5 µg/kg/phút) dẫn đến sự tăng nhịp tim từ khoảng 160 đến 180 tiếng đập/phút. Như vậy một thuốc phong bế β -adrenergic đã được xác định làm cho đáp ứng tăng nhịp tim đối với một thuốc kích thích β -adrenergic giảm đi nhiều.

3.2. Thử nghiệm trên đáp ứng của tử cung chuột cống trắng

Trong tử cung, chỉ có các thụ thể giao cảm thuộc typ β (Levy và Tozzi, 1963), do đó cơ quan này là một đối tượng thích hợp để chứng minh sự hoạt hóa và phong bế β -adrenergic.

Chuột cống trắng cân nặng 300 g hoặc hơn được dùng. Các mảnh tử cung được treo trong bình ngâm có thể tích 10 ml, ở 37°C, chứa dung dịch Locke (NaCl, 0,9% ; KCl, 0,042% ; CaCl_2 , 0,024% ; glucose, 0,1% ; NaHCO_3 , 0,05%) thông khí với 95% oxy và 5% carbon dioxyd. Ghi hoạt động tự nhiên một cách đẳng trương bằng hệ thống ghi với đòn bẩy, hoặc một cách không đẳng trương bằng một máy biến năng chuyển dịch lực.

Thu nhận được các đáp ứng ức chế đối chứng với epinephrin (0,02 µg/ml) và isoprenalin (0,02 µg/ml). Sau đó, một thuốc ức chế β -adrenergic được cho thêm vào bình ngâm. Sau khi hoạt động tự nhiên trở về trị số đối chứng, epinephrin được cho thêm vào và để tác động trong 3 phút. Không rửa, và cho thêm isoprenalin vào. Cả dicloroisoprenalin và pronethalol (5 µg/ml) đều làm mất các tác dụng ức chế của epinephrin và isoprenalin, có nghĩa là sự co tử cung có cùng tính chất như trong giai đoạn đối chứng, trước khi cho thêm epinephrin vào.

3.3. Thử nghiệm trên sự giãn cơ khí quản

Một phương pháp khác để đánh giá tác dụng phong bế β -adrenergic là sử dụng chuỗi vòng khí quản. Tiêu bản này được phát triển đầu tiên bởi Castillo và de Beer (1947). Độ nhạy cảm của cơ khí quản thay đổi nhiều giữa các động vật khác nhau. Foster (1960) đã khắc phục khó khăn này bằng cách dùng 2 chuột lang để thí nghiệm. Hai chuột lang cân nặng 600 – 800 g bị bất tỉnh do một cú đánh mạnh vào đầu và cắt đứt mạch máu cho chảy hết máu. Cắt lấy khí quản từ thanh quản đến cựa khí quản và cắt thành 8 vòng có cùng chiều rộng với kéo. Đếm các vòng, vòng thứ nhất từ thanh quản là số 1. Các vòng số lẻ của một chuột lang và các vòng số chẵn của chuột lang kia được nối buộc với nhau. Như vậy đã tạo nên 2 tiêu bản, mỗi tiêu bản có 8 phần. Ngâm mỗi chuỗi trong dung dịch Krebs ở 30°C và thông khí với 95% oxy và 5% carbon dioxyd.

Để 45 phút để chuỗi khí quản cân bằng trước mỗi thí nghiệm. Cho histamin diphosphat (4,0 $\mu\text{g/ml}$) vào bình ngâm để gây co thắt. Sau đó, cho isoprenalin (0,01 $\mu\text{g/ml}$) vào để làm giảm hoặc làm mất co thắt do histamin. Thí nghiệm được lặp lại với chất phong bế β -adrenergic được cho với các liều khác nhau vào bình ngâm trước khi cho isoprenalin. Nồng độ có tác dụng ức chế 50% sự giãn gây bởi isoprenalin được gọi là nồng độ có tác dụng 50 (EC_{50}).

CHƯƠNG 8

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ
THUỐC TÁC DỤNG TRÊN TIM VÀ MẠCH VÀNH

GS. Đoàn Thị Nhu

I. NGHIÊN CỨU THUỐC TRỢ TIM

Tác dụng cường tim của *Digitalis* và các thuốc tương tự trên tim bị suy là do nhiều tác dụng, trong đó tác dụng chính là làm cho các cơ tâm thất chậm hơn và năng suất cao hơn, là tác dụng làm tăng lực cơ cơ.

Theo Ahlquist (1962), có hai loại thụ thể adrenergic ở tim động vật có vú, các thụ thể beta trung gian các đáp ứng tăng lực cơ cơ và tăng nhịp tim do kích thích adrenergic, và các thụ thể alpha trung gian sự kích thích lạc vị gây bởi kích thích giao cảm.

CÁC PHƯƠNG PHÁP

1.1. Thử nghiệm trên cơ nhú tâm thất cô lập của mèo

Phương pháp của Schoepke và Shideman (1961) cho phép phát hiện dễ dàng tác dụng trên lực cơ cơ tim.

Trong khi gây mê với ether, tim của mèo được lấy đi nhanh, và từ tâm thất phải một cơ nhú mỏng được phân lập cẩn thận. Nó được cố định vào một giá đỡ bằng chất dẻo và được ngâm trong một bình ngâm mô chứa 100 ml của dung dịch Tyrode sửa đổi. Dung dịch được giữ ở nhiệt độ hằng định 38°C, và được thông khí với hỗn hợp 95% oxy và 5% carbon dioxyd.

Các cơ cơ được gây bằng một máy kích thích sóng vuông cung cấp, ở điện áp trên tối đa, một xung động mỗi giây trong 2/1000 giây. Ghi biên độ cơ trên máy ghi. Thuốc được cho vào bình ngâm sau khi cơ đã đạt một biên độ hằng định khi cơ, và các đáp ứng được tính bằng tỷ lệ phần trăm thay đổi so với biên độ ngay trước khi cho thuốc.

Dung dịch Tyrode sửa đổi chứa các chất sau đây tính bằng đơn vị mg/lít: natri clorid, 7000; kali clorid, 354; calci clorid dihydrat, 350; kali dihydrophosphat, 81; maginesi sulfat heptahydrat, 147 ; natri hydrocarbonat, 2100; và glucose, 900.

Để thử xem tác dụng tăng lực cơ cơ có phải do các catecholamin, có thể dùng cùng phương pháp này. Hai mươi giờ trước khi cắt lấy tim, tiêm cho mèo 3 mg/kg reserpin, làm giảm nồng độ catecholamin khoảng 93%. Nếu tác dụng tăng lực cơ cơ vẫn tồn tại ở mèo đã tiêm reserpin, thì đó là do một chất dẫn khác ngoài catecholamin.

Dicloroisoproterenol là một thuốc phong bế adrenergic, phong bế chọn lọc các tác dụng tăng lực cơ cơ và tăng nhịp tim của epinephrin và norepinephrin. Như vậy chất này có thể được dùng để phân biệt giữa các thuốc kích thích cơ tim do giải phóng các chất adrenergic và các thuốc tác động bởi cơ chế khác. Nó phong bế epinephrin trong nhiều giờ.

Mặt khác, cholin 2,6 - xylyl ether bromid (TM 10) phong bế các đáp ứng với kích thích dây thần kinh giao cảm với các liều không phong bế đáp ứng với tiêm epinephrin. TM 10 được coi là phong bế sự giải phóng chất trung gian adrenergic.

Các chất khác được coi là có tác dụng tăng lực cơ cơ và tăng nhịp tim qua chất trung gian adrenergic là tetramethylammonium, nicotin, tyramin và amphetamin, ephedrin, 2 - phenylethylhydrazin.

Trong phương pháp của Bennett và cộng sự. (1958) tim cô lập được gây suy thực nghiệm và sau đó được hồi phục bởi thuốc trợ tim.

Mèo được gây mê nhẹ với ether. Tim mèo được lấy đi nhanh chóng và đặt trong dung dịch Locke. Một cơ nhú mỏng, có đường kính 1 mm hoặc ít hơn, được cô lập cẩn thận khỏi tâm thất phải. Đặt một nút thắt thấp ở đường nối của cơ nhú và thành tâm thất phải. Một nút thắt cao được đặt quanh gân. Cơ được đặt trong một giá đỡ và ngâm trong bình ngâm mô chứa 20 đến 50 ml dung dịch Locke ở 37,5°C. Dung dịch được thông khí với 95% oxy và 5% carbon dioxyd. Nút thắt cao được nối với một đòn bẩy đẳng trương dùng cho tim, áp lực tâm trương lúc nghỉ là 2 g. Cơ được kích thích với tần số 60 lần trong 1 phút với một xung động sóng vuông kéo dài 1 đến 5 /1000 giây. Cơ được để thảng bằng trong 1 đến 2 giờ, cho tới khi một biên độ đều đặn đạt được. Sau đó cơ được ức chế với 0,025 mg/ml natri pentobarbital cứ 15 phút một lần cho tới khi đạt mức suy năng mong muốn, đó là 50%. Cho thuốc thử vào trong 1 ml hoặc ít hơn.

Đáp ứng được cho điểm như sau: 0, không thay đổi tính cơ; +1, sự tăng thêm biên độ từ xấp xỉ 50% đến 62% của trị số đối chứng; +2, sự tăng thêm biên độ tới 75% ; +3, sự tăng thêm biên độ tới 87% ; +4, biên độ phục hồi về trị số đối chứng. Thời gian để đạt tác dụng tối đa cũng được ghi.

Hiệu lực tương đối của các thuốc được tìm thấy bằng cách nhân số đảo của nồng độ phân tử gam/lít biểu thị bằng mM với +1, +2, +3, hoặc +4. Ouabain với nồng độ 1 phần trong $10^6 \times 0,00015$ mM, cho một đáp ứng +2 trong 1 giờ (Bennett và cộng sự, 1958).

1.2. Thử nghiệm trên tâm nhĩ mèo và chuột cống trắng

Để chứng minh các tác dụng trên lực cơ cơ và trên nhịp tim ở tâm nhĩ (Schoepke và Shideman, 1960), tim được cô lập nhanh chóng từ một mèo hoặc chuột cống trắng được gây mê bằng ether. Mô tâm thất, mỡ, mạch máu và mô liên kết được cắt bỏ khỏi tâm nhĩ, và tâm nhĩ được treo trong một bình ngâm tương tự như bình ngâm dùng cho cơ nhú. Dung dịch Locke, duy trì ở 38°C và được thông khí với 95% oxy và 5% carbon dioxyd. Biên độ co được ghi trên máy ghi. Sự tăng độ cao của các đường trên máy ghi sau khi cho thuốc vào bình ngâm được đo và so sánh với chiều cao trước khi cho thuốc, để biểu thị tác dụng tăng lực cơ cơ bằng tỷ lệ phần trăm của độ cao hoặc biên độ trước khi có ảnh hưởng của thuốc. Tác dụng tăng nhịp tim cũng được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm tăng số lượng các đường kẻ, sự đập của tim, trong một đơn vị thời gian.

Giết chuột cống trắng bằng một cú đánh vào đầu và cắt đầu. Tim được lấy đi nhanh chóng. Tâm nhĩ được giải phóng khỏi cơ tâm thất, mô liên kết, mỡ, các mạch máu, và sau đó đặt trong dung dịch Tyrode sửa đổi được duy trì ở 28°C và chứa $2,9 \times 10^{-8}$ M atropin sulfat. Dung dịch ngâm được thông khí với hỗn hợp 95% oxy và 5% carbon dioxyd. Dung dịch Tyrode sửa đổi có thành phần như sau: NaCl, 0,9%; KCl, 0,042%; CaCl_2 , 0,024%; NaHCO_3 , 0,05%; glucose, 0,10%. Nồng độ bicarbonat được dùng duy trì pH ở xấp xỉ 7,4. Tâm nhĩ được buộc vào một máy biến năng chuyển dịch lực, và lực co (áp lực lúc nghỉ khoảng 0,5 g) và số lần đập tự nhiên được ghi bằng máy đa ký. Tâm nhĩ được để cân bằng trong ít nhất nửa giờ sau khi được đặt trong bình ngâm và được rửa nhiều lần sau mỗi lần cho thuốc.

Thử tác dụng trợ tim của thuốc bằng cách cho thuốc vào bình ngâm và ghi biên độ và tần số của các sự co. Khi muốn chứng minh cơ chế tác dụng tăng lực cơ cơ tim của thuốc thử là do sự giải phóng norepinephrin, tiêm trong màng bụng cho một số chuột cống trắng reserpin với liều 1,5 mg/kg, 16 giờ trước khi giết chuột. Nếu tác dụng tăng lực cơ cơ thực sự do giải phóng norepinephrin thì nó sẽ giảm đi nhiều ở chuột được tiêm reserpin.

1.3. Thử nghiệm trên mảnh động mạch chủ thỏ cô lập (Furchgott và Bhadrakom, 1953)

Động mạch chủ của thỏ rất nhạy cảm với một số thuốc tác dụng trên tim và hệ mạch. Giết thỏ bằng một cú đánh mạnh vào đầu, và cắt họng cho chảy hết máu. Mở

lồng ngực và cắt rời động mạch chủ ở vị trí gần tim nhất, và phẫu tích lấy một đoạn dài nhất có thể được; để vào một đĩa chứa dung dịch Krebs và cắt với kéo nhỏ, đầu nhọn theo kiểu soán ốc để tạo nên một mảnh liên tục, rộng khoảng 4 mm và dài 30 đến 40 mm.

Buộc một sợi chỉ vào mỗi đầu và lắp tiêu bản trong dung dịch Krebs ở 37°C, được thông khí với hỗn hợp 95% oxy và 5% carbon dioxyd. Bình ngâm cơ quan tương đối dài và hẹp, giống như bình dùng cho mảnh dạ dày chuột cống trắng và thường có thể tích 10 đến 15 ml. Buộc một đầu của mảnh động mạch vào một cái ghim cố định trong bình ngâm và đầu kia vào đòn bẩy ghi hoặc tốt hơn vào một máy biến năng lực – di chuyển nối với một máy phóng đại và ghi điện. Tải lượng trên đòn bẩy là 3 đến 4 g và độ phóng đại khoảng 10 lần. Tiêu bản cần 30 phút hoặc hơn để ổn định sau khi phẫu tích.

Vì tiêu bản chỉ đáp ứng khá chậm và cần một thời gian dài để hồi phục, nên phải dùng một chu kỳ thời gian dài, còn dài hơn so với mảnh dạ dày chuột cống trắng. Để thuốc tiếp xúc với mô trong 2 phút, hoặc dài hơn nếu mảnh cơ còn đang co và để 8 phút cho cơ phục hồi trước khi cho vào liều tiếp sau. Nếu thuốc gây một tác dụng mạnh, cần một thời gian lâu hơn để mảnh động mạch giãn tới chiều dài ban đầu; có thể phải tới 30 phút. Nếu dùng một máy biến năng lực - di chuyển thay vì một đòn bẩy, có thể ghi một cách chính xác những thay đổi về chiều dài nhỏ hơn nhiều và như vậy làm giảm sự cần thiết gây những đáp ứng rất lớn cần phải đợi thời gian lâu để phục hồi.

1.4. Thử nghiệm trên tim thỏ cô lập truyền dịch (*Langendorff, 1895*)

Giết một con thỏ đực lớn còn non và cắt lấy tim, cùng với ít nhất 1 cm động mạch chủ dính vào, một cách nhanh nhất có thể được, và để trong đĩa chứa dung dịch Ringer - Locke ở nhiệt độ phòng. Nếu việc làm này phải mất thời gian dài hơn 2 hoặc 3 phút, tốt nhất là tiêm heparin 1000 đơn vị vào tĩnh mạch tai trước khi giết thỏ vì tiêu bản có thể bị tổn thương một cách không hồi phục nếu hình thành các cục máu đông trong tim. Tim được bóp vài lần khi lần đầu được đặt trong dung dịch Ringer - Locke để rửa bỏ máu đến mức tối đa có thể được. Xác định vị trí và tách động mạch chủ và cắt bỏ tất cả các mạch máu khác nối với tim.

Cắt động mạch chủ ngay dưới điểm mà nó phân chia và tim được chuyển đến thiết bị truyền, và động mạch chủ được buộc vào canun thủy tinh. Cần kiểm tra cẩn thận để bọt không khí không vào trong động mạch chủ và tất cả bọt không khí hình thành trong canun bị đẩy ra ngoài; dùng một ống hút nhỏ dài bằng polyetylen vào mục đích này. Dịch truyền là dung dịch Ringer-Locke được bơm oxy, chảy ở một áp suất hằng định từ bình chứa và được làm ấm ở 37°C bằng nước lưu thông từ thiết bị

ổn nhiệt. Áp lực của dịch truyền làm đóng van động mạch chủ, như vậy dịch chỉ chảy qua các mạch vành và chảy ra từ tĩnh mạch chủ dưới. Dịch được hứng trong một phễu đặt ở dưới buồng tim dưới và tốc độ chảy được đo bằng một bình hình trụ chia độ và đồng hồ bấm giờ, hoặc bằng một thiết bị ghi.

Buộc các sợi chỉ vào tâm thất bằng một cái móc và vào tâm nhĩ bằng một cái kẹp lò xo; các sợi chỉ này được nối vào đòn bẩy để ghi biên độ co tim. Tuy vậy, đôi khi khó nhìn thấy một cách thật đúng các chuyển động của tâm nhĩ, vì có thể bị che lấp bởi các chuyển động mạnh hơn của tâm thất. Tuy vậy, nên cố gắng ghi sự đập tâm nhĩ, vì đôi khi có thể gây rung tâm nhĩ và điều này có thể bị bỏ qua nếu chỉ quan sát thấy sự đập tâm thất.

Có thể lấy các số ghi một cách thuận tiện nhất về nhịp đập và lưu lượng tuần hoàn vành trong thời gian 30 giây. Nếu nhịp đập nhanh quá khó đếm, có thể cho chạy máy ghi ở tốc độ cao trong 15 đến 30 giây và tính các trị số trong đoạn ghi này. Cho thuốc vào tiêu bản bằng cách tiêm qua nắp cao su vào dịch truyền. Trong quá trình thí nghiệm, khi có thể tập trung dưới nắp này, đôi khi phải loại bỏ một phần chất khí này với một bơm tiêm để ngăn không cho vào động mạch chủ. Phải mất khoảng 15 giây trước khi thuốc tới tim, và trong phần lớn trường hợp, tác dụng của thuốc mất đi sau khi rửa bỏ thuốc. Cho máy ghi chạy liên tục và lấy các số ghi về nhịp đập và lưu lượng tuần hoàn vành cứ khoảng 2 phút một lần. Không được thử những liều thuốc tiếp theo cho tới khi tiêu bản đã hồi phục và nhịp đập đều, hoặc cho tới khi nhịp đập đã ổn định ở những mức đối chứng mới.

II. NGHIÊN CỨU THUỐC TÁC DỤNG TRÊN MẠCH VÀNH

Tầm quan trọng của các bệnh mạch vành ngày càng tăng, nên sự phát triển các thuốc chống đau thắt ngực có hiệu quả luôn là một nhiệm vụ của dược lý học. Để làm giảm cơn đau thắt ngực, nitroglycerin vẫn còn có vị trí quan trọng sau hơn 130 năm kể từ lần đầu tiên được sử dụng. Vấn đề nghiên cứu phát triển các thuốc chống đau thắt ngực là vấn đề phức tạp và nhiều kỹ thuật và phương pháp khác nhau đã được thử nghiệm.

CÁC PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thử nghiệm trên các cơ quan cô lập

2.1.1. Thử nghiệm trên mảnh động mạch vành cô lập

Các mảnh hoặc các đoạn động mạch vành được treo trong dung dịch Tyrode. Chúng thường mất trương lực và có thể làm tăng trương lực bằng cách xử lý trước với pituitrin. Tác dụng gây giãn của thuốc được ghi một cách đẳng trương. Không

thể tin chắc là các động mạch lớn có thể thử nghiệm trong nghiên cứu này có liên quan đến những thay đổi được gây nên về sức kháng của các tiểu động mạch và mao mạch. Không rút ra được kết luận về ảnh hưởng của chuyển hóa và tính co của cơ tim trên đáp ứng. Kỹ thuật này đã được thay thế bởi các phương pháp khác, nhưng có thể dùng kỹ thuật này để nghiên cứu cơ chế tác dụng của các chất tác dụng trên mạch vành.

2.1.2. Thử nghiệm trên tim cô lập Langendorff

Kỹ thuật tim cô lập Langendorff đã được biết từ hơn 100 năm và thường xuyên được sửa đổi (Charlier, 1961). Có thể dùng tim của nhiều loài động vật. Một tim cô lập được treo lên với một canun trong động mạch chủ hướng về các van động mạch chủ. Các động mạch vành được truyền, dưới áp suất và nhiệt độ hằng định, với các dung dịch muối được bơm oxy hoặc với máu. Do tổng lượng dịch trở về tĩnh mạch bằng lượng dịch tràn ra từ tâm nhĩ và tâm thất phải. Các thuốc thử nghiệm được cho thêm vào dịch truyền. Một số tác giả ưa rút dịch đồng thời từ tâm thất trái để tránh ảnh hưởng của sự rò rỉ từ các van động mạch chủ. Để tránh tác dụng của sự co của tim, Katz và cộng sự (1935) đã dùng tim bị rung được truyền dịch.

Tim cô lập Langendorff có lợi ích hạn chế. Cũng như trong trường hợp mảnh động mạch chủ cô lập, ảnh hưởng của thuốc trên huyết áp và sự làm việc của tim bị bỏ quên. Tốc độ truyền cao, trương lực mạch thấp, và dự trữ mạch vành giảm khi tim được truyền với dung dịch muối chứa ít oxy (Kadatz, 1966). Kỹ thuật này được dùng để so sánh các thuốc có liên quan về mặt hóa học và so sánh các tác dụng một cách định tính trên tính co và tính dễ bị kích thích của cơ tim.

2.2. Thử nghiệm đo lưu lượng máu ở mạch vành của tim tại chỗ

Winbury (1964) đã lưu ý một cách đúng đắn là việc đánh giá các thuốc chống đau thắt ngực trên động vật nguyên vẹn với việc xác định đồng thời lưu lượng mạch vành và các thông số huyết động lực khác cho kết quả tốt hơn.

Các thử nghiệm trên động vật gây mê được ưa dùng hơn các thử nghiệm trên động vật không gây mê vì kỹ thuật đơn giản hơn. Lưu lượng máu ở mạch vành có thể đo là lưu lượng máu chảy vào một động mạch vành sau khi đặt canun ở ngoài hay ở trong, hay lưu lượng máu chảy ra khỏi tĩnh mạch từ xoang vành.

2.2.1. Đo lưu lượng máu vào động mạch

Đo lưu lượng máu chảy vào động mạch ở một trong những động mạch vành lớn của chó. Theo kỹ thuật của Eckenhooff và cộng sự (1947), luồn một canun vào khí quản. Hô hấp với áp suất dương tính với không khí được duy trì với một máy hô

hấp. Hiệu chỉnh thể tích và tần số bơm sao cho CO_2 thở ra được giữ ở 30 mmHg, đo bằng một máy phân tích CO_2 .

Mở ngực qua khoang gian sườn thứ tư bằng đốt điện. Kẹp màng ngoài tim bằng một cái kẹp và rạch bằng đốt điện để tránh chảy máu, và khâu các mép của màng ngoài tim vào thành ngực để đưa tim vào một vị trí dễ tiếp cận. Rạch một vết nhỏ ở lá tạng màng ngoài tim trên động mạch trước xuống hoặc động mạch mũ, và tách khoảng 7 – 8 mm của động mạch khỏi mô bao quanh. Nếu chọn động mạch mũ, tiểu nhĩ trái bị kéo co vào với một sợi dây buộc nhỏ. Luồn hai dây buộc quanh động mạch. Sau đó, tiêm cho chó 400 đơn vị heparin, và tiêm nhắc lại liều này cứ 2 giờ một lần.

Đặt canun vào động mạch cảnh phải và nối bằng ống silicon cao su với một máy đo lưu lượng thích hợp, mà đầu ra được nối với canun thủy tinh động mạch vành. Toàn bộ hệ thống được đổ đầy máu tới đầu của canun động mạch vành và động mạch được buộc nhanh ở phía gần và cắt. Luồn canun vào, và để máu chảy qua từ động mạch cảnh qua máy đo lưu lượng và vào động mạch vành.

Máy đo lưu lượng được kết hợp với một máy đa ký thích hợp. Cần biết trọng lượng cơ tim được truyền bởi động mạch vành trong thử nghiệm để biểu thị trị số của lưu lượng bằng milimet trong một phút cho 100 gam. Có thể đánh giá trọng lượng bằng cách nhuộm diện tích với mực Ấn Độ, cắt lọc lấy và cân khi kết thúc thí nghiệm.

2.2.2. Đo lưu lượng chảy ra xoang vành

Có thể đặt canun vào xoang vành ở chó mở ngực từ tiểu tâm nhĩ phải, hoặc ở chó không mở ngực bằng sự hướng dẫn của máy soi huỳnh quang một ống thông dọc theo một tĩnh mạch cảnh (West và cộng sự, 1962a). Ống thông được buộc chặt tại chỗ ở lỗ vào bằng một dây buộc. Kỹ thuật được mô tả bởi Morawitz và Zahn (1912). Sự đo liên tục lưu lượng chảy ra xoang vành ở mèo với việc dùng một kỹ thuật đơn giản, đã được mô tả bởi Kaverina (1965).

Lưu lượng chảy ra xoang vành hầu như hoàn toàn từ tâm thất trái (Rayford và cộng sự, 1959). Điều kiện huyết động lực gần với bình thường hơn ở động vật có ngực kín và hô hấp bình thường. Tuy vậy cần thận trọng để tránh tăng áp lực trong xoang vành và như vậy làm giảm lưu lượng chảy ra do sử dụng một ống thông quá nhỏ hoặc do sức kháng gây bởi máy đo lưu lượng.

2.2.3. Đo sức kháng của mạch vành

Brown (1968) đã đánh giá sức kháng của mạch vành, thay vì lưu lượng, bằng cách truyền máu vào động mạch vành trái chính của mèo với một bơm nhu động có

lưu lượng hằng định. Áp lực được đo với một máy đo trong dòng chảy vào, bắt đầu từ động mạch chậu qua một ống polyetylen bao silicon. Một kỹ thuật tương tự đã được mô tả bởi Kaverina (1965).

Sự liên quan giữa áp lực và sức kháng của mô nền động mạch vành trái được biểu thị bằng phương trình.

$$\Delta P = R \times F$$

trong đó ΔP là áp lực động mạch vành trừ áp lực xoang vành, R là sức kháng của mạch vành, và F là lưu lượng vào động mạch vành. Những thay đổi về áp lực máu vào động mạch vành xấp xỉ bằng các thay đổi về sức kháng của động mạch vành nếu lưu lượng vào được giữ hằng định. Áp lực xoang vành ít thay đổi, và thường không thay đổi. Nhiệt độ máu được theo dõi liên tục bằng một cực dò của nhiệt kế điện tử và được duy trì ở 37°C bằng một bao nước ổn nhiệt. Lưu lượng động mạch vành thay đổi giữa 1,0 và 1,5 ml/g tâm thất trái/phút với áp lực trong vòng truyền động mạch lớn hơn 10-30 mm so với trong động mạch chủ.

2.2.4. Cách áp dụng thử thuốc

Việc tiêm thuốc vào một động mạch vành của tim tại chỗ làm cho có thể so sánh tác dụng của một số lượng lớn chất trên lưu lượng máu ở mạch vành một cách sơ bộ. Vì sự cung cấp bình thường của máu và oxy dưới sự kiểm soát của hệ thần kinh, nên các kết quả trên tim tại chỗ đáng tin cậy hơn kết quả thu được trên tim cô lập Langendorff.

Việc tiêm tĩnh mạch các thuốc thử nghiệm gần giống nhất với sự áp dụng điều trị trên người. Người ta ưa dùng đường cho thuốc này trong sự đánh giá đầu tiên các thuốc mới. Khi tiêm tĩnh mạch, có thể đo đồng thời các tác dụng trên huyết áp, nhịp tim, sự tiêu thụ oxy và các thông số huyết động lực khác. Một lợi thế khác của tiêm tĩnh mạch là có thể ghi thời gian kéo dài của tác dụng.

Đường uống được nghiên cứu sau. Ở động vật gây mê, việc đưa thuốc vào tá tràng qua một ống thông cho các kết quả đáng tin cậy hơn là đưa thuốc vào dạ dày qua một ống thông dạ dày. Lý do lợi thế của việc đưa thuốc vào tá tràng so với đưa thuốc vào dạ dày là khi gây mê, sự hoạt động và sự tháo rỗng của dạ dày bị ức chế, làm chậm trễ đáng kể sự hấp thu và vận chuyển của các chất chứa trong dạ dày vào ruột.

2.2.5. Các thông số huyết động lực khác

Có sự phụ thuộc gần gũi của lưu lượng máu ở mạch vành trên hoạt động của tim, thể tích tâm thu và huyết áp. Do đó, điều quan trọng cơ bản trong nghiên cứu thuốc mới là biết rõ tác dụng của thuốc không chỉ trên hệ mạch vành mà còn trên

các thông số huyết động lực khác. Cần phải đo đồng thời lưu lượng máu ở mạch vành, huyết áp tâm thu và tâm trương, lưu lượng máu ngoại biên, ví dụ như ở một động mạch đùi, tần số tim, và nếu có thể, lưu lượng máu ở động mạch chủ. Một máy biến năng áp lực, nối với một động mạch cảnh, và một máy đo lưu lượng điện từ cho nhánh động mạch vành xuống trái được dùng và cho kết quả tốt. Hiệu suất của tim và thể tích tâm thu có thể được tính toán bằng máy điện toán ở chỗ, một cực dò lưu lượng được đặt quanh động mạch chủ lên của động vật này.

2.2.6. Chuyển hóa ở cơ tim

Lưu lượng mạch vành thường thay đổi với mức chuyển hóa ở cơ tim. Việc đo sự tiêu thụ oxy ở cơ tim cùng với các yếu tố khác ảnh hưởng đến lưu lượng máu ở mạch vành cung cấp thông tin quan trọng.

Thuốc nào gây sự gián gián tiếp động mạch vành do làm tăng yêu cầu về oxy hoặc sự làm việc của tim có thể được coi là nguy hiểm đối với bệnh nhân có suy tuần hoàn vành. Tuy nhiên, một thuốc làm tăng lưu lượng mạch vành nhiều hơn sự làm việc của tim và sự tiêu thụ oxy sẽ làm giảm sự chênh lệch động – tĩnh mạch về oxy, và có thể được coi là có ích vì sự cung cấp oxy vượt quá yêu cầu.

a. Sự chênh lệch động tĩnh mạch về oxy

Sự tiêu thụ oxy ở cơ tim được tính bằng sự chênh lệch động tĩnh – mạch về oxy nhân với tốc độ của tuần hoàn vành (thể tích $A-VO_2$ x tốc độ tuần hoàn vành biểu thị bằng ml/phút). Phần lớn các nhà nghiên cứu đã xác định lượng chứa oxy của máu động mạch và xoang vành bằng kỹ thuật Van Slyke (Van Slyke và Neill, 1924). Có thể ghi liên tục áp suất của oxy hoặc sự bão hòa oxy bằng cách dùng một điện cực oxy kiểu Clark, hoặc một máy đo oxy - máu. Một ống thông lấy mẫu bằng chất dẻo được đưa vào xoang vành. Sự bão hòa oxy được theo dõi liên tục bằng việc rút máu qua máy đo oxy - máu chậm. Để tránh sự lắng đọng máu trên bề mặt của chậu, tiêm cho động vật khoảng 1000 đơn vị quốc tế heparin/kg thể trọng. Những thay đổi nhanh về tiêu thụ oxy gây bởi việc tiêm thuốc được theo dõi bằng máy đo oxy – máu.

b. Đo áp suất của oxy

Việc đo áp suất của oxy bằng phương pháp cực phổ là một kỹ thuật chuyên môn hóa. Một điện cực được phủ màng (cung cấp bởi hãng Beckman Instruments) cho phép đo áp suất oxy ở máu động mạch hoặc xoang vành, rút ra bằng ống thông như trong phương pháp đo oxy – máu (Schaper và cộng sự, 1963).

Các vi điện cực bằng bạch kim đầu mở (với đường kính của đầu 15 – 30 μ) để xác định áp suất của oxy ở cơ tim được đặt ở độ sâu khoảng 2 mm trong thành tâm

thất trái của chó (Kadatz, 1969). Những vi điện cực này không đo áp suất oxy trong tế bào mà trong một hình cầu có đường kính khoảng 60 μ . Các số ghi bị ảnh hưởng bởi lưu lượng máu mao mạch, lượng chứa oxy của huyết tương và các thay đổi về sự tiêu thụ oxy. Các sự khác biệt cho thấy việc đo áp suất oxy với kỹ thuật này không chỉ phản ánh những thay đổi về lưu lượng máu ở mạch vành.

2.3. Thử nghiệm trên thiếu năng động mạch vành thực nghiệm

Các phương pháp được mô tả ở trên cho phép nghiên cứu tác dụng của thuốc trên tuần hoàn máu ở mạch vành khỏe mạnh. Mối liên quan giữa các kết quả nghiên cứu của các phương pháp này với bệnh động mạch vành ở người tương đối ít. Để tạo nên các thí nghiệm ở động vật tái hiện điều kiện lâm sàng gần giống hơn, đã phát triển nhiều phương pháp để gây thiếu năng động mạch vành thực nghiệm. Dưới đây một số phương pháp phổ biến được mô tả ngắn gọn cũng như các kỹ thuật dùng để nghiên cứu sự cung cấp máu và cung cấp oxy cho các vùng bị suy của cơ tim.

2.3.1. Gây tắc động mạch vành cấp tính

Sau sự thất cấp tính một động mạch vành lớn ở chó, tỷ lệ chết giảm xuống sau khi điều trị trước các động vật với atropin, papaverin, xanthin và aminophyllin, (Gregg, 1950). Cơ chế của tác dụng này không được biết một cách chắc chắn vì dường như chưa chắc đúng là thuốc đã gây tăng lưu lượng máu còn lại ở vùng lúc đầu được nuôi bởi động mạch đã bị tắt (Kattus và Gregg, 1959).

Dòng chảy ngược từ đầu ngoại biên của động mạch vành đã bị tắt, áp suất ngược ở bên kia vị trí tắc, và kích thước của thiếu máu cục bộ gây nên có thể được dùng để nghiên cứu tác dụng thuốc. Ngoài ra việc quan sát điện tâm đồ lá tạng màng ngoài tim của vùng thiếu máu cục bộ, sau khi gây tắc toàn phần hoặc một phần một nhánh động mạch chủ lớn, đã được dùng để nghiên cứu tác dụng của thuốc bởi nhiều tác giả. Các thay đổi trên điện tâm đồ xảy ra sau khi làm giảm 35 - 70% lưu lượng máu bình thường.

Pituitrin gây co động mạch vành cấp tính với những thay đổi trên điện tâm đồ ở tim cô lập và tim tại chỗ và các dấu hiệu nguy cấp ở chó không gây mê (Lindner và cộng sự, 1953). Đã nhận xét thấy tác dụng đối kháng với pituitrin sau khi cho các thuốc giãn động mạch vành trong thử nghiệm trên tim cô lập Langendorff cũng như trên tim nguyên vẹn. Còn cần phải chứng minh một cách đầy đủ phương pháp này có hay không có khả năng phát hiện hoạt tính chống đau thắt ngực.

2.3.2. Gây tắc động mạch vành phát triển dần

Vineberg và cộng sự (1962) đã mô tả một phương pháp gây tắc động mạch vành phát triển dần bằng cách đặt một băng quấn ameriod quanh một nhánh động mạch

vành lớn. Sự phồng dãn lên của vật liệu chất dẻo làm tắc lòng ống trong vòng 3-4 tuần. Một kỹ thuật tương tự mô tả bởi Asada và cộng sự (1962) dùng bột biển gelatin bão hòa với dicetyl phosphat. Trên các động vật có thiếu năng động mạch vành gây bởi các băng quăn, có thể thực hiện các thử nghiệm về giảm oxy không khí thở vào, khả năng làm việc, và sự phát triển nhánh bên, được mô tả sau đây.

Có thể đạt được sự tương tự với bệnh vữa xơ động mạch vành bằng cách gây vữa xơ động mạch thực nghiệm ở động vật. Cross và Oblath (1962) đã gây vữa xơ động mạch cho chó bằng một chế độ ăn chứa cholesterol, thiouracil, thịt và mỡ lợn. Các động vật này cho thấy một ảnh hưởng trên mối quan hệ huyết áp - lưu lượng sau khi cho norepinephrin.

Karp và cộng sự (1960) chứng minh ở thỏ được cho thức ăn chứa 2% cholesterol có sự giảm đoạn ST trên điện tâm đồ sau khi cho ergometrin maleat. Theo Winbury (1964), ở thỏ vữa xơ động mạch, còn có tỷ lệ phần trăm giảm đoạn ST cao hơn trong thử nghiệm giảm oxy không khí thở vào. Melville và Varma (1962) phối hợp giảm oxy không khí thở vào và ergometrin trong một thử nghiệm đồng thời ở thỏ vữa xơ động mạch với 100% kết quả dương tính. Phần lớn các thuốc giãn động mạch vành, bao gồm cả nitroglycerin, không có tác dụng dự phòng đáp ứng của thỏ trong thử nghiệm này.

2.3.3. Thử nghiệm đo sự phát triển nhánh động mạch vành bên

Những phương pháp thích hợp để quan sát lưu lượng máu bên của động mạch vành và sự phát triển của động mạch vành bên có tầm quan trọng cơ bản. Các thuốc giãn mạch vành tác dụng kéo dài đã được chứng minh có tác dụng làm tăng số lượng và kích thước của nhánh bên liên động mạch ở chó và lợn sau khi dùng lâu dài (Vineberg và cộng sự, 1962, Meesmann và Bachmann, 1966). Tác dụng này chắc rằng có tầm quan trọng lớn hơn tác dụng giãn mạch cấp tính vì khả năng giãn của động mạch vành có thể rất hạn chế ở tim vữa xơ động mạch. Một kích thích có hiệu quả hơn để phát triển nhánh động mạch bên là sự tắc cấp tính hoặc phát triển dần của một hoặc nhiều nhánh động mạch vành lớn.

Các phương pháp mô tả ở phần tiếp theo có liên quan với mức độ và khả năng về chức năng, của sự cung cấp máu của nhánh bên.

2.3.3.1. Các phương pháp chức năng

a. Tỷ lệ sống sót

Sau sự điều trị trước trong nhiều tuần với dipyridamol, 10 trong 12 chó sống qua được sự thắt cấp tính động mạch vành xuống trái, trong khi 10 trong 11 chó ở nhóm đối chứng đã chết (Schmidt và Schmier, 1967). Những kết quả tương tự đã

đạt được bởi Lumb và Hardy (1963) đối với pentaerythrityl tetranitrat. Tất cả các tác giả đã chứng minh sự tăng số lượng các động mạch bên kết hợp với sự tăng tỷ lệ sống sót.

b. Các tác dụng huyết động lực của sự tắc động mạch vành cấp tính

So sánh các chó được điều trị trước với các chó trong nhóm đối chứng sau sự tắc động mạch vành phải tạm thời. Đo huyết áp và áp suất trong tâm nhĩ (Schmidt và Schmier, 1966a). Sự dung nạp đối với tắc động mạch vành tăng lên đáng kể sau sự dùng dài ngày dipyridamol. Thêm vào đó, tốc độ truyền sau khi chết của hệ mạch vành của chó điều trị cao hơn hai lần so với chó đối chứng, điều này chứng tỏ sự tăng tạo mạch của tim gây bởi thuốc.

c. Đo lưu lượng ngược và áp suất ngược

Lưu lượng ngược từ mỗm cụt ngoại biên của một nhánh động mạch vành bị tắc là thước đo dung lượng của các nhánh bên liên động mạch vành; kỹ thuật thực nghiệm là của Kattus và Gregg (1959).

Điều kiện thực nghiệm có phần nào không sinh lý vì trong khi đo lưu lượng ngược, huyết áp trong vùng gần bằng không. Lượng máu rời vùng bị nhồi máu thường qua các mao mạch tới các tĩnh mạch không giống lượng máu thu được qua canun lưu lượng ngược. Đã nhận xét thấy sự khác biệt giữa lưu lượng ngược và lưu lượng bên khi xác định bằng các phương pháp khác (Rees, 1969).

Việc đo áp suất ngược từ chỗ tắc có thể là phương pháp tốt hơn. Kỹ thuật này có lợi thế thêm là cho phép đo dài hạn sau khi đưa một ống thông nhỏ bằng chất dẻo vào đầu ngoại biên của động mạch và cố định tại chỗ (Schaper, 1967; Linder và Seeman, 1967).

2.3.3.2. Các kỹ thuật hình thái học

a. Chụp tia X mạch sau khi chết

Thường dùng chụp tia X mạch sau khi chết để giúp trông thấy các nhánh bên bằng cách tiêm một chất cản tia X vào một động mạch vành đơn hoặc vào rễ động mạch chủ (Vineberg và cộng sự, 1962), với sự giúp đỡ của phương pháp đo lập thể bằng tia X của Fulton (1965). Schaper mô tả một sự sửa đổi đơn giản hơn của kỹ thuật đo lập thể bằng tia X (1967).

b. Mô học định lượng

Đã có nhiều thử nghiệm dùng các kỹ thuật mô học định lượng để nghiên cứu sự phân bố mạch ở cơ tim. Leon và Bloor (1968) xác định diện tích mặt cắt chéo các

động mạch vành trái và phải và đếm tỷ lệ mao mạch/sợi. Chiều dày của thành các mạch nhánh bên liên động mạch được đo trong khi chiếu các phim đèn chiếu trên màn hình, và quan sát tốc độ của sự nguyên phân (Schaper, 1967).

2.4. Nhận xét kết luận

Trên đây chỉ trình bày những phương pháp thử nghiệm các thuốc tác dụng trên mạch vành. Việc nghiên cứu tìm kiếm các thuốc chống đau thắt ngực khó khăn vì không thể gây chứng đau thắt ngực trên động vật thí nghiệm. Các tác dụng dược lực học của các thuốc giãn động mạch vành xác định trong thực nghiệm trên động vật có thể áp dụng khá tốt trên người. Tuy nhiên, sự tương quan giữa tác dụng giãn động mạch vành và hoạt tính chống đau thắt ngực rất ít, ngay cả với các thuốc không có tác dụng không mong muốn. Chỉ có thể xác định một chất mới là một thuốc chống đau thắt ngực trong các thử nghiệm lâm sàng vì khả năng tiên đoán từ các thí nghiệm trên động vật sang chứng đau thắt ngực trên người không đáng tin cậy trong điều kiện hiện nay.

Trong nghiên cứu thuốc mới về hoạt tính chống đau thắt ngực, đầu tiên nên thử nghiệm bằng đường tiêm tĩnh mạch cho chó, đo lưu lượng động mạch vành và các tính chất huyết động lực khác như đã mô tả. Có thể dùng phổ các hoạt tính của các nitrit làm chuẩn. Sau đó, chứng minh hoạt tính sau khi uống. Cuối cùng, xác định các tác dụng không mong muốn, ví dụ, sự tăng tiêu thụ oxy ở cơ tim, là cơ sở để loại bỏ một chất.

CHƯƠNG 9

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ
THUỐC CHỐNG HUYẾT KHỐI VÀ
THUỐC CHỐNG TĂNG HUYẾT ÁP***GS. Đoàn Thị Nhu***I. NGHIÊN CỨU THUỐC CHỐNG HUYẾT KHỐI**

Sự hoạt hóa tiểu cầu đóng một vai trò chủ chốt trong bệnh sinh vữa xơ động mạch, bệnh tim mạch và trong quá trình hình thành huyết khối, và sự kết hợp tiểu cầu được gây bởi các chất chủ vận bao gồm adenosin diphosphat, collagen, thrombin và thromboxan A_2 (TXA₂). Sự kích thích với collagen dẫn đến sản sinh acid arachidonic và thromboxan A_2 từ các phospholipid thông qua phospholipase A_2 và thromboxan A_2 synthase, tương ứng.

CÁC PHƯƠNG PHÁP**1.1. Thử nghiệm trên các mô hình huyết khối thực nghiệm****1.1.1. Mô hình huyết khối gây bằng phương pháp quang hóa học
(Suzuki và cộng sự, 2001)**

Trong mô hình huyết khối gây bằng phương pháp quang hóa học, chuột nhắt trắng đực được gây mê với natri pentobarbital (80 mg/kg, tiêm trong màng bụng) với thân nhiệt được duy trì ở 37°C trong suốt thí nghiệm bằng một cái đệm sưởi ấm. Đặt một canun vào tĩnh mạch cảnh phải để tiêm rose bengal, và một canun vào tĩnh mạch cảnh trái để tiêm thuốc. Bộc lộ cẩn thận động mạch đùi trái và đặt trên động mạch một máy dò lưu thông máu mạch đập Doppler (PDV-20, Crystal Biotech America USA) để theo dõi lưu thông máu. Thực hiện sự chiếu sáng qua mô đoạn bộc lộ với ánh sáng xanh lá cây (bước sóng 540 nm) bằng một đèn xenon với một thiết bị lọc hấp thu nhiệt và một thiết bị lọc xanh lá cây (Hamamatsu Photonics, Japan).

Sự dọi tia được điều khiển với một sợi sợi – quang được đặt ở vị trí cách xa 5 mm với đoạn động mạch gần với máy dò lưu thông máu. Sau khi xác định trị số cơ bản của lưu thông máu, bắt đầu tiêm truyền thuốc thử nghiệm. Sau một số phút kể từ khi bắt đầu tiêm truyền thuốc thử nghiệm (tùy theo từng loại thuốc, ví dụ, đối với aspirin là sau 10 phút), bắt đầu rọi tia, sau đó tiêm truyền rose bengal trong 3 phút với liều 15 mg/kg. Theo dõi lưu thông máu trong 20 phút sau khi bắt đầu tiêm truyền rose bengal. Sự tạo thành cục huyết khối gây nghẽn mạch được thể hiện bởi sự ngừng hoàn toàn lưu thông máu trong 1 phút. Thời gian cần thiết để đạt sự nghẽn hoàn toàn này được ghi là thời gian nghẽn mạch. Nếu thuốc có tác dụng sẽ kéo dài thời gian tới khi nghẽn mạch.

1.1.2. Mô hình huyết khối gây bằng kết hợp collagen và epinephrin (Yun - Choi, 2001)

Trong mô hình huyết khối cấp tính gây bằng kết hợp của collagen và epinephrin (adrenalin) trên chuột nhắt trắng, tiêm vào tĩnh mạch đuôi chuột một hỗn hợp collagen (300 µg/kg) và epinephrin (30 µg/kg) để gây huyết khối cấp tính. Trong vòng 1 phút sau khi gây huyết khối, tất cả chuột trở nên bất động, mắt lồi to và bắt đầu há miệng thở hổn hển. Phần lớn các chuột chết trong vòng 1 đến 3 phút, các chuột khác vẫn bất động và tiếp tục thở nhanh và không thể đi được, ngay cả khi bị chọc vào cơ thể, và chỉ có một số ít chuột hồi phục khỏi sự liệt trong vòng 15 phút và có thể cử động. Mỗi chuột nhắt được quan sát cẩn thận trong 15 phút để xác định xem chuột bị liệt, chết, hoặc phục hồi khỏi sự liệt gây bởi huyết khối cấp tính.

Cho uống thuốc thử nghiệm ngày một lần trong 3 ngày liên tiếp. Nếu thuốc có tác dụng chống huyết khối, sẽ làm tăng tỷ lệ chuột phục hồi khỏi huyết khối cấp tính.

1.1.3. Mô hình tạo huyết khối trong ống shunt (rẽ tắt dòng) động - tĩnh mạch (Yun - Choi, 2001)

Để nghiên cứu tác dụng trên sự tạo thành cục huyết khối trong ống shunt động - tĩnh mạch, gây mê chuột cống trắng với ketamin (250 mg/kg) và đặt một ống shunt động - tĩnh mạch (A-V) giữa động mạch chủ bụng và tĩnh mạch thận. Phương pháp đặt shunt A-V được sửa đổi bởi Kim và cộng sự (1998) được áp dụng. Ống shunt được làm từ ống polyetylen (dài 18 cm, chứa 5 cm sợi bông) và được cho đầy nước muối đẳng trương trước khi đặt. Sau sự lưu thông máu qua ống shunt trong 20 phút, lấy cục huyết khối tạo nên trên sợi bông ra khỏi ống shunt. Xác định trọng lượng của cục huyết khối bằng cách trừ trọng lượng của sợi thấm máu khỏi tổng trọng lượng.

Cho chuột uống thuốc thử nghiệm ngày một lần trong 3 ngày liên tiếp. Tác dụng chống huyết khối thể hiện ở sự giảm trọng lượng cục huyết khối ở nhóm thử thuốc so với trọng lượng này ở nhóm đối chứng.

1.2. Thử nghiệm tác dụng trên sự kết tập tiểu cầu

1.2.1. Thử nghiệm trên tiểu cầu máu người *in vitro*

a. Theo phương pháp mô tả bởi Tawata và cộng sự (1990): Lấy máu từ những người tình nguyện khỏe mạnh với sự có mặt của 1/10 thể tích acid citric 3,8%. Thu được huyết tương giàu tiểu cầu bằng ly tâm (150 x g, 15 phút) ở nhiệt độ phòng. Bổ sung PGE_1 để có nồng độ cuối cùng 1 μM , và sau đó ly tâm lần nữa (400 x g, 15 phút) ở nhiệt độ phòng. Hòa tiểu cầu thành dịch treo trong dung dịch đệm Hepes – Tyrode (NaCl 129 mM, NaHCO_3 8,9 mM, KH_2PO_4 0,8 mM, MgCl_2 0,8 mM, glucose 5,6 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4) chứa 1 μM PGE_1 , và sau đó lại ly tâm lần nữa (400 x g, 15 phút) ở nhiệt độ phòng. Hòa lại tiểu cầu thành dịch treo trong dung dịch đệm Hepes-Tyrode, và lọc gel qua Sepharose 2B đã được cân bằng với cùng chất đệm.

Hiệu chỉnh số lượng tiểu cầu tới $4 \times 10^5/\text{mm}^3$ bằng cùng dung dịch đệm và sau đó pha loãng bằng cho thêm lượng bằng nhau dung dịch đệm Hepes-Tyrode chứa 2 mM CaCl_2 và những nồng độ khác nhau của thuốc thử nghiệm. Để tiểu cầu chịu tác động của thuốc thử nghiệm trong 10 phút trước khi bắt đầu thí nghiệm.

Gây kết tập tiểu cầu bằng thrombin 0,01 U/ml. Đo mức độ kết tập tiểu cầu trên máy đo kết tập bằng phép đo độ đục.

b. Theo phương pháp mô tả bởi Gleitz và cộng sự (1997): Chuẩn bị huyết tương giàu tiểu cầu từ máu toàn phần của những người tình nguyện khỏe mạnh được chống đông với 1/9 thể tích citrat – acid citric dextrose (100 mmol/lít trinati citrat, 7 mmol/lít acid citric, 140 mmol/lít dextrose, pH 6,5) bằng cách ly tâm ở 100 x g trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Làm lắng tiểu cầu ở dịch nổi lên trên bằng ly tâm ở 1.000 x g trong 10 phút. Rửa cục lắng đọng 2 lần với dung dịch đệm citrat [0,35% (w/v) BSA, 108 mmol/lít NaCl , 2,8 mmol/lít KCl , 1,0 mmol/lít CaCl_2 , 1,6 mmol/lít MgCl_2 , 0,3 mmol/lít NaH_2PO_4 , 9,5 mmol/lít NaHCO_3 , 10,1 mmol/lít trinati citrat, 4,6 mmol/lít acid citric] bằng ly tâm ở 555 x g trong 10 phút. Cục lắng đọng cuối cùng được hòa lại thành dịch treo trong dung dịch đệm citrat để đạt độ chuẩn tế bào khoảng 10^9 tiểu cầu/ml. Dịch treo được lắc trong một đĩa Petri cho tới khi thực hiện các thử nghiệm.

Thử nghiệm kết tập tiểu cầu

Một ước số của dịch treo tiểu cầu được ly tâm ở 7.000 x g trong một phút. Cục lắng đọng được treo lại trong dung dịch đệm Tyrode [135 mmol/l NaCl , 3,5 mmol/l

KCl, 1,2 mmol/l CaCl_2 , 2 mmol/l MgCl_2 , 0,3 mmol/l NaH_2PO_4 , 0,35% (w/v) BSA, 11,9 mmol/l NaHCO_3 , pH 7,4] và được hiệu chỉnh tới 10^9 tiểu cầu/ml. Thực hiện sự kết tập tiểu cầu trên một máy đo kết tập hai kênh. Theo dõi sự kết tập của dịch treo bị khuấy trong thể tích cuối cùng là 300 μl ở 37°C bằng phép đo độ đục bởi sự tăng dẫn truyền ánh sáng dùng huyết tương không có tế bào làm mẫu đối chiếu.

Khi cho acid arachidonic (AA) 100 $\mu\text{mol/l}$ vào dịch treo tiểu cầu người sẽ gây sự kết tập tiểu cầu được phát hiện bằng phép đo độ đục. Cho thuốc thử nghiệm về tác dụng chống kết tập tiểu cầu vào dịch treo tiểu cầu người 5 phút trước khi cho acid arachidonic, so sánh sự kết tập (% dẫn truyền ánh sáng) giữa các mẫu thử thuốc và mẫu đối chứng.

1.2.2. Thử nghiệm trên tiểu cầu máu động vật thí nghiệm in vitro

a. Trên máu chuột cống trắng (mô tả bởi Cano và cộng sự, 1990)

Chuột cống trắng đực Sprague Dawley (300 - 350 g thể trọng) được gây mê với natri pentobarbital (60 mg/kg tiêm phúc mạc). Lấy máu bằng cách chọc tim và chống đông với natri citrat [9 thể tích máu + 1 thể tích dung dịch natri citrat 3,8% w/v]. Máu citrat hóa được ly tâm trong các ống chất dẻo ở 200 x g trong 20 phút ở nhiệt độ phòng để thu được huyết thanh giàu tiểu cầu. Thu được huyết thanh nghèo tiểu cầu bằng cách ly tâm chất lắng ở 2000 x g trong 30 phút. Pha loãng huyết tương giàu tiểu cầu với huyết tương nghèo tiểu cầu để được số đếm tiểu cầu khoảng 250.000 - 300.000 tiểu cầu / μl .

Đo sự kết tập tiểu cầu ở 37°C theo phương pháp đo độ đục của Born và cộng sự (1963). Dung dịch thuốc thử nghiệm về tác dụng chống kết tập tiểu cầu hoặc dung môi (đối chứng) được ủ trước 5 phút với huyết tương giàu tiểu cầu trước khi cho thêm chất gây kết tập tiểu cầu adenosin diphosphat (ADP, 2 μM). Đo sự kết tập là thay đổi tối đa trong dẫn truyền ánh sáng 5 phút sau khi cho thêm chất gây kết tập tiểu cầu.

b. Trên máu chuột nhắt trắng (mô tả bởi Suzuki và cộng sự, 2001)

Lấy máu từ động mạch chủ chuột nhắt trắng đực cân nặng 22 - 26 g dưới sự gây mê bằng pentobarbital (80 mg/kg, tiêm trong màng bụng). Cho máu vào 1/10 thể tích dung dịch natri citrat 3,8%, ly tâm ở 800 vòng/phút trong 10 phút và thu được huyết tương giàu tiểu cầu. Phần kết tủa được ly tâm thêm trong 10 phút ở 3.000 vòng/phút để chế tạo huyết tương nghèo tiểu cầu. Hiệu chỉnh huyết tương giàu tiểu cầu để chứa 3×10^5 tiểu cầu/ml bằng pha loãng với huyết tương nghèo tiểu cầu của cùng con chuột. Gây kết tập tiểu cầu với adenosin diphosphat (ADP) (0,5 μM), collagen (1,0 $\mu\text{g/ml}$) và acid arachidonic (0,5 mM) và đo bằng máy đo kết tập tiểu cầu.

1.2.3. Thử nghiệm tác dụng chống kết tập tiểu cầu in viro trên thỏ

Lấy máu từ động mạch cảnh thỏ đực hoặc cái cân nặng 2 – 3 kg. Máu được chống đông với dung dịch natri citrat 3,8% (9/1 thể tích/thể tích). Thu được huyết tương giàu tiểu cầu và huyết tương nghèo tiểu cầu bằng cách ly tâm máu ở 1000 và 3000 vòng/phút, tương ứng trong 10 phút. Dùng huyết tương nghèo tiểu cầu làm mẫu đối chiếu về kết tập tiểu cầu hoặc để hiệu chỉnh số lượng tiểu cầu trong huyết tương giàu tiểu cầu (5×10^{11} tế bào/lít).

Theo dõi sự kết tập tiểu cầu trong huyết tương bằng phương pháp Born (1963) với một máy đo kết tập ở 37°C. Ghi sự kết tập tối đa sau khi cho chất gây kết tập tiểu cầu: acid arachidonic 0,35 mM, adenosin diphosphat 3 μ M, và yếu tố hoạt hóa tiểu cầu 7,2 nM. Tính tỷ lệ phần trăm ức chế bởi thuốc theo công thức:

$$\text{Ức chế kết tập (\%)} = (A - B) / A \times 100$$

trong đó A = thay đổi tối đa về độ đục ở mẫu đối chứng và B = thay đổi tối đa về độ đục ở mẫu thử thuốc.

Thỏ được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm, mỗi nhóm 6 con. Nhóm 1: cùng thể tích nước muối đẳng trương, các nhóm 2 và 3: 2 liều khác nhau của thuốc thử nghiệm, và nhóm 4: aspirin 10 mg/kg. Tất cả các chất trên được tiêm vào tĩnh mạch rìa tai thỏ, tương ứng. Chế tạo huyết thanh giàu tiểu cầu và huyết thanh nghèo tiểu cầu trước khi tiêm và 10, 30, 60, 90, 120, 180 và 240 phút sau khi tiêm. Theo dõi kết tập tiểu cầu. Phương pháp này được mô tả bởi Shen và cộng sự (2000).

1.3. Xác định adenosin triphosphat (ATP) (mô tả bởi Gleitz và cộng sự, 1997)

Tác dụng chống huyết khối của một số chất đã được chứng minh là do làm giảm sự kết tập tiểu cầu, làm giảm sự giải phóng adenosin triphosphat nội sinh từ tiểu cầu và sự tạo thành prostaglandin E_2 (PGE_2) và thromboxan A_2 (TXA_2).

Phát hiện adenosin triphosphat giải phóng từ tiểu cầu bằng phương pháp phát quang sinh học. Từ dịch treo tiểu cầu của người được chuẩn bị như đã nêu trong các phần trên, lấy một ước số và ly tâm ở 7.000 x g trong 1 phút. Cục lắng đọng được treo lại trong dung dịch đệm Tyrode để đạt 10^9 tiểu cầu/ml trong thể tích cuối 4,5 ml, được lắc trong một ống chất dẻo đặt trong cách thủy nước ở 37°C. Sau sự cân bằng trong 5 phút, lấy các mẫu 100 μ l như đã chỉ dẫn, trộn với 900 μ l dung dịch đệm Tyrode được làm lạnh trước (0°C), và ly tâm ở 7.000 x g trong một phút. Để xác định ATP, trộn 20 μ l dịch nổi lên trên với 200 μ l của dung dịch acid perchloric

1 mol/lít và 50 mmol/lít EDTA trong 1 phút để làm kết tủa protein tan. Hiệu chỉnh dung dịch tới pH 7,5 – 8,0 bằng cách cho thêm 316 μ l của dung dịch KOH 1 mol/lít và 180 μ l dung dịch đệm HEPES (10 mmol/l $MgCl_2$, 100 mmol/l HEPES, pH 7,75, 25°C). Sau khi ủ trong 30 phút ở 0°C, dung dịch được ly tâm ở 14.000 x g trong 10 phút để loại bỏ kali perchlorat. Cho thêm 500 μ l của dịch nổi lên trên vào 500 μ l dung dịch đệm HEPES, và xác định hàm lượng của adenosin triphosphat bằng phương pháp phát quang sinh học với luciferase dùng kit HSII (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Đức) và máy đo phát quang (LB 9502, Berthold GmbH, Bad Wildbad, Đức). Tính hàm lượng adenosin triphosphat theo đường cong chuẩn dùng các nồng độ khác nhau của adenosin triphosphat làm chuẩn.

1.4. Xác định prostaglandin E_2 (PGE_2) và thromboxan B_2 (TXB_2)

Xác định prostaglandin E_2 và thromboxan B_2 bằng thử nghiệm miễn dịch hấp thu liên kết với enzym (ELISA) dùng các kit thuốc thử của Immunotech GmbH (Hamburg, Đức). Ly tâm một ước số của dịch treo tiểu cầu người được chuẩn bị như trong các phần mô tả ở trên ở 7.000 x g trong 1 phút. Cục lắng đọng được treo lại trong dung dịch đệm Tyrode để thu được mật độ tế bào là $1,5 \times 10^8$ tiểu cầu/ml trong thể tích cuối cùng 4 ml và chuyển vào một ống chất dẻo đặt trong cách thủy nước (37°C). Sau sự cân bằng trong 5 phút, lấy 200 μ l của dịch treo được lắc như đã chỉ dẫn. Khi xác định prostaglandin E_2 , cho thêm chất ức chế thromboxan synthase (TXS) E/Z-7-phenyl-7-(pyridyl)-6-heptenoic acid ở nồng độ 1 μ mol/lít vào dịch treo tiểu cầu người lúc bắt đầu sự cân bằng.

Để xác định prostaglandin E_2 và thromboxan B_2 , trộn 200 μ l dịch treo tiểu cầu với 1.800 μ l dung dịch ngừng ướp lạnh (50 μ mol/lít indomethacin, 25 mmol/lít HEPES, pH 7,4). Sau đó, các tiểu cầu bị phá vỡ bằng siêu âm (sonification) ở 0°C trong 15 phút để cho phép sự giải phóng hoàn toàn của cả hai chất, và các dịch treo mô đồng thể thu được được ly tâm ở 5.000 x g trong 10 phút. Hàm lượng của prostaglandin E_2 và thromboxan B_2 của dịch nổi lên trên được xác định theo các chỉ dẫn của nhà cung cấp kit ELISA.

Thuốc thử nghiệm và dung môi (đối chứng), được cho vào dịch treo tiểu cầu 5 phút trước khi cho thêm chất gây kết tập tiểu cầu. Phương pháp này được mô tả bởi Gleitz và cộng sự (1997).

II. NGHIÊN CỨU THUỐC CHỐNG TĂNG HUYẾT ÁP

Các thuốc chống tăng huyết áp là những thuốc chữa triệu chứng. Người ta dùng các thuốc ức chế các sợi giao cảm hậu hạch (reserpin, α -methyldopa,

guanethidin), các thuốc liệt hạch, các thuốc có tác dụng trung tâm hoặc phản xạ. Sự hạ huyết áp, rõ rệt nhất ở thể đứng, thường kèm theo sự giảm lưu lượng tim do giảm lượng máu trở về tĩnh mạch. Các thuốc ức chế monoamin oxydase gây hạ huyết áp mà không làm giảm lưu lượng tim. Các thuốc lợi tiểu gây hạ huyết áp do làm giảm khối lượng máu và vì thế làm giảm lưu lượng tim. Các thuốc lợi tiểu thải trừ natri trong tế bào, làm giảm áp lực thẩm thấu của tế bào mạch máu và kích thích của nó. Các yếu tố này có thể là tác nhân gây bệnh.

CÁC PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thử nghiệm tác dụng chống tăng huyết áp trên mô hình tăng huyết áp do co động mạch thận (*Goldblatt và cộng sự, 1934*)

Tăng huyết áp thận do sự co của cả hai động mạch thận (tăng huyết áp Goldblatt) là mô hình gây tỷ lệ tương đối cao động vật có tăng huyết áp kéo dài, thích hợp để dùng trong nghiên cứu và phương pháp phẫu thuật tương đối ít phức tạp và mất ít thời gian hơn so với một số phương pháp khác. Tuy vậy, đáp ứng với nhiều thuốc chống tăng huyết áp có hiệu quả trên lâm sàng (thuốc bài tiết muối niệu, α - methyl dopa, thuốc phong bế hạch) có thể chỉ thể hiện ở các mức liều rất cao, hoặc có thể không đều, ở chó tăng huyết áp thận.

Trong thử nghiệm huyết áp động mạch trung bình là thông số dùng đánh giá hoạt tính, thứ nhất, vì độ chính xác của sự xác định ít phụ thuộc vào hệ thống ghi được dùng và do đó là một trị số ổn định hơn huyết áp tâm thu, và thứ hai vì các thay đổi về huyết áp trung bình có ý nghĩa hơn trong đánh giá hoạt tính của thuốc so với các thay đổi về huyết áp tâm thu. Trong cùng điều kiện thí nghiệm chung, các trị số khác như nhịp tim và huyết áp tâm thu và tâm trương có thể được ghi một cách thường quy bằng một hệ thống ghi với đáp ứng về tần số đầy đủ. Có thể dùng động vật lặp lại để thử nghiệm, chừng nào tăng huyết áp còn tồn tại, với điều kiện là có đủ thời gian trôi qua giữa các thí nghiệm cho phép sự thải trừ thuốc thử nghiệm, sự đảo ngược các tác dụng của thuốc và sự bình thường hóa hoàn toàn dự trữ catecholamin, điều này có thể cần nhiều thời gian hơn sự trở về mức trước điều trị của huyết áp.

* Điều kiện thí nghiệm

Chó đực cân nặng 12 – 16 kg được nuôi với chế độ ăn tiêu chuẩn gồm thịt và cơm chứa 0,5% natri clorid. Sau khi chó đã được huấn luyện nằm yên ở tư thế nằm ngửa, đo các trị số huyết áp đối chứng bằng phương pháp trực tiếp trong đó một kim tiêm cỡ 12 được tiêm xuyên da vào trong động mạch đùi, và ghi huyết áp bằng

một máy biến năng. Kim tiêm và ống nối được bơm đầy dung dịch heparin 1%, đủ để dự phòng sự đông máu trong thời gian nhiều phút; heparin không được tiêm toàn thân. Đo huyết áp mỗi tuần một lần cho tới khi xác định được huyết áp cơ bản trong phạm vi độ chính xác $\pm 12\%$.

Đầu tiên, thắt một động mạch thận, bằng kỹ thuật mô tả bởi Goldblatt và cộng sự (1934) rồi, một tuần sau, thắt động mạch thận kia. Thường đạt các mức huyết áp ổn định trong vòng 6 tuần sau sự phẫu thuật thứ hai, và chó với mức huyết áp trung bình cao hơn ít nhất 30 mm Hg so với mức đối chứng được coi là tăng huyết áp.

Chó tăng huyết áp với huyết áp tuyệt đối đồng đều một cách vừa phải được lựa chọn để thử nghiệm. Sự xác định huyết áp ban đầu được thực hiện ngay trước khi điều trị. Cho chó uống thuốc thử nghiệm trong các nang gelatin hàng ngày trong 4 ngày; chó đối chứng nhận một lượng tương đương lactose. Đo lại huyết áp, 2 giờ sau khi cho thuốc thử nghiệm ở ngày điều trị thứ tư. Sau thời kỳ điều trị, huyết áp được đo ở các khoảng cách thời gian 4 – 7 ngày cho tới khi đạt được các mức trước điều trị. Các trị số huyết áp sau điều trị được dùng để phân biệt đáp ứng với một thuốc có hoạt tính và sự mất tăng huyết áp tự nhiên.

*** Tiêu chuẩn của thử nghiệm**

Một thuốc được coi là có tác dụng chống tăng huyết áp khi nó gây hạ huyết áp 15 mmHg hoặc hơn, và không có tác dụng khi nó không ảnh hưởng đến huyết áp, và các kết quả có ý nghĩa thống kê khi thuốc có tác dụng.

2.2. Thử nghiệm tác dụng trên mô hình tăng huyết áp do deoxycorticosteron acetat (DOCA) - muối (mô tả bởi Lahlou và cộng sự, 2000)

Chuột cống trắng Wistar đực, cân nặng 200 - 240 g, được giữ trong điều kiện nhiệt độ hằng định ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) với một chu kỳ sáng / tối hằng định (12 giờ sáng / 12 giờ tối) và được cho ăn và uống nước tự do. Dưới sự gây mê bằng ether, cắt bỏ một bên thận cho tất cả chuột. Sau thời kỳ phục hồi một tuần, chuột được chia thành 2 nhóm: chuột ở nhóm 1 (nhóm tăng huyết áp do deoxycorticosteron acetat – muối) được tiêm hàng tuần dưới da dịch treo DOCA (25 mg/kg) hòa tan trong dầu ô-liu (chất dẫn), và muối được cho bằng cách thay thế dung dịch natri clorid 1% cho nước uống tùy thích. Chuột ở nhóm 2 (nhóm cắt bỏ một bên thận đối chứng) được cho uống nước máy tùy thích và được tiêm dưới da cùng thể tích chất dẫn một lần mỗi tuần. Thực hiện thí nghiệm 4 tuần sau khi bắt đầu điều trị với DOCA – muối hoặc chất dẫn.

Vào ngày cuối cùng của đợt điều trị, chuột ở cả hai nhóm được gây mê bằng tiêm trong màng bụng natri pentobarbital (50 mg/kg) và đặt ống thông vào động

mạch đùi trái và tĩnh mạch đùi để ghi huyết áp động mạch và tiêm thuốc, tương ứng. Các ống thông này, chứa đầy dung dịch heparin trong nước muối đẳng trương (125 IU/ml) được cố định bên ngoài ở mức cổ phía lưng. Sau phẫu thuật, chuột được nhốt riêng từng con trong các chuồng chất dẻo và được để phục hồi trong 24 giờ trước các thí nghiệm về tuần hoàn. Khi thí nghiệm, nối ống thông động mạch với một máy biến năng huyết áp (Statham P23 1D) ghép với máy đa ký Gilson kiểu 5/6H (Gilson Medical Electronics Inc. Middleton, WI, USA). Huyết áp động mạch trung bình được tính là $HA_{tâm trương} + [(HA_{tâm thu} - HA_{tâm trương})/3]$ và nhịp tim được tính từ đường ghi huyết áp.

2.3. Thử nghiệm tác dụng hạ áp trên động vật có huyết áp bình thường (mô tả bởi Faizi, 1998)

Nghiên cứu tác dụng thuốc trên chuột cống trắng Wistar có huyết áp bình thường được gây mê (200 – 250 g). Chuột được gây mê với thiopental natri (60 – 80 mg/kg, tiêm trong màng bụng). Ghi huyết áp động mạch từ động mạch cảnh qua canun động mạch nối với một máy biến năng (Statham P₂₃) ghép với một máy đa ký kiểu Grass. Tiêm thuốc qua canun được đưa vào tĩnh mạch cảnh. Huyết áp động mạch trung bình được tính là huyết áp tâm trương cộng với một phần ba biên độ của mạch. Dùng acetylcholin (1 µg/kg) làm đối chứng dương tính gây hạ $59,5 \pm 8,3\%$ về huyết áp động mạch trung bình.

III. THỬ NGHIỆM TÁC DỤNG CHỐNG OXY HÓA BẢO VỆ TẾ BÀO THẦN KINH TRONG MÔ HÌNH THIẾU MÁU CỤC BỘ - TUỐI MÁU LẠI (mô tả bởi Trần Lưu Văn Hiến và cộng sự, 2005)

Trong mô hình thiếu máu cục bộ - tưới máu lại ở não, sự hình thành quá mức các gốc tự do gây nên tổn thương não. Các chất chống oxy - hóa đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh, hạn chế tổn thương não do thiếu máu cục bộ - tưới máu lại gây nên.

Thử nghiệm được tiến hành trên chuột nhắt trắng Swiss 7 tuần tuổi, không phân biệt đực, cái, có trọng lượng 20 – 22g, nuôi dưỡng và thí nghiệm trong cùng điều kiện. Chuột được chia thành ba nhóm chính: nhóm đối chứng sinh học, nhóm mô hình đối chứng, nhóm mô hình điều trị với thuốc thử nghiệm.

Chuột ở nhóm điều trị được cho uống thuốc thử nghiệm hàng ngày trong 10 ngày, chuột ở các nhóm đối chứng được cho uống nước muối đẳng trương. Sau đợt điều trị 10 ngày, gây mê chuột bằng urethan. Mở chuột, bóc tách 2 động mạch cảnh chung, kéo căng 20 phút để hạn chế máu lên não, rồi tưới máu lại 20 phút. Lấy não

để đo MDA (malondialdehyd) trong dịch đồng thể mô não, và lấy máu chuột để xác định hoạt độ enzym SOD (superoxyd dismutase).

**** Kỹ thuật xác định hàm lượng MDA ở não chuột***

Cân chính xác 500 mg não chuột, rồi nghiền não trong dung dịch KCl 0,9% đã được làm lạnh trước. Việc nghiền đồng thể tiến hành trong 4 phút, dùng bộ chày cối thủy tinh mài chuyên dụng, ở nhiệt độ đã tan 4°C. Lấy 2 ml dịch treo mô não đồng thể vào mỗi ống nghiệm, thêm vào đó 0,1 ml dung dịch acid ascorbic 25 mμ/lít và 0,1 ml dung dịch muối Morh 0,3 mμ/lít. Ủ hỗn hợp phản ứng ở 37°C trong 30 phút. Sau đó rửa các protein bằng 1 ml acid acetic 40%. Ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Hút lấy 2 ml dịch nổi lên trên vào mỗi ống nghiệm sạch đã đánh số trước. Thêm vào mỗi ống chứa dịch nổi 1 ml acid thiobarbituric 0,8%. Đun cách thủy các ống nghiệm trong 20 phút. Để nguội, đo mật độ quang của các mẫu ở bước sóng 532 nm. Dùng mẫu chuẩn là dung dịch phản ứng giữa MDA chuẩn với nồng độ đã biết và acid thiobarbituric.

**** Kỹ thuật xác định hoạt độ enzym SOD ở hồng cầu chuột***

Lấy chính xác 0,5 ml máu chuột vào các ống nghiệm có chứa sẵn chất chống đông EDTA. Ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Hút loại bỏ huyết tương. Sau đó rửa hồng cầu 4 lần, bằng dung dịch natri clorid 0,9%, ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút.

Sau khi đã rửa hồng cầu bằng ly tâm, trộn hồng cầu với 2 ml nước cất 2 lần để lạnh, lắc đều và để yên ở 4°C trong 15 phút. Dịch dung giải được pha loãng với PBS 0,01 mol/lít, pH = 7, pha loãng hồng cầu 50 lần. Hệ số pha loãng là 200. Hoạt độ enzym SOD được đo trên máy sinh hóa ở bước sóng 505 nm. Đơn vị tính là đơn vị (U) / ml.

Sự giảm hàm lượng MDA và sự tăng hoạt độ SOD là những biểu hiện của tác dụng chống oxy hóa của thuốc thử nghiệm.

CHƯƠNG 10

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC
TÁC DỤNG TRÊN HỆ HÔ HẤP***GS. Đoàn Thị Nhu***I. NGHIÊN CỨU THUỐC CHỐNG HO**

Các phương pháp nghiên cứu thuốc chống ho nói chung giống nhau. Cho thuốc cho động vật và sau đó động vật chịu tác động của một yếu tố gây ho. Sự kích thích ho thay đổi trong các phương pháp khác nhau, có một số phương pháp chỉ có thể phát hiện những thuốc chống ho khá mạnh.

CÁC PHƯƠNG PHÁP**1.1. Thử nghiệm trên ho gây bởi amoniac trên mèo**

Trong phương pháp của Ellis và cộng sự (1963) ghi liều thuốc ức chế hoàn toàn ho đối với 3 hoặc nhiều kích thích hơn.

Mèo cả dực và cái được gây mê nhẹ với việc tiêm trong màng bụng pentobarbital với liều 45 mg/kg dưới dạng dung dịch 6%. Đặt vào khí quản canun là một ống polyethylen ngắn, nối động mạch cảnh với một áp kế để ghi huyết áp. Thuốc thử được tiêm tĩnh mạch vào tĩnh mạch đùi. Ho được ghi trên máy ghi bằng một đòn bẩy bật lên nhẹ nhàng nối bằng một sợi chỉ với da ngay dưới xương ức. Dùng 3 phương pháp gây ho, kích thích điện, cơ học, và hóa học. Trong phương pháp điện, dây thần kinh thanh quản trên được kích thích bằng một máy kích thích sóng vuông dòng điện không đổi. Phương pháp cơ học là kích thích niêm mạc khí quản bằng một ống polyethylen đưa vào và đưa ra khỏi khí quản 2 hoặc 3 lần. Tuy nhiên, việc sử dụng amoniac làm chất gây ho cho đáp ứng hằng định nhất và thường được dùng nhiều nhất. Trong thử nghiệm này, hơi amoniac từ một bình chứa dung dịch 7% amoniac được đưa vào hệ hô hấp bằng một cái vòi có 3 nhánh nối bình với canun khí quản. Để mèo hít hơi amoniac trong một lần thở vào. Ho thường bắt đầu ngay sau đó. Áp dụng

kích thích ho cứ 3 phút một lần cho tới khi đạt được 3 hoặc 4 đáp ứng ho đối chứng có cùng cường độ và thời gian kéo dài. Sau đó tiêm tĩnh mạch thuốc thử nghiệm, và thực hiện lặp lại các kích thích ho ở những khoảng cách thời gian giống nhau cho tới khi đáp ứng ho trở về bình thường. Có thể dùng mỗi động vật để so sánh hiệu lực của nhiều thuốc.

Codein được dùng làm thuốc chống ho chuẩn, và được cho trị số 3+ trong sự đánh giá cho điểm hoạt tính, vì thuốc này ức chế ho hoàn toàn với một liều tiêm tĩnh mạch dưới 2 mg/kg. Nếu một chất ức chế ho hoàn toàn với liều 2 mg/kg hoặc ít hơn, nó sẽ được cho điểm 3+; với một liều 4 mg/kg, được điểm 2+; và nếu có sự ức chế một phần ở 4 mg/kg, được điểm 1+. Pholcodin và dihydrocodein có hiệu lực xấp xỉ bằng codein.

1.2. Thử nghiệm trên ho gây bởi acid citric trên chuột lang

Dùng chuột lang không được điều trị trước (Charlier và cộng sự, 1961). Đặt chuột lang trong một bình thủy tinh hình trụ, có hai ống ở hai đầu, một ống để đưa khí dung vào, và ống kia để đưa ra. Ống sau này có một nhánh bên nối với một cái trống mà các thay đổi về áp suất có thể được ghi. Một cái kẹp có đinh vít thay đổi được đặt ở ống ra phía ngoài của nhánh bên, cho phép điều hòa độ nhạy của hệ thống, sao cho hô hấp bình thường không được ghi, trong khi sự chuyển dịch của không khí trong sự ngăn lại gây bởi ho được ghi. Chuột lang được phơi nhiễm với khí dung của 7,5% acid citric trong nước trong 10 phút. Mỗi động vật được thử nghiệm trước hết để đạt đáp ứng đối chứng. Một giờ sau, động vật được cho thuốc thử nghiệm và 30 phút sau đó lại chịu tác động của khí dung. Số lượng các cơn ho được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm của số lượng trong thời kỳ đối chứng, để có tác dụng chống ho.

Codein phosphat với liều đưa vào dạ dày 100 mg/kg cho một trị số trung bình 49% ở một nhóm 10 chuột lang. Số lượng các cơn ho trong 15 phút sau khi cho tác động khí dung cũng được ghi. Số lượng các cơn ho trong thời kỳ đối chứng là 53, (trung bình của 10 chuột lang).

1.3. Thử nghiệm trên ho gây bởi acid sulfuric ở chó

Chó cân nặng 7 đến 10 kg và đã nhịn ăn trong 18 đến 20 giờ được để trong một hộp gỗ riêng, vuông với cạnh 60 cm và cao 45 cm (Chen và cộng sự, 1960). Hộp có các vách ngăn bằng kim loại và một cửa sổ bằng kính. Qua 2 lỗ, một khí dung nhỏ của dung dịch acid sulfuric 0,5 M được bơm vào bằng 2 máy khí dung số 40 De Wilbiss, vận hành bằng khí nén. Sự đếm số lượng cơn ho trong thời gian thử nghiệm 4 phút đạt được bằng cách nghe qua ống nghe tới một micrô gắn vào họng

của chó. Sau 2 thời kỳ thử nghiệm cách nhau một giờ, cho thuốc trước thời kỳ thử nghiệm tiếp theo. Hai số đếm đối chứng nằm trong phạm vi từ 15 đến 35 cơn ho, nếu không, động vật không được dùng tiếp. Các thuốc chống ho được cho uống trong nang gelatin. Tính tỷ lệ phần trăm ức chế bằng cách chia số lượng cơn ho cho số lượng ho trong thời kỳ đối chứng, rồi lấy số 1, trừ thương số, và nhân với 100.

Để so sánh, dùng codein, dihydrocodeinon và các thuốc chống ho khác, với liều khoảng 1 mg/kg.

II. NGHIÊN CỨU THUỐC GIÃN PHẾ QUẢN

Các thuốc có khả năng gây giãn phế quản được dùng để điều trị hen và một số tình trạng dị ứng.

2.1. Thử nghiệm tác dụng giãn phế quản trên cơ quan cô lập

Phương pháp này được thiết kế để phát hiện tác dụng giãn phế quản, nhưng cũng có thể dùng để phát hiện tác dụng chống co thắt phế quản. Dùng khí quản mà không dùng phế quản vì dễ phẫu tích hơn và khí quản có phản ứng tương tự đối với các thuốc gây co thắt và chống co thắt phế quản.

Một chuột lang lớn bị giết bằng một cú đánh vào đầu (Castillo và De Beer, 1947). Cô lập khí quản và dùng kéo cắt thành 12 vòng với bề ngang gần bằng nhau. Các vòng khí quản được giữ ẩm với dung dịch Ringer trong khi chúng được nối với nhau bằng các vòng chỉ tơ ngấn.

Chuỗi các vòng khí quản được treo trong một bình ngâm mô chứa dung dịch Van Dyke - Hastings (xem ở dưới), được bão hòa với 95% oxy và 5% carbon dioxyl trước đó. Bình ngâm được giữ ở 37,5°C và hỗn hợp khí nêu trên được thổi qua. Dùng một đòn bẩy để ghi với độ phóng đại 12 lần, hoặc dùng một máy biến năng và ghi sự co và giãn của chuỗi vòng khí quản trên một máy đa ký. Chỉ cần áp lực rất thấp trên đòn bẩy.

Trong nghiên cứu các tác dụng chống co thắt, đầu tiên cho thuốc một mình và rửa. Sau đó cho một chất gây co thắt, và ở độ cao của sự co, cho thuốc chống co thắt một lần nữa, và nếu thuốc có tác dụng sẽ gây giãn.

Các chất gây co thắt được dùng là:

Histamin dihydro phosphat	1: 50.000
Acetylcholin bromid	1: 1.000.000
Bari clorid	1: 5.000

Có thể dùng phương pháp này để phát hiện hoạt tính gây co thắt, chống co thắt, kháng histamin và ức chế thần kinh đối giao cảm.

Tiêu bản không có sự co tự nhiên và có thể dùng trong 12 giờ. Tiêu bản này cho các tác dụng hoàn toàn khác với tác dụng phát hiện trên các đoạn ruột. Ví dụ, aminophyllin không có tác dụng đối kháng với tác dụng của histamin trên ruột, nhưng hoàn toàn có hoạt tính đối kháng với tác dụng của histamin trên chuỗi vòng khí quản.

Dung dịch ngâm mô, lần đầu tiên được báo cáo bởi Van Dyke và Hastings (1928) chứa các ion sau đây, nồng độ biểu thị bằng micromol trong 1 lít: Na, 144,0; K, 6,2; Mg, 1,0; Ca, 0,53; Cl, 122,0; HCO_3 , 30,0; H_2PO_4 và HPO_4 , 1,0 mỗi thứ. Cho vào dung dịch Van Dyke - Hastings 0,05 g glucose trong 1 lít.

2.2. Thử nghiệm tác dụng chống co thắt phế quản trên chuột lang

Áp dụng phương pháp thử nghiệm tác dụng chống co thắt phế quản trên chuột lang của Franzone và cộng sự (1989).

Gây mê chuột lang bằng urethan với liều 1,2 – 1,4 g/kg, dưới dạng dung dịch 25% tiêm trong màng bụng. Cố định động vật với tư thế nằm ngửa. Bộc lộ khí quản, luồn vào khí quản một canun và buộc chặt, nối canun với một ống thủy tinh có bốn đầu nhánh: hai đầu nối với máy hô hấp nhân tạo, hai đầu kia nối với máy biến năng co thắt phế quản, sự thay đổi lượng khí thừa được ghi trên máy đa ký. Máy hô hấp được vận hành với tần số bơm 35 – 45 lần/phút, và thể tích mỗi lần bơm 15 – 20 cm^3 . Mở ngực bằng một nhát rạch ở khoảng gian sườn và đặt một cái banh để giữ lồng ngực mở, loại bỏ hô hấp tự nhiên. Bộc lộ tĩnh mạch cảnh để tiêm thuốc.

Trong nghiên cứu các thuốc gây giãn phế quản, chống co thắt phế quản, mỗi động vật được thử nghiệm trước hết để ghi đáp ứng đối chứng đối với việc tiêm tĩnh mạch một trong các thuốc gây co thắt sau đây: acetylcholin 10 – 50 $\mu\text{g/kg}$; histamin 5 – 20 $\mu\text{g/kg}$. Khi phế quản bị co thắt, lượng không khí phát ra từ máy hô hấp vào phổi giảm đi, lượng khí thừa sẽ tạo ra áp suất được chuyển vào máy biến năng và được ghi trên máy đa ký. Khoảng một giờ sau, khi tác dụng của chất gây co thắt đã hết, động vật được tiêm tĩnh mạch thuốc thử nghiệm về tác dụng chống co thắt phế quản và 15 – 30 phút sau đó lại được tiêm tĩnh mạch chất gây co thắt. Áp suất của lượng khí thừa ghi được biểu thị mức độ co thắt phế quản. So sánh mức độ co thắt phế quản trong thời kỳ sau khi tiêm thuốc thử nghiệm với thời kỳ đối chứng. Tác dụng của thuốc chống co thắt được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm giảm co thắt so với mức đối chứng. Các thuốc chống co thắt được dùng để tham chiếu là atropin, 1 mg/kg và neo-antergan, 20 – 30 $\mu\text{g/kg}$.

III. NGHIÊN CỨU THUỐC LONG ĐỒM

3.1. Thử nghiệm tác dụng long đờm (mô tả bởi *Phạm Xuân Sinh, 1994*)

Dùng 3 lô chuột nhắt trắng, lô 1 được cho thuốc thử nghiệm, lô 2 được cho thuốc quy chiếu (ví dụ: dung dịch 5% natri benzoat, uống), lô 3 là lô chứng được cho nước muối sinh lý 0,9%. Sau đó tiêm trong màng bụng cho từng chuột 0,5 ml dung dịch sulfophthalein 0,5%, 30 phút sau tiêm lại một lần như trên. Sau đó 30 phút, giết chết chuột, dùng dung dịch natri hydrocarbonat 5% để rửa lòng ống khí quản. Gộp dịch rửa của từng lô chuột đem so sánh với thang mẫu. Nếu nồng độ dung dịch sulfophthalein ở nhóm chuột nhận thuốc thử nghiệm gấp từ 2 lần trở lên so với nhóm chứng thì thuốc được coi là có tác dụng long đờm.

3.2. Các phương pháp khác thử nghiệm trên sự tiết dịch khí phế quản

Có thể xác định sự tiết dịch nhày khí phế quản bằng phương pháp đơn giản mở khí quản của một động vật gây mê và đánh giá trực tiếp sự sản sinh dịch nhày từ thành khí quản. Thực hiện việc này bằng cách làm khô một vùng của thành khí quản với giấy lọc và đo thời gian xuất hiện dịch nhày. Tiếp theo định lượng hiệu suất tiết dịch nhày và dịch bằng cách cân lượng dịch này trên giấy lọc (Boyd, 1954).

Florey và cộng sự (1932) đã báo cáo một phương pháp chính xác hơn. Thắt khí quản để tạo nên một túi cùng, đặt canun vào túi này và đổ đầy dầu ôliu. Đo sự dịch chuyển nhỏ của dầu do dịch nhày bằng cách đo sự chuyển động của mặt khum của dịch trong ống nhỏ. Theo Widdicombe (1964), nên bỏ qua những thay đổi về thể tích trong thời gian ngắn, vì đó có thể do thay đổi về trương lực cơ trơn, nhưng phương pháp này có thể cho thấy lưu lượng tiết dịch nhày trong khoảng thời gian dài. Do đường hô hấp của mèo có nhiều tuyến dịch nhày, nên mèo là động vật chọn lọc đối với thử nghiệm này.

CHƯƠNG 11

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ
THUỐC CHỐNG TĂNG LIPID MÁU VÀ
THUỐC TÁC DỤNG TRÊN VỮA XƠ ĐỘNG MẠCH***GS. Đoàn Thị Nhu***MỞ ĐẦU**

Nhiều loài động vật đã được sử dụng để nghiên cứu các thuốc có khả năng gây hạ cholesterol máu. Tuy nhiên nên lưu ý rằng phần lớn các động vật thí nghiệm, ngược lại với người, thể hiện nồng độ lipid thấp và nồng độ cao của các phân đoạn α - lipoprotein tỷ trọng cao. Ở người, chứng tăng cholesterol máu thường kết hợp với sự tăng các phân đoạn α -lipoprotein tỷ trọng thấp. Việc điều trị với thuốc ở người thường dẫn đến sự giảm có ý nghĩa phân đoạn này (Steinberg, 1962). Mặc dù có sự khác nhau này, phần lớn các mô hình nghiên cứu trên động vật cho các dữ liệu có sự tương quan cao với các tác dụng lâm sàng.

Các thuốc có hiệu lực có thể gây giảm cholesterol bằng nhiều cơ chế; việc lựa chọn một mô hình động vật có thể chứng minh tốt nhất các tác dụng này là quan trọng vì có sự thay đổi rõ rệt trong đáp ứng với thuốc của nhiều loại động vật với cùng một thuốc thử nghiệm. Tương tự như vậy, tác dụng của thuốc có thể bị ảnh hưởng bởi chế độ ăn. Sau đây là những mô hình thí nghiệm trên động vật thường được sử dụng.

**I. THỬ NGHIỆM TRÊN ĐỘNG VẬT CÓ CHOLESTEROL MÁU BÌNH
THƯỜNG TRONG SÀNG LỌC BAN ĐẦU**

Các động vật bình thường nuôi với chế độ ăn thường quy được dùng để nghiên cứu sàng lọc ban đầu. Cho uống thuốc qua ống thông hoặc trộn vào thức ăn. Trong

các thử nghiệm kiểu này, Tennent và cộng sự (1961) dùng gà trống logo non, 9-11 tuần tuổi, thuốc được cho vào thức ăn của gà. Duy trì việc điều trị trong 4 ngày liền. Thực hiện việc lấy máu vào ngày thứ năm, thường bằng cách chọc tim, để phân tích cholesterol.

Buchanan và cộng sự (1969) đã dùng các thuốc thử nghiệm tương tự trên chuột cống trắng có cholesterol máu bình thường. Cho uống thuốc trong 4 ngày, và thực hiện phân tích cholesterol huyết thanh vào ngày thứ năm của thử nghiệm. Các hợp chất làm giảm cholesterol huyết thanh với tỷ lệ ít nhất 20% ở liều 400 mg/kg được coi là có hoạt tính, và tiếp đó, thử nghiệm các hợp chất này với liều thấp hơn. Bằng thử nghiệm này, các tác giả đã chứng minh thuốc chuẩn clofibrat, với liều 200 mg/kg, có thể làm giảm cholesterol huyết thanh với tỷ lệ 20%.

Một thuốc có khả năng giảm nồng độ cholesterol huyết thanh bình thường cần được cung cấp các dữ liệu về khả năng hấp thu nếu thuốc có tác dụng toàn thân. Tuy nhiên, một kết quả âm tính không nhất thiết có nghĩa là thuốc sẽ không có tác dụng trên người (Steinberg, 1962). Thử nghiệm này là một phương pháp đánh giá tác dụng thuốc tương đối nhanh và đơn giản, thường được dùng để sàng lọc ban đầu.

II. THỬ NGHIỆM TRÊN ĐỘNG VẬT CÓ TĂNG CHOLESTEROL MÁU

Gây tăng cholesterol máu ở nhiều loài động vật bằng cách cho mỡ và cholesterol vào thức ăn. Chứng tăng cholesterol máu này có tính chất ngoại sinh. Sự sinh tổng hợp cholesterol nội sinh thường diễn ra với tốc độ rất chậm để đền bù cho các nồng độ cao của cholesterol huyết thanh. Như vậy các thuốc có tác dụng chống tăng cholesterol máu gây bởi chế độ ăn tác động do một hoặc nhiều cơ chế có liên quan với sự ức chế hấp thu cholesterol ở ruột, tăng sự thoái biến cholesterol, ảnh hưởng đến sự sản sinh lipoprotein, hoặc tăng nhanh sự thải trừ lipoprotein.

2.1. Chuột cống trắng mới thôi bú

Người ta biết rõ con vật còn bú có nồng độ cholesterol huyết thanh thường cao gấp 2 - 3 lần so với nồng độ ở chuột trưởng thành. Điều này có thể do hàm lượng mỡ cao trong sữa vì các con vật còn bú được nuôi với chế độ ăn tiêu chuẩn thay vì bú sữa có nồng độ cholesterol huyết thanh gần với nồng độ bình thường ở chuột trưởng thành. Chứng tăng cholesterol máu này nhạy cảm với một số loại thuốc (thyroxin và các chất cùng loại) và có thể không nhạy cảm với một số chất ức chế sự sinh tổng hợp cholesterol. Hợp chất N-(ferrocenylmethyl) piperidin, một chất ức chế 7-dehydrocholesterol reductase, gây sự giảm rõ rệt cho cholesterol huyết thanh ở chuột cống trắng mới thôi bú (Barnhart và cộng sự, 1969).

Thuốc thử nghiệm được trộn với thức ăn thường quy cho các nhóm 6 chuột cống trắng mới thôi bú (giống Harlan-Wistar) trong một tuần. Giết chuột và xác định hàm lượng cholesterol máu. Đã thấy hợp chất N- (ferrocenyl-methyl) piperidin (0,007%) làm giảm cholesterol huyết thanh xuống 7 mg%, ngược lại với trị số này ở chuột đối chứng là 61 mg%.

Berger và cộng sự (1969) dùng chuột cống trắng mới thôi bú, nặng 60-95g, nuôi với chế độ ăn cho cholesterol máu bình thường được bổ sung với thuốc thử clofibrat trong khoảng thời gian 2 tuần. Nồng độ cholesterol huyết thanh giảm tới 75 mg%, trong khi trị số đối chứng là 101 mg%. Hawkins và cộng sự (1965) cũng chứng minh cholestyramin (2% trong thức ăn thường quy) làm giảm nồng độ cholesterol huyết thanh ở chuột cống trắng mới thôi bú. Các ví dụ đã nêu cho thấy việc sử dụng chuột cống trắng mới thôi bú có thể cung cấp một phương cách tương đối đơn giản, nhanh và rẻ để thử nghiệm các thuốc hạ cholesterol máu.

2.2. Chuột cống trắng trưởng thành

Nhiều nhà nghiên cứu đã dùng chuột cống trắng được gây tăng cholesterol máu bằng cách bổ sung thức ăn với cholesterol, 1%; mỡ và acid mật (như acid cholic), 1%; và chất đối kháng tuyến giáp propyl thiouracil, 0,01% trong nước uống (Wissler và cộng sự, 1954; Anderson và Bowman, 1969; Fukushima và Nakatani, 1969; Nakamura và cộng sự, 1969).

Chuột cống trắng thường không đáp ứng với việc bổ sung chỉ riêng cholesterol. Đã nhận xét thấy tăng cholesterol máu vừa phải khi bổ sung thức ăn có cholesterol với acid mật để tăng cường sự hấp thu cholesterol qua ruột. Thường nhận xét thấy tăng cholesterol máu rõ rệt khi bổ sung các hormon kháng tuyến giáp vào chế độ ăn. Cần lưu ý là các nồng độ cholesterol huyết thanh trong trường hợp này đạt trị số tối đa 1.100 mg% trong vòng 28 ngày và vẫn ổn định ở nồng độ này cho dù chế độ ăn được tiếp tục trong cả năm. Kiểu chế độ ăn này hợp với các thuốc giống tác dụng tuyến giáp, các thuốc này gây sự giảm mạnh các nồng độ cholesterol máu.

Việc sử dụng các chế độ ăn được bổ sung những lượng đáng kể các acid béo bão hòa và các triglycerid bão hòa sẽ dẫn đến tăng cholesterol máu từ nhẹ đến vừa. Benzmalacen, một thuốc phong bế sinh tổng hợp cholesterol ở giai đoạn acid mevalonic, có tác dụng làm giảm chứng tăng cholesterol máu gây bởi mỡ (Huff và Gilfillan, 1960). Do đó, kiểu chế độ ăn này được ưa dùng hơn để đánh giá các chất có tiềm năng ức chế sinh tổng hợp cholesterol xét về sự kiện là chứng tăng cholesterol máu được gây nên do nội sinh.

2.3. Thỏ

2.3.1. Các chế độ ăn chứa cholesterol

Đã gây chứng tăng cholesterol máu và vữa xơ động mạch thực nghiệm một cách thành công bằng cách bổ sung cholesterol hoặc cholesterol và mỡ vào chế độ ăn cho thỏ (Aladina và Sharkov, 1968; Kritchevsky và cộng sự, 1969; Fukushima và cộng sự, 1969a). Trong thử nghiệm trên thỏ, việc cho một chế độ ăn có hàm lượng cao cholesterol và mỡ đã làm tăng dần nồng độ cholesterol huyết thanh đến mức vào cuối thời gian 2 tuần, nồng độ cholesterol huyết thanh trung bình đã tăng đến 600 mg%. Vào cuối thời gian 3 tháng, các nồng độ cholesterol huyết thanh cuối cùng đạt 1700 mg%. Các dấu hiệu rõ rệt của các thay đổi vữa xơ động mạch thường phát triển ở giai đoạn này, được chứng tỏ bởi sự tích lũy các chất lipid trong mống mắt thỏ.

Các thuốc thử nghiệm thường được kết hợp với chế độ ăn cho động vật. Một thuốc có tác dụng mạnh dự phòng chứng tăng cholesterol máu gây bởi cholesterol là di-N-(α -methylbenzyl) linoleamid, một chất ức chế sự hấp thu cholesterol qua đường ruột. Thuốc clofibrat, khi cho ăn ở 0,3%, chỉ gây sự giảm nhẹ các nồng độ cholesterol huyết thanh (Kritchevsky và cộng sự, 1969). Các kết quả này không hoàn toàn bất ngờ vì các chất ức chế sinh tổng hợp cholesterol có thể không có tác dụng trên tăng cholesterol máu gây bởi việc cho ăn cholesterol.

2.3.2. Chế độ ăn bán tổng hợp không có cholesterol

Những nhà nghiên cứu khác nhau đã báo cáo việc cho thỏ ăn mỡ bão hòa, không có cholesterol, gây tăng cholesterol máu có liên quan chặt chẽ hơn với chứng tăng cholesterol máu ở người (Kritchevsky và Tepper, 1968). Động vật được nuôi với chế độ ăn này phát triển vữa xơ động mạch giống như chứng bệnh này ở người. Nó có vẻ khác với vữa xơ động mạch quan sát thấy ở động vật cho ăn cholesterol. Thỏ được nuôi bằng chế độ ăn bán tổng hợp (400 – 600 mg% trong 8 tuần) có tăng cholesterol máu ở mức độ vừa và thường phát triển chậm hơn chứng bệnh này ở động vật cho ăn cholesterol. Howard và cộng sự (1967) gợi ý việc sử dụng phương pháp này để nghiên cứu sàng lọc các thuốc tác dụng trên sự chuyển hóa lipid vì cholesterol huyết tương được tổng hợp một cách nội sinh, và có nồng độ trong phạm vi giới hạn của nồng độ thường gặp trong tăng cholesterol máu của người. Điều bất lợi nhỏ trong việc sử dụng chế độ ăn không có cholesterol là độ dài của thời gian cần thiết cho sự phát triển tăng cholesterol máu (8 tuần). Thỏ cho ăn cholesterol phát triển nồng độ cao của cholesterol huyết thanh trong khoảng 2 tuần.

2.4. Chim

Gà con, chim bồ câu và gà tây rất nhạy cảm với việc cho ăn cholesterol và phát triển tăng cholesterol máu rõ rệt trong thời gian tương đối ngắn (Fukushima và cộng sự, 1969b; Simpson và Harms, 1969). Tác dụng của các thức ăn mỡ khác nhau trên các nồng độ cholesterol huyết thanh ở gà con được cho ăn cholesterol cho thấy các mỡ không bão hòa gây tăng cholesterol máu nhiều hơn các mỡ bão hòa (Kritchevsky, 1964). Tennent và cộng sự (1960) mô tả một ví dụ điển hình về tăng cholesterol máu gây bởi cholesterol. Dừng gà trống lơgo non (9 – 11 tuần tuổi) được nuôi với một chế độ ăn thường quy có bổ sung cholesterol (2%) và dầu hạt bông (5%). Bốn ngày sau, nồng độ cholesterol huyết tương đã tăng 3,5 lần, từ khoảng 70 mg% lúc ban đầu lên khoảng 250 mg% vào ngày cho ăn thứ tư. Fukushima và cộng sự (1969b) dùng một chế độ ăn tương tự nhưng trong khoảng thời gian dài hơn (7 ngày), và báo cáo về cơ bản mức tăng tương tự của các nồng độ cholesterol huyết tương. Sự tăng cholesterol máu gây bởi cholesterol này có tính chất ngoại sinh và không bị ảnh hưởng bởi các thuốc ức chế sinh tổng hợp cholesterol. Kraus và cộng sự (1967) cho thấy thiamazol (tapazol) làm tăng rõ rệt các nồng độ cholesterol huyết thanh ở các chim bồ câu trắng cho ăn và không cho ăn cholesterol. Tăng cholesterol máu này khá nhạy cảm với các thuốc giống tác dụng tuyến giáp, như thyroxin, làm tăng sự thoái biến của cholesterol.

III. CÁC MÔ HÌNH THỰC NGHIỆM TRÊN ĐỘNG VẬT TRUNG GIAN

3.1. Chó

Tăng cholesterol máu kéo dài, cuối cùng dẫn đến phát triển vữa xơ động mạch, đã được gây trên chó bằng cách cho các chế độ ăn chứa cholesterol, acid mật, và có thể chất ức chế tuyến giáp thiouracil (Malmros và Sternby, 1968; Mc Curdy và cộng sự, 1969).

Bevans và cộng sự (1951) gây tăng cholesterol máu trên chó 4 tháng tuổi, được nuôi với chế độ ăn chứa cholesterol (5%) và thiouracil (0,6 g/ngày). Vào lúc cuối của một tháng, đã phát triển tăng cholesterol máu rõ rệt (1000 mg%, cao hơn 5 lần so với trị số đối chứng). Việc rút chế độ ăn gây tăng cholesterol máu trong một tuần dẫn đến sự giảm các nồng độ cholesterol huyết thanh xuống trị số trước chế độ ăn là 200 mg%. Malmros và Sternby (1968) chứng minh không nhất thiết phải chặn chức năng tuyến giáp để phát triển tăng cholesterol máu. Cũng đã chứng minh sự kết hợp cholesterol với dầu dừa hydro hóa đủ để gây tăng cholesterol máu rõ rệt. Sự xuất hiện tăng cholesterol máu hơi chậm so với tăng cholesterol máu gây bởi cholesterol và thiouracil.

3.2. Lợn và linh trưởng

Đã gây tăng cholesterol máu ở lợn bằng cách cho các chế độ ăn được bổ sung với bơ, lòng đỏ trứng, và mỡ bão hòa (Harman, 1969). Tuy vậy, đã chứng minh là sự kết hợp của mỡ không bão hòa với cholesterol trong chế độ ăn gây mức độ lớn nhất của vữa động mạch điển hình và các mức cholesterol cao nhất trong mô, trong khi các mỡ bão hòa với cholesterol chỉ gây các tổn thương không điển hình.

Tương tự như vậy, đã gây tăng cholesterol máu ở linh trưởng bằng cách cho chế độ ăn thực nghiệm chứa cholesterol và bơ (Wissler, 1968). Các nồng độ cholesterol huyết thanh toàn phần 300 – 600 mg% phát triển trong vòng 1 – 3 tháng ở khỉ Rhesus được nuôi với các chế độ ăn như vậy. Vữa xơ động mạch bao giờ cũng phát triển ở các động vật thực nghiệm (khỉ Rhesus) phát triển tăng cholesterol máu. Tính chất nặng và mức độ vữa xơ động mạch ở khỉ nói chung tỷ lệ với mức độ và thời gian kéo dài tăng cholesterol máu. Các mô hình thực nghiệm trên động vật có thể dùng để đánh giá các thuốc hạ cholesterol máu và tác dụng của các thuốc này trên quá trình vữa xơ động mạch.

Wissler (1968) tóm tắt các lợi thế chính trong việc dùng khỉ Rhesus trong vữa xơ động mạch thực nghiệm: (a) các nồng độ lipid máu bình thường và các nồng độ cholesterol máu dẫn đến vữa xơ động mạch giống với các nồng độ này ở người; (b) các tổn thương thể hiện sự giống nhau nổi bật với các tổn thương ở người; và (c) các động mạch có liên quan và các tai biến lâm sàng cũng giống với các tai biến ở người.

IV. TĂNG CHOLESTEROL MÁU GÂY BỞI ESTROGEN Ở CHIM

Việc cho estrogen tác dụng chậm (estradiol cyclopentylpropionat) cho gà mái và gà trống non gây trạng thái tăng lipid máu, trạng thái này cuối cùng dẫn đến phát triển các tổn thương vữa xơ động mạch. Các nồng độ cholesterol máu tăng gấp 10 lần so với đối chứng (908 mg% so với 133 mg%) trong vòng một tuần, sau một lần tiêm duy nhất β -estradiol tác dụng chậm cho gà con (Fukushima và cộng sự, 1969b). Sự tăng lipid máu này có tính nội sinh và không phụ thuộc vào sự có mặt của mỡ trong chế độ ăn (Steinberg, 1962). Như vậy có thể phát hiện các thuốc ức chế sinh tổng hợp cholesterol bằng thử nghiệm này. Đáng tiếc là điều này chỉ xảy ra với các liều khá độc. Thyroxin, một chất có thể tăng nhanh sự thoái biến chuyển hóa của cholesterol và thúc đẩy sự thải trừ các phospholipid huyết thanh, là thuốc có tác dụng mạnh nhất đảo ngược chứng tăng cholesterol máu do estrogen. Các thuốc ức chế sự hấp thu cholesterol qua ruột, như các dẫn xuất sitosterol và amid của acid linoleic, không có tác dụng (Fukushima và cộng sự, 1969b). Phương pháp đơn giản và nhanh và có thể thích hợp cho việc nghiên cứu tác dụng hạ cholesterol máu của các thuốc giống tác dụng tuyến giáp.

V. TĂNG CHOLESTEROL MÁU GÂY BỞI TRITON

Việc dùng toàn thân chất diện hoạt Triton WR-1339 cho chuột nhắt và chuột cống trắng nhện đôi và không nhện đôi dẫn đến sự tăng các nồng độ cholesterol và triglycerid huyết tương (Tamasi và cộng sự 1968; Fukushima và cộng sự, 1969b). Chủng tăng cholesterol này có 2 giai đoạn. Đầu tiên có sự tăng đột ngột các nồng độ cholesterol huyết thanh, đạt mức đỉnh gấp 2 – 3 lần trị số đối chứng vào lúc 24 giờ sau khi cho Triton (giai đoạn 1). Tăng cholesterol máu giảm xuống gần với trị số đối chứng trong vòng 24 giờ tiếp theo (giai đoạn 2).

Trong phương pháp của Tamasi và cộng sự (1968), chuột cống Wistar đực (190 – 230 g, để nhện đôi trong 16 giờ) nhận một liều tiêm duy nhất Triton WR-1339 (200 mg/kg). Thực hiện phân tích cholesterol huyết thanh vào lúc 6 giờ sau khi cho Triton. Frantz và Hinkelman (1955) dùng Triton với liều 100 mg/kg tiêm trong màng bụng. Phân tích cholesterol vào lúc 18 giờ sau khi tiêm Triton. Thuốc thử nghiệm dùng trong phương pháp này được cho đồng thời với Triton (giai đoạn 1) hoặc 22 giờ sau khi cho Triton (giai đoạn 2).

Cơ chế của tăng cholesterol máu do Triton trong giai đoạn 1 được coi là do tăng sinh tổng hợp cholesterol ở gan do khả năng của Triton tác động đến sự tiếp nhận lipid huyết tương bởi các mô (Garrattini và cộng sự, 1959). Đã chứng minh các thuốc tác dụng trên sự sinh tổng hợp cholesterol nội sinh, như các dẫn xuất của acid α -phenylbutyric có tác dụng trong giai đoạn 1 của thử nghiệm, trong khi các thuốc tác dụng trên sự bài tiết và chuyển hóa cholesterol có tác dụng trong giai đoạn 2 (Paoletti và Fumagalli, 1964).

Thyroxin được chứng minh có tác dụng ức chế giai đoạn 1 và thúc đẩy nhanh giai đoạn 2 của tăng cholesterol máu do Triton (Steinberg, 1962). Do đó, phương pháp này có vẻ không có tính chọn lọc để nghiên cứu các thuốc tác dụng trên sinh tổng hợp cholesterol.

VI. TĂNG CHOLESTEROL MÁU GÂY BỞI TWEEN 80

Trong phương pháp của Kellner, Correll và Ladd, được áp dụng và mô tả bởi Cheymol và cộng sự (1965), đã dùng Tween 80 để gây tăng cholesterol máu trên thỏ. Tween 80 gây sự tăng cholesterol huyết tương nhanh, nhưng trong thời gian ngắn chủ yếu do tăng cholesterol nội sinh. Thỏ được cho chế độ ăn thường quy.

Trong các thí nghiệm đối chứng, tiêm tĩnh mạch cho thỏ 2,5 ml/kg Tween 80 (dung dịch 20% trong dung dịch natri clorid 0,9%), rồi một thể tích dung môi bằng hoặc hơn. Nếu không chú ý tiêm dung dịch NaCl đẳng trương, Tween 80, rất kích

ứng đối với thành mạch, có thể gây hoại tử tai khi tiêm vào tĩnh mạch vành tai thỏ. Nồng độ tối đa của cholesterol đạt được sau 4 giờ rưỡi hoặc 6 giờ, hiếm hơn sau 3 giờ hoặc 7 giờ rưỡi. Thường lấy máu trước khi tiêm Tween 80 và 4 giờ rưỡi sau khi tiêm để phân tích cholesterol huyết tương. Khi thử thuốc, sau khi đã làm thí nghiệm đợt thứ nhất trên 2 lô thỏ, một lô đối chứng và một lô thử thuốc, có thể để thỏ nghỉ trong 8 đến 10 ngày, sau đó đổi chéo các lô thỏ, lô thử thuốc thành lô đối chứng, và lô đối chứng thành lô thử thuốc, và thử lại đợt 2.

VII. BÀN LUẬN VÀ PHÂN TÍCH CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ CÁC THUỐC HẠ CHOLESTEROL MÁU

Một số phương pháp đã được trình bày để nghiên cứu các thuốc hạ cholesterol máu. Điều hiển nhiên là mỗi phương pháp có một số hạn chế vốn có, và như vậy một thuốc thử nghiệm không thể được chấp nhận hoặc bị loại bỏ dựa trên một phương pháp duy nhất. Nhiệm vụ sẽ dễ hơn nếu nhà nghiên cứu xem xét cơ chế cơ bản chịu trách nhiệm về tình trạng tăng cholesterol máu của động vật thực nghiệm và có thể, nếu được biết, cơ chế hạ cholesterol máu của thuốc thử nghiệm. Ví dụ, tăng cholesterol máu do chế độ ăn chỉ có ích trong việc phát hiện các thuốc có tác dụng trên hấp thu, thoái biến và bài tiết cholesterol. Không phát hiện được các thuốc tác dụng trên sinh tổng hợp cholesterol và tăng cholesterol máu được gây do ngoại sinh, và sự tổng hợp cholesterol nội sinh được diễn ra với tỷ lệ rất thấp.

Việc sử dụng tăng cholesterol máu ở thỏ, gây bởi các chế độ ăn không có cholesterol, có thể phát hiện các chất có khả năng ức chế sinh tổng hợp cholesterol. Ngoài ra, phương pháp sau này tạo cơ hội cho việc nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc làm đảo ngược vữa xơ động mạch. Vì khi và lợn phát triển các mảng vữa xơ động mạch giống nhiều hơn với các mảng này ở người so với ở thỏ, các động vật này giúp ích nhiều hơn thỏ trong nghiên cứu sự đảo ngược của vữa xơ động mạch. Một bất lợi khác trong việc dùng thỏ để nghiên cứu vữa xơ động mạch là đã chứng minh việc cho cholesterol hoặc mỡ bão hòa dẫn đến xơ gan.

Việc sử dụng các động vật có cholesterol máu bình thường để nghiên cứu sàng lọc sơ bộ có lợi thế về tính chất nhanh và đơn giản, và thường có thể phát hiện các chất ức chế sự hấp thu và sự tổng hợp cholesterol. Các phương pháp dùng tăng cholesterol máu do Triton hoặc Tween 80 có lợi thế là nhanh và giúp phát hiện các thuốc có tác dụng trên sự sinh tổng hợp và sự thải trừ cholesterol. Các thử nghiệm này khá đơn giản và nhanh, do đó, thích hợp cho việc nghiên cứu sàng lọc ban đầu.

CHƯƠNG 12

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CHỐNG VIÊM

GS. Đoàn Thị Nhu

MỞ ĐẦU

Viêm là một phản ứng không đặc hiệu của mô do bị sự tấn công của các yếu tố hóa học, vật lý hay sinh học. Trong thành phần các yếu tố tấn công, thường có yếu tố miễn dịch hay vi sinh vật. Phản ứng viêm phát triển thành hai giai đoạn. Giai đoạn thứ nhất tiến triển rất nhanh và là giai đoạn cấp tính. Giai đoạn thứ hai bao gồm những hiện tượng phức tạp, là sự phối hợp của những hiện tượng viêm và những quá trình sửa chữa, là giai đoạn mạn tính.

Giai đoạn cấp tính gồm những hiện tượng về mạch máu và một phản ứng tế bào xuất hiện sớm. Ở những mô bị yếu tố tấn công làm tổn thương, các tiểu động mạch bị giãn gây nên ứ huyết trong các mao mạch. Trạng thái phù nề của mô là do sự rỉ dịch huyết tương qua thành các mao mạch vào trong khoang ngoài tế bào. Sự xuyên mạch của bạch cầu xảy ra song song với sự rỉ dịch huyết tương. Những hiện tượng cấp tính này là do sự can thiệp của hai yếu tố: yếu tố thần kinh là sự tê liệt các dây thần kinh co mạch ở các mao mạch, và yếu tố thể dịch là sự giải phóng các chất trung gian hóa học như histamin, serotonin, leucotaxin và bradykinin.

Histamin được sản sinh bởi các dưỡng bào và một số cấu trúc thần kinh và được giải phóng do sự kích thích các dây thần kinh giãn mạch gây giãn các mao mạch. Serotonin, do các tế bào ưa bạc của ống tiêu hóa và các dưỡng bào sản sinh ra, có thể có vai trò trong sự giải phóng histamin. Một số tác giả cho rằng serotonin có tác dụng trực tiếp gây giãn các tiểu động mạch. Leucotaxin, được tìm thấy ở các ổ viêm, không giống như histamin vì không có tác dụng gây co bóp ruột cô lập của chuột lang. Leucotaxin làm tăng độ thấm mao mạch và sự di cư tế bào.

Một số tác giả cho rằng bradykinin cũng có vai trò trong phản ứng viêm. Trong thực nghiệm, chất này có thể gây hiện tượng phù xuất hiện nhanh mà cường độ phụ thuộc vào liều.

Giai đoạn mạn tính của phản ứng viêm gồm một phản ứng tế bào phát triển chậm và sự tạo nên mô tạo keo. Sự di cư tế bào nguồn gốc từ máu hoặc từ trung mô vẫn tiếp diễn ở ổ viêm rất lâu sau sự can thiệp của yếu tố tấn công. Ổ viêm có thể tiến tới chỗ làm mủ hoặc hoại tử. Sự tăng sinh nguyên bào sợi và những tân tạo mao mạch tạo thành u hạt. U hạt này, khi tiến triển, mất các thành phần tế bào và các mao mạch tân tạo, trong khi đó, mô tạo keo xuất hiện dần dần.

Mỗi giai đoạn của quá trình viêm này có thể được nghiên cứu bởi những phương pháp thích hợp. Mỗi rối loạn có thể được sửa chữa bởi những thuốc đặc hiệu nhiều hay ít.

I. CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU TRÊN PHÙ THỰC NGHIỆM

1.1. Thử nghiệm trên phù chân chuột gây bằng kaolin (*Ducommun, 1952*)

Dùng chuột cống trắng. Trước khi thí nghiệm, cho chuột uống nước 0,5 ml cho 100g thể trọng. Gây phù bàn chân chuột bằng cách tiêm dưới da ở bề mặt gan bàn chân sau chuột 0,1 ml dịch treo chứa 1g kaolin trong 10 ml dung dịch có 0,2% gồm adragan, được pha chế ngay trước khi tiêm, vì nếu để lâu, kaolin sẽ lắng xuống.

Đo thể tích bàn chân sau tới khớp cổ chân bằng một dụng cụ đo thể tích trước và 5 giờ sau khi tiêm kaolin (vào lúc phù chân chuột gây bằng kaolin ở mức độ cao nhất). Mức độ tăng thể tích chân chuột biểu thị mức độ viêm cấp và được tính theo công thức:

$$X\% = \frac{V_5 - V_0}{V_0} \times 100$$

trong đó: X% là tỷ lệ % tăng thể tích bàn chân chuột; V_0 là thể tích bàn chân trước khi tiêm kaolin; và V_5 là thể tích bàn chân 5 giờ sau khi tiêm kaolin.

Thuốc thử nghiệm, nếu cho uống thì cho chuột uống 1 giờ trước khi tiêm kaolin; nếu tiêm thuốc thì tiêm 30 phút trước khi tiêm kaolin. Chuột đối chứng được cho dung dịch NaCl đẳng trương. Tác dụng ức chế phù được biểu thị bằng tỷ lệ % giảm mức độ tăng thể tích bàn chân của lô chuột thử thuốc so với mức độ tăng của lô đối chứng và được tính theo công thức:

$$Y\% = \frac{M_C - M_T}{M_C} \times 100$$

trong đó: Y% là tỷ lệ % giảm mức độ phù bàn chân chuột; M_C là tỷ lệ % tăng thể tích bàn chân chuột lô đối chứng, và M_T là tỷ lệ % tăng thể tích bàn chân chuột lô thử thuốc.

1.2. Thử nghiệm trên phù chân chuột gây bằng carragenin (*Winter và cộng sự, trích dẫn bởi Levy và cộng sự, 1968*).

Trong thử nghiệm này, gây phù bàn chân sau của chuột bằng cách tiêm dưới da ở bề mặt gan bàn chân sau của chuột 0,1 ml dịch treo 0,8% carragenin, pha trong nước cất hay dung dịch NaCl đẳng trương. Cách pha dịch treo: cho carragenin vào một cối nhỏ, cho dần nước vào và nghiền bằng chày cho phân tán đều. Để nửa giờ cho phồng lên rồi hãy dùng. Chỉ pha trước khi dùng, vì nếu để lâu carragenin sẽ lắng xuống.

Trong quá trình viêm gây bởi carragenin, mức độ viêm tối đa ở trong khoảng thời gian 3 – 4 giờ. Nên để đánh giá mức độ viêm, đo thể tích bàn chân tới khớp cổ chân trước và 3 giờ sau khi tiêm carragenin. Trừ một số đặc điểm nêu trên, thử nghiệm trên phù chân chuột gây bằng carragenin được tiến hành tương tự như phù chân chuột gây bằng kaolin.

Carragenin (viscarin) là chất sulfopolygalactosid, chiết xuất từ *Chondrus crispus*, có tác dụng gây viêm.

II. THỬ NGHIỆM TRÊN BAN ĐỎ GÂY BỞI TIA TỬ NGOẠI Ở CHUỘT LANG

Dùng chuột lang trắng, cân nặng tối thiểu 300g. Cạo lông thật kỹ ở một bên cột sống (xén lông rồi bôi nước làm rụng lông), và 4 giờ sau, chuột đã sẵn sàng để thử nghiệm. Việc chọn chất làm rụng lông rất quan trọng. Một số chế phẩm làm rụng lông gây kích thích da ngay cả sau khi để nghỉ 4 giờ, điều đó làm sai lệch sự đánh giá về ban đỏ. Mỗi lô gồm 8 chuột lang được chiếu tia tử ngoại làm đối chứng, chuột được giữ ở tư thế nằm sấp ở khoảng cách 30 cm với một đèn tử ngoại 400 óát. Sự chiếu tia kéo dài 30 phút; 2 giờ sau ban đỏ ở mức tối đa và trông rõ.

Ngày hôm sau, những chuột lang đó được chiếu tia tử ngoại lần thứ hai ở bên kia của cột sống, cho thuốc thử nghiệm bằng ống thông vào dạ dày. Chất tham chiếu là aspirin với liều 240 mg/kg cho uống. Mọi chế phẩm có hoạt tính phải ức chế ít nhất 50p.100 ban đỏ so với mức ban đỏ đối chứng, mỗi chuột lang là đối chứng

của bản thân nó, vì đã được làm thử nghiệm trắng ngày hôm trước hôm thử nghiệm với thuốc (Levy và cộng sự, 1968).

Cần kiểm tra đều đặn hoạt tính của aspirin, vì có những lúc không thấy aspirin có hoạt tính. Việc điều trị với một liều lớn như vậy buộc phải thẩm tra sự xuất hiện của các triệu chứng độc, trong khoảng thời gian 24 giờ thử nghiệm. Trong trường hợp có triệu chứng độc, kết quả không có giá trị. Làm lại thí nghiệm với liều thấp hơn cho tới khi không còn có triệu chứng độc (Wilhelmi, 1949; Adams, 1960).

Thử nghiệm bằng phương pháp chiếu tia tử ngoại nghiêm ngặt hơn thử nghiệm trên phù chân chuột, và không do kích thích tuyến thượng thận. Có thể áp dụng để nghiên cứu thuốc chống viêm dưới dạng pomad, lưng chuột lang được bôi thuốc trước khi chiếu tia. Các thử nghiệm trên phù chân chuột với carragenin và ban đỏ bằng chiếu tia tử ngoại bổ sung cho nhau. Trong thử nghiệm gây ban đỏ, đánh giá mức độ viêm bằng cách đo diện tích ban đỏ.

III. CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU TRÊN U HẠT THỰC NGHIỆM (Levy, 1968)

Khi những triệu chứng xuất hiện sớm của phản ứng viêm đã giảm đi, ổ kích ứng bị xâm chiếm bởi những tế bào di động từ máu và từ mô liên kết ở kề bên tới, như những tế bào của mô lưới. Chúng tạo thành một khối tế bào non rất hoạt động và làm hai nhiệm vụ: nhiệm vụ thực bào và tập hợp chung quanh những vùng hoại tử và những vật lạ, rồi chúng gây nên sự tăng sinh nguyên bào sợi và sự tạo thành mô hạt.

Trong thực nghiệm, người ta có thể gây sự tạo thành mô hạt bằng cách cấy dưới da động vật những vật lạ hay chất kích ứng không hấp thu được. Những vật lạ và chất kích ứng này đều gây một phản ứng của mô bào lưới, và sau đó sự tạo thành u hạt. Tùy theo phương pháp áp dụng, phản ứng viêm sẽ có hình thái khác nhau.

3.1. Thử nghiệm trên u hạt thực nghiệm gây bằng amian (Ducrot, Julou và cộng sự, 1963)

Thí nghiệm được tiến hành trên chuột cống trắng. Một mẫu sợi amian đường kính mặt cắt khoảng 2 mm, có trọng lượng 30 ± 1 mg được vê tròn và sấy tiệt khuẩn trong 2 giờ ở nhiệt độ 160°C trong tủ sấy. Chuột được gây mê bằng ether. Cạo sạch lông vùng lưng phía trên, dùng kéo phẫu thuật mắt bấm một lỗ chéo sang bên, luồn kéo vào hướng lên đầu, mở rộng 2 mũi kéo để tách kỹ da lưng ra khỏi cơ, rồi cấy dưới da, vào nơi đã bóc tách, viên sợi amian. Đặt kẹp hoặc khâu bằng chỉ để nối liền chỗ mổ ở lưng.

Thuốc được cho uống hoặc tiêm dưới da mỗi buổi sáng trong 5 ngày liên tục, lần đầu cho thuốc ngay sau khi cấy viên sợi amian. Chuột đối chứng được cho nước muối sinh lý với cùng thể tích. Chiều ngày thứ 5 kể từ ngày mổ (ngày mổ: ngày 1), giết chuột bằng cloroform, bóc tách u hạt và cân tươi ngay từng u hạt; khi cân, để trong một miếng giấy không hút ẩm. Tính trọng lượng thực sự của u hạt bằng cách trừ trọng lượng viên sợi amian (30 mg).

Khi mổ chuột, dùng dụng cụ đã được tiệt khuẩn bằng cách luộc trong nước đun sôi. Sau đó ngâm trong một cốc có chân dựng cồn 90° trong đó cho một lượng thuốc kháng sinh (ví dụ: streptomycin). Mỗi lần dùng xong lại đặt ngâm dụng cụ vào đó.

Tác dụng ức chế sự tạo u hạt được biểu thị bằng tỷ lệ % giảm trọng lượng trung bình các u hạt ở lô thử thuốc so với trọng lượng này ở lô đối chứng.

Chú ý khi tiệt khuẩn viên sợi amian, gói nó trong miếng giấy không hút ẩm.

3.2. Thử nghiệm trên áp xe gây bằng tinh dầu thông (Levy, 1968)

Việc tiêm tinh dầu thông cho chuột cống trắng dưới da gây nên một áp xe vô khuẩn. Áp xe gồm một ổ trung tâm chứa chất kích ứng, những mảnh mô vụn và bạch cầu đa nhân, kế sát bên là lớp mô hoại tử chứa nhiều bạch cầu đa nhân và bạch cầu ưa acid bao trong một mạng lưới tơ huyết, bên ngoài là mô hạt gồm những nguyên bào sợi và đại thực bào, và có nhiều mạch máu (một mạng lưới mao mạch tân tạo). Áp xe cuối cùng được bao quanh bởi một vùng phù ngoại tâm với chiều dày khác nhau.

Áp xe được định hình rõ sau trung bình 8 ngày phát triển, khi đó có thể bóc tách lấy áp xe và cân. Trọng lượng áp xe cho phép đánh giá tầm quan trọng của phản ứng viêm.

Phương pháp này dễ áp dụng với điều kiện quan tâm thực hiện đúng một số quy định. Lượng tinh dầu thông tiêm dưới da không được quá 0,5 ml, nếu tiêm thể tích lớn hơn có thể gây hoại tử rộng ở da chung quanh chỗ tiêm. Cần chú ý nơi tiêm, nơi tiêm thích hợp nhất ở chuột cống trắng là vùng gian vai, ở khoảng chỏm của xương bả vai; ở vùng này, mô liên kết dưới da dày đặc hơn và được lót bởi một lớp đáng kể tế bào mỡ ngăn cản sự lan toả của chất kích ứng. Cuối cùng, cần phải tiêm tinh dầu tuyệt đối vô khuẩn.

Nói chung, các thuốc chống viêm làm chậm sự phát triển của mô hạt, và có thể được đánh giá tác dụng một cách tổng hợp bằng việc bóc tách và xác định trọng lượng áp xe. Xét nghiệm mô học thành của áp xe cho thấy những thay đổi về cấu trúc gây nên bởi các thuốc chống viêm: lớp mô liên kết mỏng hơn, chứa ít nguyên bào sợi và sợi chất tạo keo nhưng chứa nhiều đại thực bào hơn. Xét nghiệm mô học

thành của áp xe chứng minh cụ thể tác dụng làm chậm sự tạo thành mô hạt của các thuốc chống viêm.

IV. THỬ NGHIỆM GÂY DỊCH RỈ MÀNG PHỔI TRÊN CHUỘT CỐNG TRẮNG GIÀ

Dùng chuột cống trắng già 180 – 260 g. Cho mỗi chuột uống 5 ml nước bằng ống thông vào dạ dày. Sau đó để chuột nằm ngửa, cạo lông ở bên sườn phải, ngay dưới chân trước. Dùng một bình hút ẩm, lót bông ở đáy, tắm ether để gây mê chuột. Đồng thời chuẩn bị một cốc vại đáy lót bông tắm ether để tiếp tục gây mê khi chuột hơi tỉnh trở lại. Chuẩn bị tinh dầu thông.

Sau khi cho chuột uống nước một giờ, tiến hành gây dịch rỉ màng phổi chuột như sau: cho chuột vào trong bình có ether để gây mê; khi chuột đã mê, lấy ra, đặt nằm nghiêng. Dùng kéo nhỏ đầu nhọn, rạch một nhất dài 1 cm ở chỗ đã cạo lông ở da và lớp cơ, để thấy rõ xương sườn. Tiêm 0,15 ml tinh dầu thông trong màng phổi vào khoảng giữa hai xương sườn, dùng kim tiêm dài 1,5 cm, loại kim to. Để bơm tiêm theo chiều thẳng đứng khi bơm tinh dầu thông. Đặt một kẹp nối liền hai mép của vết rạch.

Sau 2 giờ rưỡi kể từ khi tiêm tinh dầu thông trong màng phổi, giết chuột bằng cách cho ngửi cloroform trong bình kín. Sau đó để chuột nằm ngửa, mổ từ bụng lên, rạch hai vết dọc hai bên trên cơ hoành. Dùng cặp phẫu tích kẹp vào xương ức và nâng lên cao. Dùng ống nhỏ giọt hút hết dịch rỉ ở giữa hai màng phổi. Khi hết, dựng nửa người chuột lên để dốc dịch rỉ xuống rồi hút lần nữa cho thật hết. Cho dịch rỉ vào ống nghiệm có chia độ, đo lượng dịch rỉ với mỗi chuột (Spector và Willoughby, 1958, 1959).

Trong trường hợp cần thiết, có thể định lượng histamin và serotonin trong dịch rỉ. Cho một giọt heparin vào ống nghiệm trước khi cho dịch rỉ vào ống. Ống nghiệm trong trường hợp này được ngâm trong nước đá cục.

V. THỬ NGHIỆM TRÊN VIÊM ĐA KHỚP THỰC NGHIỆM DO *MYCOPLASMA ARTHRITIS* (Ward và Russel, 1962; Wiesinger, 1964)

5.1. Cách tiến hành

Việc gây viêm đa khớp gồm ba giai đoạn:

- *Giai đoạn thứ nhất:* Nghiền một mảnh của sarcom lympho Murphy chứa *Mycoplasma arthritis* và là môi trường tốt cho sự phát triển của yếu tố gây bệnh. Cần 20g của khối u này để thực hiện gây viêm đa khớp ở 30 chuột cống trắng cân

nặng 120 – 150 g. Chất nghiền được làm thành dịch treo trong 4 phần dung dịch NaCl 0,9% có cho thêm 400.000 đơn vị penicilin và 1.000.000 đơn vị colistin methansulfonat để tránh bội nhiễm những vi khuẩn thường. Hỗn hợp được ly tâm trong 30 phút và phần nổi bên trên được giữ lại.

- *Giai đoạn thứ hai*: Sản xuất ra dịch rỉ để gây viêm khớp. Tiêm 30 ml không khí vô khuẩn dưới da lưng chuột cống trắng 120 – 150 g để gây một tràn khí da, và tiêm 2 ml chất nổi bên trên được giữ lại trong giai đoạn thứ nhất vào đó. Sau 6 – 10 ngày, các túi chứa 5 – 10 ml một dịch đục chứa nhiều vi khuẩn *Mycoplasma arthritis*; lấy dịch đó ra một cách vô khuẩn, và dịch đó phải được dùng ngay, tuy nó vẫn giữ hoạt tính trong nhiều tuần ở nhiệt độ -20°C .

- *Giai đoạn thứ ba*: Gây viêm đa khớp. Trên những chuột cống trắng khác cân nặng 120 - 150g, chỉ cần tiêm phúc mạc 1 ml hỗn hợp gồm những phần đều nhau của dịch rỉ và của dung dịch dextran 6%. Hỗn hợp gây viêm khớp này gây viêm đa khớp ở 85% chuột.

Những triệu chứng viêm khớp đầu tiên xuất hiện vào ngày thứ ba hay thứ tư. Các triệu chứng đạt mức tối đa về cường độ và số lượng vào ngày thứ chín, và bắt đầu giảm vào ngày 12 đến ngày 15, mất hẳn vào ngày 20, và để lại một cứng khớp thể xơ. Chúng viêm đa khớp được quan sát thấy nhiều nhất ở những khớp ở xa nơi tiêm, khớp chày – cổ chân, khớp quay – cổ tay, khớp xương cổ chân, khớp xương cổ tay và những khớp giữa các đốt ngón tay, chân. Đầu gối và khuỷu tay ít bị viêm, cột sống thường không bị viêm.

Ở những khớp viêm, da đỏ, nóng, sưng và các phần mềm tăng thể tích, đôi khi có hiện tượng viêm tấy. Viêm khớp không có mủ, nhưng người ta thấy có *Mycoplasma* trong dịch ở các khớp viêm.

5.2. Đo cường độ viêm đa khớp

Việc quan sát hàng ngày 4 khớp hay nhóm khớp, qua da cạo nhẵn của những chân trước và sau, cho phép xác định một chỉ số viêm khớp; điểm 0 tương ứng với trạng thái bình thường, điểm 1 tương ứng với một ban đỏ nhẹ, điểm 2 là vừa ban đỏ vừa sưng, điểm 3 là trạng thái sưng tấy giả. Hàng ngày, cộng những chỉ số viêm khớp ở các chuột và người ta được một chỉ số viêm mà trị số tối đa về lý thuyết là 48.

Với phương pháp này, ngày thứ sáu ta đạt chỉ số viêm là $9,45 \pm 0,72$, và ngày thứ chín chỉ số viêm là $16,07 \pm 0,08$ (kết quả trên 100 chuột cống trắng). Sau 12 ngày, chỉ số viêm giảm dần. Những kết quả có ý nghĩa nhất đạt được ở các ngày thứ chín và thứ mười.

Một số điểm cần chú ý: các thủ thuật phải được thực hiện trong điều kiện vô khuẩn; mỗi thí nghiệm phải tiến hành với cùng lô dịch rỉ gây viêm khớp. Lượng dịch rỉ gây viêm khớp thích hợp nhất là 0,5 ml; chỉ số viêm tỷ lệ với lượng dịch rỉ viêm ở những liều 0,125; 0,250 và 0,500 ml. Những liều cao hơn không làm tăng chỉ số, và những liều nhỏ hơn làm viêm khớp chậm phát triển.

5.3. Thử nghiệm tác dụng chống viêm khớp của thuốc

Thuốc thử nghiệm được cho uống hoặc tiêm dưới da hàng ngày trong 8 ngày, bắt đầu từ ngày tiêm dịch rỉ để gây viêm khớp. Động vật được nuôi giữ trong một tuần trước thí nghiệm và trong tất cả thời gian thí nghiệm ở nhiệt độ hằng định 23°C, được cho một chế độ ăn tiêu chuẩn hóa và nước uống tùy thích.

Những thuốc sau đây có tác dụng chống viêm khớp trong mô hình thực nghiệm này, theo thứ tự hoạt tính giảm: deltacortison, indomethacin, acid flufenamic. Prednison đặc biệt có tác dụng trong bệnh viêm khớp. Azathioprin (thuốc chẹn miễn dịch) có tác dụng chống viêm khớp.

VI. THỬ NGHIỆM TRÊN VIÊM KHỚP THỰC NGHIỆM GÂY BỞI CHẤT BỔ TRỢ FREUND (*Newbould B. B., 1963*)

Phương pháp này gây bệnh giống như viêm khớp ở bàn chân chuột cống trắng. Dùng những nhóm 3 chuột cống đực trắng, không mang tác nhân gây bệnh, cân nặng khoảng 200 g. Cho chuột uống thuốc thử nghiệm. Với 5 nhóm thử thuốc, có một nhóm đối chứng. Một ngày sau, đo bàn chân phải sau về độ dày bằng một thước vi kế qua phần dọc giữa. Tiêm nội bì dưới bề mặt gan bàn chân của cùng bàn chân 0,05 ml chất bổ trợ bằng kim tiêm số 20.

Chất bổ trợ Freund là hỗn hợp của vi khuẩn *Mycobacterium* chết trong parafin lỏng, nhưng cũng có thể dùng dầu khoáng hoặc dầu thực vật, và một số trực khuẩn kháng acid, đã gây hội chứng kiểu viêm khớp. Trong phương pháp này, dùng trực khuẩn lao từ các chủng của người PN, DT và C; để vi khuẩn phát triển trong 8 tuần, diệt vi khuẩn bằng hơi nước, và sấy khô vi khuẩn trong tủ sấy chân không.

Tiếp tục cho chuột uống thuốc thử nghiệm tới ngày thứ 13, và lúc đó cân thể trọng chuột. Đo độ dày của bàn chân tiêm và tính tỷ lệ % tăng độ dày của bàn chân. Mức tăng độ dày là 5 đến 8 mm $\pm$ 0,5 mm đối với chuột đối chứng, 13 ngày sau khi tiêm dịch treo vi khuẩn. Mức độ nghiêm trọng của các tổn thương thứ phát, như sưng bàn chân trái sau, sưng các bàn chân trước, sưng các tai và sưng đuôi được đánh giá là không, nhẹ, vừa, nặng vừa, và nặng. Đuôi của chuột đối chứng có thể có một số hõn dọc theo phần giữa đuôi.

Tỷ lệ % ức chế sự tăng độ dày của bàn chân tiêm được tính theo công thức:

$$i = 100 [1 - (a - x) / (b - y)]$$

trong đó i là tỷ lệ % ức chế; y là độ dày trung bình của các bàn chân phải sau của chuột đối chứng trước khi tiêm; b là cùng độ dày ở ngày thứ 13; x là độ dày trung bình của bàn chân phải sau của các chuột thử thuốc trước khi tiêm; a là cùng độ dày trung bình ở ngày thứ 13. Phương pháp này dựa trên một hội chứng được coi là gần gũi hơn với viêm khớp dạng thấp so với mọi thử nghiệm khác. Hoạt tính chống viêm của phần lớn các loại thuốc có hiệu quả trong điều trị được phát hiện, trừ các thuốc chống sốt rét có liên quan với cloroquin.

VII. THỬ NGHIỆM TRÊN VIÊM ĐA KHỚP Ở CHUỘT CỐNG TRẮNG GÂY BẰNG CHẤT BỔ TRỢ (CHẤT SÁP D) PHÂN LẬP TỪ TRỰC KHUẨN LAO (*Ward và cộng sự, 1962*)

7.1. Cách tiến hành

Chất sáp D được phân tán và đồng nhất hóa trong một hỗn dịch gồm 1 phần Tween 80, 4 phần dầu parafin và 4 phần dung dịch NaCl 0,9%. Chất bổ trợ này cuối cùng có 1 mg sáp D trong 1 ml. Hỗn dịch được bảo quản trong lọ, tiệt khuẩn ở 120°C trong tủ sấy trong nửa giờ; lắc trước khi dùng. Thử nghiệm trên chuột cống trắng Wistar, từ 30 đến 90 ngày tuổi (để có tỷ lệ viêm khớp 80 - 100%). Tiêm dưới da ở gan bàn chân sau của chuột 0,5 ml hỗn dịch vô khuẩn để gây viêm khớp.

7.2. Mô tả viêm khớp và những tổn thương khác ở phủ tạng

- **Tổn thương ở khớp:** Có hai loại, một viêm khớp xuất hiện sớm ở nơi tiêm và viêm đa khớp thứ phát xuất hiện giữa ngày thứ 10 và 25 sau khi tiêm chất bổ trợ. Viêm khớp xuất hiện sớm không đặc trưng, được gây nên do tác dụng kích ứng của chất bổ trợ. Phù và đỏ da xuất hiện sau 24 giờ, phản ứng viêm này tiến triển một cách kín đáo trong 8 - 9 ngày, rồi tăng lên khi xuất hiện viêm đa khớp thứ phát.

Viêm đa khớp thứ phát là một phản ứng tăng cảm chậm. Đó là một viêm khớp di trú, thường gây tổn thương những khớp ở các chi. Những khớp đuôi chuột cũng luôn bị viêm. Viêm khớp kèm theo viêm khuếch tán các gân và bao gân. Phản ứng viêm tiến triển theo thể cấp tính hay bán cấp trong nhiều tuần, kèm theo sút cân, đạt mức tối đa giữa các ngày thứ 10 và 15 sau khi xuất hiện, mất đi sau trung bình một tháng, để lại những tổn thương dinh dưỡng tiến triển: phì đại xương, cứng khớp và co rút mô liên kết quanh khớp.

Đôi khi, phản ứng viêm nhẹ và mất đi không để lại di chứng; có khi, một khớp lành có thể bị mắc bệnh do một cơn viêm về sau, hiếm khi một khớp bị viêm trước lại bị viêm lại.

- **Tổn thương ở phủ tạng:** Các tổn thương này kèm theo viêm đa khớp trong một số trường hợp, và không bao giờ xảy ra khi không có viêm khớp. Đó là các tổn thương hệ bạch huyết, những hạch phụ thuộc ở chân tiêm chất bổ trợ và ở những chi bị bệnh luôn bị sưng; những tổn thương da thể hờn, thể ban khởi phát nhất thời và bệnh da mạn tính; và những tổn thương niêm mạc. Các tổn thương niêm mạc diễn ra ở mắt: viêm kết mạc, viêm giác mạc, viêm móng mắt - thể mi; ở bộ máy niệu - sinh dục: viêm niệu đạo và quy đầu-bao; ở đường tiêu hóa: tiêu chảy, thường phối hợp với viêm quy đầu và viêm niệu đạo.

7.3. Đánh giá mức độ viêm khớp ở giai đoạn viêm

Có hai phương pháp được dùng:

- Xác định chủ quan cường độ, đỏ và phù của các khớp ở các chi da cạo nhẵn, nghiên cứu riêng mức độ viêm ở chân được tiêm. Cách đánh giá cường độ phản ứng viêm từ 0 đến 4 ở mỗi khớp trong các khớp: khớp xương quay – cổ tay, khớp chày – cổ chân, khớp giữa các đốt phía trong của chân trước và chân sau. Những khớp xương bàn tay - ngón tay và khớp xương bàn chân - ngón chân được coi như là một khớp. Cụ thể: 0 là trạng thái bình thường, 1 là ban đỏ, 2 là vừa đỏ vừa sưng, 3 là viêm tấy giả; 4: tổn thương hoại tử ở chân được tiêm. Chỉ số viêm tối đa là 36 đối với viêm đa khớp thứ phát và 16 đối với viêm khớp nguyên phát.

- Đo sự thay đổi chiều dày của những bàn chân sau được tiêm. Cũng có 4 mức độ đánh giá cường độ những tổn thương thứ phát: bình thường, nhẹ, vừa, nặng, và chú ý tới thể trọng động vật.

7.4. Thử tác dụng thuốc chống thấp khớp trên viêm khớp nguyên phát

Ward (1962) cho thuốc hàng ngày cho động vật thí nghiệm trong 21 ngày kể từ khi tiêm chất bổ trợ, trộn lẫn thuốc với thức ăn. Kết quả đạt được từ những lô thử nghiệm gồm 15 chuột cống trắng chứng và 15 chuột thử thuốc, cho mỗi liều của mỗi thuốc. Ngày thứ 13, xác định hiệu lực của các thuốc thử nghiệm.

Newbould (1963) cho thuốc hàng ngày cho động vật thí nghiệm trong 14 ngày, liều đầu cho một ngày trước khi tiêm chất bổ trợ. Tác dụng của thuốc được đo ngày thứ 13 kể từ khi tiêm chất bổ trợ.

VIII. NGHIÊN CỨU SỰ DUNG NẠP THUỐC CHỐNG VIÊM BỞI DẠ DÀY (*Robert và Nezamis, 1957*)

Dùng những lô chuột cống trắng đực Wistar cân nặng 200 - 250g, mỗi lô 12 con. Để chuột nhịn đói không cho ăn thức ăn đặc, nhưng cho uống nước trong 4 ngày, và hàng ngày cho qua ống thông thực quản thuốc chống viêm, ví dụ như: 5 hay 10 mg indomethacin/kg; 0,05 hay 0,1 mg dexamethason/kg.

Quan sát đại thể niêm mạc dạ dày chuột đã xác nhận tác dụng gây loét của dexamethason và indomethacin. Tác dụng gây loét dạ dày được đánh giá bằng một xét nghiệm đại thể bằng kính lúp. Mức độ nặng nhẹ của những tổn thương được ghi nhận bằng phương pháp đánh giá như sau:

- + Tổn thương nhỏ hình chấm.
- ++ Tổn thương như những vết cấu bằng móng tay, to hơn, từ 2 – 5 mm đường kính.
- +++ Vết nứt rạn sâu, lõm xuống.

Đếm số lượng mỗi loại loét, và tính tổng cộng số điểm. Người ta có thể xác định một cách định lượng cường độ trung bình của những vết loét này.

Khi thử nghiệm sự dung nạp dạ dày của thuốc chống viêm cho những lô chuột khác nhau qua ống thông thực quản những liều hàng ngày như sau:

- a. Liều có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột một cách rõ ràng (một lần trong ngày);
- b. Liều gấp đôi liều trên (chia làm 2 lần trong ngày).

CHƯƠNG 13

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ
THUỐC ỨC CHẾ VÀ ĐIỀU HÒA MIỄN DỊCH VÀ
THUỐC KHÁNG HISTAMIN***GS. Đoàn Thị Nhu***I. NGHIÊN CỨU THUỐC ỨC CHẾ VÀ ĐIỀU HÒA MIỄN DỊCH**

Trong khi các phản ứng miễn dịch là một phần cấu thành của sự bảo vệ cơ thể chủ chống lại sự xâm nhập từ ngoài vào thì cũng các phản ứng này gây hại cho cơ thể chủ trong một số trường hợp. Sự tiến triển của một số phản ứng dị ứng nặng đối với các kháng nguyên lạ đôi khi dẫn đến sốc quá mẫn và chết. Các phản ứng miễn dịch là nguyên nhân gây các bệnh tự miễn dịch, trong đó đáp ứng của cơ thể chủ phá hủy mô của bản thân nó, và cũng là những phản ứng không mong muốn trong ghép cơ quan và ghép mô dẫn tới sự thải loại ghép. Nhiều nghiên cứu được tiến hành để tìm ra các thuốc chống thải ghép mô và cơ quan và điều trị bệnh tự miễn dịch.

CÁC PHƯƠNG PHÁP**1.1. Đáp ứng kháng thể thể dịch**

Các thuốc tác động trên sự sản sinh kháng thể lưu động được thử nghiệm với nhiều phương pháp khác nhau. Các phương pháp này khác nhau chủ yếu trong sự lựa chọn kháng nguyên, và do đó, trong các phương pháp xét nghiệm các nồng độ kháng thể. Các kháng nguyên tan như biến độc tố bệnh bạch hầu hoặc các phân đoạn protein huyết thanh có thể được dùng. Nhiều thử nghiệm dùng các kháng nguyên nguồn gốc vi khuẩn, như *Brucella suis*, hoặc vaccin bệnh thương hàn - cận thương hàn. Hiện nay phương pháp phổ biến nhất là dùng hồng cầu, nói chung là

của cừu, làm kháng nguyên. Dưới đây mô tả phương pháp của Nathan và cộng sự (1961) cùng với một số sửa đổi bổ sung bởi các nhà nghiên cứu khác.

Dùng hồng cầu cừu vô khuẩn được rửa 3 lần để tạo miễn dịch cho chuột nhắt trắng phối giống ngẫu nhiên nặng 20 – 25 g (hoặc một trong các giống nội phối chuẩn). Tiêm khoảng 1×10^8 hồng cầu treo trong nước muối đẳng trương trong màng bụng các nhóm 5 – 10 chuột nhắt.

Thực hiện sự điều trị với thuốc thử nghiệm với nhiều chương trình khác nhau. Nói chung, đầu tiên, cho thuốc vào thời điểm 24 – 72 giờ trước khi tiêm kháng nguyên và tiếp tục cho thuốc hàng ngày trong 10 ngày. Hoặc có thể lựa chọn một chương trình khác gồm 2 liều thuốc khá cao, cho vào thời điểm 48 giờ trước và 48 giờ sau khi tiêm kháng nguyên. Trong những thử nghiệm tiếp theo, áp dụng các chương trình khác để xác định thời gian cho thuốc tối ưu liên quan đến thời gian tiêm kháng nguyên. Có thể cho thuốc theo nhiều đường khác nhau, như tiêm dưới da, tiêm trong màng bụng, hoặc cho uống và một trong một số chất dẫn như nước muối đẳng trương hoặc dung dịch methyl cellulose 1% trong nước muối đẳng trương. Động vật đối chứng chỉ được tiêm chất dẫn.

Bảy ngày sau khi tiêm kháng nguyên, lấy máu bằng cách chọc tim và tách huyết thanh từ máu gộp chung. Khử hoạt tính của huyết thanh bằng cách sưởi ấm trong 30 phút ở 56°C để phá hủy hoạt tính của bổ thể. Các độ pha loãng hai lần trong nước muối đẳng trương nối tiếp nhau của huyết thanh được thực hiện trong các thể tích 0,5 ml ở các khay có các chỗ lõm, và 0,5 ml của dịch treo 0,5% hồng cầu cừu đã rửa được cho thêm vào mỗi giếng. Lắc các khay bằng tay để trộn các chất chứa trong các giếng, sau đó đặt lại và ủ trong 3 giờ ở 37°C .

Sự ngưng kết hồng cầu được cho điểm trên thang điểm 0 đến 4+, như mô tả bởi Stavitsky (1954). Có thể biểu thị kết quả bằng nồng độ tối thiểu của thuốc để giảm mức kháng thể một lượng quy định tùy ý, như 75% (Paget và cộng sự, 1969). Cũng có thể trình bày các kết quả bằng đồ thị bằng cách lấy máu từ xoang sau hốc mắt, ở nhiều khoảng cách thời gian, và vẽ sơ đồ sự tăng độ chuẩn kháng thể của cả nhóm thử thuốc và nhóm đối chứng theo thời gian (Haines và cộng sự, 1967).

Có thể sửa đổi phương pháp ở một số điểm. Có thể dùng các loài động vật khác, ví dụ chuột cống trắng (Haines và cộng sự, 1967). Có thể tiêm tĩnh mạch kháng nguyên (Nathan và cộng sự, 1961). Có thể ủ thuốc thử nghiệm với kháng nguyên trước khi tiêm (Markley và cộng sự, 1967).

1.2. Các tế bào tạo màng

Trong đáp ứng với việc tiêm kháng nguyên, các tế bào tạo ra kháng thể phát triển trong lách và mô lympho khác và có thể đếm được. Điều này cung cấp cơ sở để

xác định tác dụng ức chế miễn dịch của thuốc thử nghiệm. Một số phương pháp thử nghiệm dựa trên kỹ thuật mảng trên thạch của Jerne và cộng sự (1963). Kỹ thuật này sẽ tạo sự tách về không gian và sự duy trì sinh lý, trong các lớp thạch, của các tế bào cá thể từ mô lympho. Dưới các điều kiện này, sự tạo ra kháng thể tan huyết tố (hemolysin) bởi các tế bào đơn từ động vật được tiêm kháng nguyên hồng cầu có thể phát hiện được.

Việc đưa hồng cầu và chất bổ thể vào trong thạch làm phát triển các vùng trong suốt, hoặc các mảng, chung quanh các tế bào tạo ra kháng thể. Việc đếm các tế bào tạo mảng (PFC) này trong mô từ các động vật được điều trị và không điều trị cung cấp sự đánh giá về tác dụng ức chế miễn dịch.

1.3. Thải loại ghép

Thường dùng các ghép da ở nhiều loài động vật khác nhau để đánh giá hoạt tính ức chế miễn dịch. Phần lớn các phương pháp dùng hợp nhất các kỹ thuật phát triển bởi Billingham và Medawar (1951) và Billingham (1961).

Để ghép da trên chuột nhắt trắng, gây mê thuật, (tiêm trong màng bụng 0,1 ml dung dịch nembutal 0,65% cho 10g thể trọng) và cầm giữ ở tư thế đuôi thẳng bằng các băng chun. Vùng phẫu thuật của cả động vật cho và nhận được cạo, xoa xà phòng, và xử lý với cồn Zephiran 2%. Thực hiện tất cả các phẫu thuật với các dụng cụ vô khuẩn, nhưng kỹ thuật "không đụng chạm" cũng tốt, có nghĩa là không cần dùng áo choàng và găng tay vô khuẩn. Nâng da của động vật cho da lên thành hình nón cao với kẹp và cắt ra bằng dao mổ số 12. Cho tới khi dùng, đặt miếng ghép sống phía dưới trên giấy lọc tẩm ẩm với nước muối đẳng trương trong một đĩa Petri. Trước khi dùng, cạo bỏ mô mỡ dưới da bằng dao mổ.

Chuẩn bị vùng nhận bằng cách cắt cẩn thận với kéo cong, sắc (để không gây tổn hại mô mỡ dưới da) tới độ sâu và kích thước cần thiết. Nói chung, vùng bên hoặc vùng lưng của ngực được dùng làm vị trí ghép. Áp miếng ghép vào mô nền đã chuẩn bị. Đặt gạc đã bôi vaselin vô khuẩn (hơi lớn hơn miếng ghép) vào vùng đó, rồi quấn băng thạch cao (18 cm dài x 1,3 cm rộng) chung quanh ngực trên miếng ghép. Sau đó, bôi lên vỏ thạch cao dung dịch acid picric 1% để ngăn cản sự gặm nhấm. Sau 6 - 10 ngày, tháo băng, và bắt đầu đánh giá miếng ghép.

Trong các phương pháp nghiên cứu tác dụng ức chế miễn dịch, điều quan trọng là sự lựa chọn các giống động vật cho và nhận phù hợp. Một mặt, các khác nhau về gen trong sự tương hợp mô giữa hai giống không quá lớn đến mức sinh ra sự thải loại ghép nhanh và mạnh mẽ. Mặt khác, sự sống sót kéo dài của các miếng ghép đòi hỏi sự chăm sóc chu đáo động vật và các phương tiện nuôi nhốt không gây căng thẳng.

Để xác định tác dụng của thuốc trên thời gian sống sót của các miếng ghép khác loại, dùng các nhóm 10 – 12 chuột nhất trắng cho mỗi mức liều của thuốc và một nhóm đối chứng tương tự. Áp dụng các chương trình điều trị khác nhau, (nghĩa là thời gian bắt đầu điều trị liên quan với thời gian ghép, khoảng cách giữa các lần điều trị, và thời gian kéo dài điều trị), để đạt các điều kiện tối ưu.

Kiểm tra hàng ngày các miếng ghép về biểu hiện của sự thải loại: sưng phù; sẫm màu từ hồng nhạt qua đỏ thẫm sang vàng hoặc nâu; biểu bì suy yếu có thể bị cạo đi; sự thoát ra của chu vi, và cuối cùng, sự dời chỗ bởi biểu mô nơi sinh.

Sự hư hại hoàn toàn của miếng ghép nói chung được lấy làm điểm kết thúc. Tính thời gian sống sót trung bình của miếng ghép và độ lệch trung bình đối với mỗi nhóm thử thuốc và đối chứng. Có thể biểu thị các kết quả của mỗi nhóm điều trị với thuốc thử nghiệm bằng tỷ lệ phần trăm của đối chứng.

Huyết thanh chống lympho bào với liều 10 ml/kg/ngày cho tổng số 7 mũi tiêm và procarbazin với các liều 50 – 300 mg/kg trong thời gian 28 ngày đều có tác dụng ức chế mạnh sự thải loại ghép da ở chuột nhất trắng (Stewart và Cohen, 1969).

1.4. Sự thải loại ghép khối u khác loài

Hiện tượng thải loại ghép khối u khác loài, trong đó động vật chủ thải loại mảnh cấy của khối u lạ về mặt di truyền, có thể được lấy làm một trường hợp đặc biệt của hiện tượng thải loại mảnh cấy hoặc ghép. Các steroid và sự chiếu tia phóng xạ có tác dụng làm chậm sự thải loại miễn dịch này của một số khối u ở một số vật chủ. Trong một số hệ khối u – vật chủ, trong đó mô dễ thao tác và sự tăng trưởng của khối u dễ đánh giá, có thể có lợi thế hơn các phương pháp thải loại ghép da để nghiên cứu thuốc ức chế miễn dịch.

Sarcom 180 của chuột nhất trắng Crocker bị thải loại bởi chuột cống trắng non ở 6 – 10 ngày (Bollag, 1963). Các chuột cống trắng như vậy được cấy dưới da các mảnh nhỏ của khối u và được điều trị với thuốc thử nghiệm, và các khối u được đo một cách định kỳ, và như vậy có thể đánh giá tác dụng ức chế miễn dịch. Procarbazin với liều 50 mg/kg x 8, bắt đầu tiêm trong màng bụng 10 ngày trước khi cấy sẽ làm cho sự tăng trưởng khối u nhanh và rõ rệt. Điều trị sau không có tác dụng.

1.5. Sự tăng cảm chậm

Phản ứng tăng cảm chậm là một phản ứng viêm đặc trưng về miễn dịch, phải mất vài giờ để đạt mức tối đa, xảy ra mà không có sự hiện diện của kháng thể thuộc loại thường quy có thể phát hiện được. Nói cho đúng, các phản ứng này cung cấp các mô hình của đáp ứng miễn dịch tế bào và, do đó, của các bệnh tự miễn dịch có

tính chất này và của sự thải loại ghép cơ quan. Vì lý do đó các phản ứng này được dùng trong các phương pháp nghiên cứu các thuốc ức chế miễn dịch.

Hai phản ứng chậm như vậy là đáp ứng của động vật đối với sự tiêm protein của trực khuẩn lao, phản ứng tuberculin, và đáp ứng với một số hóa chất có trọng lượng phân tử thấp, có khả năng phản ứng với các nhóm amino hoặc sulfhydryl tự do của protein, dẫn đến sự nhạy cảm tiếp xúc.

a. *Phản ứng tuberculin*, gây ở chuột lang bằng cách tiêm chất bổ trợ đầy đủ Freund, cung cấp một phương pháp thử nghiệm về các thuốc ức chế miễn dịch (Schwartz và Leskowitz, 1969). Các nhóm 4 – 6 chuột lang phối giống ngẫu nhiên, được, trắng cân nặng 300g được tạo miễn dịch với 0,1 ml chất bổ trợ đầy đủ Freund phân phối giữa 4 gan bàn chân. Sau đó 3 – 4 tuần, chuột lang được cạo, làm rụng lông và tiêm nội bì 0,1 ml của dung dịch pha loãng 1 : 200 trong nước muối đẳng trương của tuberculin cũ. Sau 24 giờ, đo các vị trí về mức độ cứng và kích thước của phản ứng ban đỏ, mức độ cứng trên thang 1+ đến 3+ và đường kính ban đỏ bằng milimet. Thường tiến hành điều trị với thuốc thử nghiệm vào thời gian tiêm tuberculin cũ.

b. *Ở chuột lang*, có thể gây sự nhạy cảm tiếp xúc với oxazolon bằng việc bôi một lần dung dịch 10% vào bề mặt phía sau của tai, và với picryl clorid bằng việc tiêm nội bì 0,1 ml của dung dịch chứa 25 µg/ml trong dung dịch ethanol 1% + muối 0,85% vào 6 vị trí ở vùng gáy và vào mỗi gan bàn chân (Turk, 1964). Tiến hành thử nghiệm da 8 – 15 ngày sau, dùng 5 – 10 động vật cho mỗi nhóm thử thuốc và đối chứng. Các cạnh sườn được xén lông và bôi ở 2 vị trí trên một cạnh sườn với 0,02 ml của dung dịch oxazolon 0,25% và 0,125%, hoặc của dung dịch picryl clorid 1% và 0,5%. Các vị trí được làm rụng lông và đọc 24 giờ sau, phản ứng được cho điểm 1+ đến 3+, dựa trên mức độ phù và ban đỏ. Điều trị với thuốc thử nghiệm bằng nhiều chương trình và đường cho thuốc khác nhau.

Methotrexat có tác dụng với liều 5 mg x 5 khi tiêm trong màng bụng cứ 48 giờ một lần, bắt đầu ở thời điểm 4 ngày sau khi gây miễn cảm. Cyclophosphamid hơi kém hiệu quả hơn.

1.6. Viêm não tủy dị ứng thực nghiệm

Viêm não tủy dị ứng thực nghiệm được quan tâm trong các phương pháp nghiên cứu thuốc ức chế miễn dịch vì nó được coi là cung cấp một mô hình động vật gần giống với một số bệnh tự miễn dịch ở người (Mackay và Burnet, 1963). Có thể gây mô hình này trên nhiều loại khác nhau (chuột nhắt trắng, chuột cống trắng, chuột lang, thỏ, và khỉ), bằng cách tiêm não hoặc tủy sống đồng gen hoặc khác loại,

đã được nhũ tương hóa trong chất bổ trợ Freund. Không lâu sau khi tiêm, động vật biểu lộ các tác dụng thần kinh, tiếp theo đó là liệt và chết.

Có thể gây viêm não tủy dị ứng thực nghiệm ở chuột cống trắng Lewis đực 100g bằng cách tiêm trong màng bụng 1 ml kháng nguyên, gồm 200 mg tủy sống chuột cống trắng trong dung dịch của vaccin ho gà 1:2 trong nước muối đẳng trương. Có thể tiến hành điều trị với thuốc thử nghiệm nhiều ngày trước khi tiêm kháng nguyên, đồng thời, hoặc không lâu sau, và tiếp tục hàng ngày trong thời kỳ tới lúc giết các động vật sống sót ở 15 – 24 ngày. Đánh giá các kết quả từ các rối loạn thần kinh (mất cảm giác và vận động ở đuôi, rối loạn cơ thắt, rối loạn phản xạ lại đứng lên được, liệt phía sau), có thể cho điểm trên thang 1+ đến 4+; thời gian bắt đầu các triệu chứng; thời gian sống sót; và các tổn thương mô học của não và tủy sống ở lúc chết và ở động vật sống sót bị giết.

Cyclophosphamid có tác dụng ở chuột cống trắng với liều 5 mg/kg, bắt đầu tiêm hàng ngày trong màng bụng 1 – 5 ngày sau khi xảy ra liệt. Trong phương pháp tương tự trên chuột lang, methotrexat chặn hoàn toàn các triệu chứng khi cho liều hàng ngày 5 mg/kg x 24, bắt đầu vào ngày tiếp sau sự cảm thụ hóa (Calne và Leibowitz, 1963).

1.7. Đáp ứng thực bào

Đánh giá hoạt tính thực bào của hệ lưới nội mô theo phương pháp của Hudson và Jay (1980), mô tả bởi Atal và cộng sự (1986). Các nhóm gồm 10 chuột nhắt trắng mỗi nhóm được tiêm tĩnh mạch 160 mg/kg hạt carbon (kích thước 20 – 25 μ l), dưới dạng dịch treo 1% trong gelatin 30 phút sau khi cho thuốc thử nghiệm cho động vật. Lấy các mẫu máu từ đầu của đuôi chuột ở các khoảng cách thời gian khác nhau sau khi tiêm để đo tỷ lệ phần trăm sự trong suốt bằng máy quang trắc phổ ở bước sóng 675 nm cho tới khi sự trong suốt tương đương với chuẩn (mẫu máu đầu tiên trước khi tiêm) đạt được. Tốc độ thanh thải carbon (chỉ số thực bào k) được tính từ độ dốc của mỗi đường cong thời gian - nồng độ được vẽ bằng cách thể hiện "trị số truyền trung bình - 100" là tung độ trên giấy bán - logarit đối lại với thời gian là hoành độ.

1.8. Thử nghiệm tác dụng bù chính sự ức chế miễn dịch gây bởi cyclophosphamid (mô tả bởi P. T. Phi Phi, 1988)

Thử nghiệm trên 3 nhóm chuột nhắt trắng đực cân nặng 20 – 22g, một nhóm thử thuốc, một nhóm đối chứng bình thường, một nhóm đối chứng ức chế miễn dịch. Gây ức chế miễn dịch cho chuột ở nhóm thử thuốc và nhóm đối chứng ức chế miễn

dịch bằng cách tiêm trong màng bụng một liều cyclophosphamid 200 mg/kg hòa tan trong 0,2 ml nước muối đẳng trương. Chuột được điều trị với thuốc thử nghiệm trong 5 ngày, bắt đầu từ ngày tiêm cyclophosphamid. Theo dõi các chỉ số sau đây:

Chỉ số lách

Tính chỉ số lách bằng cách chia trọng lượng cơ quan biểu thị bằng mg cho trọng lượng cơ thể biểu thị bằng gam. Sự tăng trọng lượng lách có thể được coi là một dấu hiệu của sự tăng sinh tế bào bạch huyết.

Các tế bào tạo mắng

Giết chuột sau 5 ngày điều trị với thuốc thử nghiệm, lấy lách và đếm số lượng các tế bào tạo mắng chống hồng cầu cừu. Phẫu tích lách để chuẩn bị một dịch treo tế bào đơn trong dung dịch muối đệm phosphat. Rồi ủ một hỗn dịch gồm 20 μ l của một dịch treo tế bào có độ pha loãng phù hợp, 20 μ l huyết thanh chuột lang bình thường, 20 μ l của một dịch treo hồng cầu cừu trong dung dịch muối đệm phosphat ($3,5 \times 10^8$ tế bào/ml) và 20 μ l của dung dịch đệm phosphat ở 37°C trong 10 giờ trong một buồng Cunningham cải tiến để phát triển các tế bào tạo mắng. Đếm số lượng các tế bào tạo mắng cho 1.000 tế bào lympho ở lách.

Tế bào lympho gắn kháng nguyên (sự tạo hoa hồng)

Các tế bào lympho gắn kháng nguyên có thể được làm cho thấy được bằng kỹ thuật tạo hoa hồng. Mục đích của phương pháp là chứng minh sự tăng số lượng tế bào lympho gắn kháng nguyên sau sự tạo miễn dịch.

Tạo miễn dịch cho một chuột nhắt trắng, 4 ngày trước khi thí nghiệm, với 10^8 hồng cầu cừu tiêm trong màng bụng. Giết chuột, chuẩn bị dịch treo tế bào lách và điều chỉnh tới 3×10^7 tế bào/ml. Cho thêm 0,1 ml dịch treo hồng cầu cừu ($3,5 \times 10^8$ tế bào/ml) vào 0,1 ml dịch treo tế bào lách. Ly tâm ở 150 x g ở 4°C trong 5 phút, ủ ở 4°C trong 18 giờ. Đếm số lượng hoa hồng dùng một máy đếm huyết cầu và một kính hiển vi với ánh sáng dẫn truyền.

Tỷ lệ phần trăm tế bào lympho hạt lớn trong kính phết máu ngoại biên

Máu được phết trên bản kính. Để khô kính phết ngoài không khí, cố định trong methanol 100% và nhuộm với Giemsa 10%. Tỷ lệ phần trăm của tế bào lympho hạt lớn được xác định bằng phân tích không dưới 200 tế bào cho mỗi kính phết. Tế bào lympho hạt lớn là mọi tế bào lympho có các hạt bào tương ưa xanh anilin, không để ý đến kích thước hoặc số lượng của các hạt này.

II. NGHIÊN CỨU THUỐC KHÁNG HISTAMIN

Phần lớn các phương pháp nghiên cứu dựa trên sự chứng minh trực tiếp tác dụng đối kháng với histamin, *in vivo* hoặc *in vitro*. Trong khi các thuốc kháng histamin được sử dụng nhiều nhất để điều trị các biểu hiện dị ứng của histamin, người ta đã chứng minh nhiều thuốc kháng histamin còn có các tác dụng khác đáng chú ý. Ví dụ, diphenhydramin có tác dụng trong hen phế quản, bệnh huyết thanh, chứng say tàu xe, và hội chứng Parkinson; tripeleennamin, trong viêm mũi và chứng ngứa và là thuốc tê; phenindamin, trong sổ mũi; promethazin, trong ho; methapyrilen trong buồn nôn khi mang thai. Như vậy phương pháp nghiên cứu thuốc kháng histamin là một phương pháp khá rộng có thể phát hiện nhiều tác dụng dược lý khác nhau.

CÁC PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thử nghiệm khí dung histamin

Khi phơi nhiễm một chuột lang với một khí dung chứa histamin, sự co phế quản xảy ra, nếu sự co đủ mạnh có thể gây ngạt. Trong phương pháp của Armitage và cộng sự (1961), đặt chuột lang trong một hộp gây mê, và đưa khí dung vào bằng một máy nén. Động vật bị phơi nhiễm với một khí dung co phế quản có hành vi đặc biệt và biểu lộ các dấu hiệu khó thở tăng dần, co giật, và chết. Bằng quan sát, có thể có kinh nghiệm và xét đoán chính xác thời gian tiền co giật. Ngay khi sự thở tiền co giật bắt đầu, để động vật ra ngoài chỗ thoáng khí. Tính tỷ lệ phần trăm bảo vệ do thuốc đem lại bằng công thức $[1 - (T_1/T_2)] \times 100$, trong đó T_1 là trị số trung bình của các thời gian tiền co giật 2 ngày trước, và 2 ngày sau sự cho thuốc, và T_2 là thời gian tiền co giật xác định với sự cho thuốc.

Thuốc thử nghiệm hoặc thuốc để so sánh, cholin theophyllinat (50 – 100 mg/kg) được tiêm trong màng bụng 20 phút trước khi bơm khí dung. Khí dung chứa 2% histamin.

Cũng có thể dùng phương pháp này để phát hiện và so sánh các thuốc liệt thần kinh đối giao cảm. Chuột lang được phơi nhiễm với một khí dung chứa 4% acetylcholin.

Van Proosdij – Hartzema và cộng sự (1958) dùng chuột lang cân nặng 200 – 300g. Mỗi động vật được đặt trong bình đựng bằng chất dẻo có thể tích 15 lít. Bơm khí dung dung dịch histamin 0,25% ở áp suất 180 mmHg. Thời gian phơi nhiễm là 5 phút. Thuốc kháng histamin được cho uống 1 giờ trước sự phơi nhiễm.

Các động vật không được bảo vệ ngã nghiêng, ngạt thở. Xác định liều tác dụng 50% (ED_{50}) của thuốc kháng histamin bằng cách dùng các nhóm động vật được cho các liều khác nhau.

Trong thử nghiệm cơ phế quản của Stone và cộng sự (1961), chuột lang được tiêm trước trong màng bụng các liều khác nhau của thuốc thử nghiệm 30 phút trước sự phơi nhiễm, trong một buồng trong 3 phút, với khí dung chứa 0,1% histamin bazơ. Đánh giá sự bảo vệ bằng sự có hoặc không có sự mất phản xạ lại đứng lên. Dùng 10 hoặc 12 động vật cho mỗi liều, và tính ED_{50} . Động vật đối chứng, được tiêm nước muối đẳng trương, biểu lộ phản xạ lại đứng lên gần 100%.

Lish và cộng sự (1960) phơi nhiễm chuột lang với khí dung histamin diphosphat 0,5% cho tới khi chuột ngã quỵ. Những chuột ngã quỵ trong vòng 2 phút hồi tỉnh lại với không khí thoáng mát. Các chuột khác không được dùng cho thử nghiệm này. Hai đến 12 giờ sau, động vật được cho uống một liều thuốc kháng histamin, và sau 1 giờ để hấp thu, chuột lang lại được phơi nhiễm với khí dung histamin. Chuột không ngã quỵ trong vòng 6 phút được coi là được bảo vệ. Tính ED_{50} bằng một đường cong probit (đơn vị xác suất) - log liều.

Mặc dù chuột lang được ưa dùng để nghiên cứu thuốc kháng histamin vì tính nhạy cảm của nó với histamin, thỏ có thể được dùng khi muốn nghiên cứu trên một loài thú hai. Trong phương pháp "vi sốc" của Herxheimer (1952), một bể kính 61 x 30,5 x 30,5 cm được đặt với cạnh mở xuống dưới trên bề mặt cao su mềm, có một lỗ nối với một máy khí dung. Thỏ đặt trong buồng và chịu tác động của khí dung, biểu lộ các triệu chứng sốc kế tiếp tuần tự nếu liều nhỏ, như 0,2% histamin bazơ. Dấu hiệu đầu tiên là sự kéo các thành bụng vào để giúp đỡ hô hấp. Các cử động trở nên mạnh mẽ hơn; hô hấp trở nên chậm hơn và sâu hơn, hoặc nhanh và nông hơn. Trong trường hợp sau, toàn thân động vật tham gia vào cử động, được quan sát tốt nhất bằng cách quan sát đầu chuyển động đi đi lại lại nhanh. Ở giai đoạn này, cần bỏ thỏ ra khỏi buồng. Nếu không, các biểu hiện kế tiếp nhanh là: há miệng thở hổn hển, co giật, tiểu tiện, xanh tím, và có thể chết.

Trong những ngày kế tiếp, các phản ứng thường kéo dài do sự giải cảm ứng. Nếu một khoảng cách 8 ngày hay hơn xen giữa các thử nghiệm, thời gian tiền co giật không kéo dài. Ghi thời gian động vật được đưa ra ngoài buồng. Công thức của Armitage và cộng sự (1961) nêu ở trên được dùng để đo hiệu lực.

2.2. Sự đối kháng trực tiếp với histamin

Trong phương pháp của McKeon (1963), histamin và thuốc đối kháng được cho cùng nhau. Dùng các nhóm 10 chuột lang trắng, không nhện đối, cả đực và cái, cân

nặng 200 – 300g. Pha dung dịch thuốc kháng histamin trong 0,85% natri clorid, và cho thêm vào đó lượng histamin diphosphat cần thiết để liều cho động vật chứa $3 \times LD_{50}$ histamin bazơ, khoảng 0,660 mg/kg. Nhóm đối chứng, chỉ được cho histamin, chết trong vòng 5 phút. Ghi tỷ lệ chết ở các nhóm khác trong 6 phút sau khi cho thuốc.

Để tính toán LD_{50} , dùng phương pháp đồ thị của Miller và Tainter (1944). Dùng 3 – 4 mức liều, tăng lên với các khoảng cách 0,3 logarit.

Để tiêm, đặt động vật trong một dụng cụ giữ đặc biệt gồm một cái kẹp có 3 nhánh buộc vào giá đỡ. Đầu động vật được giữ bất động, và tai được đặt trên một cái que được chiếu sáng. Đưa vào tĩnh mạch rìa tai một kim tiêm cỡ 27, dài 1,27 cm. Tiêm với tốc độ 0,05 – 0,10 ml/giây. Tiêm tới 7 ml. Sau khi tiêm dung dịch histamin - thuốc kháng histamin, động vật được nhanh chóng giải phóng khỏi dụng cụ giữ.

ED_{50} của một số thuốc như sau (mg/kg): thenyldiamin 0,0045; tripelennamin 0,0091; chlorpheniramin 0,0138; phenindamin 0,0605; diphenhydramin 0,2390; và chlorpromazin 0,3400 (McKeon, 1963).

2.3. Vi sốc quá mẫn

Trong đáp ứng quá mẫn, histamin được giải phóng từ một số vị trí mà nó gắn kết. Các thuốc kháng histamin có tác dụng trong một số biểu hiện quá mẫn như bệnh huyết thanh. Herxheimer và Stresemann (1960) đã mô tả một phương pháp về vi sốc gây bởi một protein lạ. (Vi sốc có vẻ là một thể sốc bị gián đoạn trước khi chết, và có thể lặp lại).

Chuột lang được tiêm lòng trắng trứng. Sau 3 tuần, động vật trở nên khó thở khi bị phơi nhiễm với một khí dung dung dịch 5% lòng trắng trứng. Nếu chuột không được đưa ra khỏi buồng phơi nhiễm vào lúc này, chúng sẽ chết. Thời gian từ khi bắt đầu sự phơi nhiễm tới lúc khó thở nặng, thời gian tiền co giật, được dùng làm trị số đo mức độ nặng của sốc. Nếu không có dấu hiệu của sốc sau 6 phút, động vật được coi là được bảo vệ, và thời gian tiền co giật được coi là vô hạn. Tính toán mức độ bảo vệ, p, từ công thức thông thường: $p = [1 - (C/T)] \times 100$, trong đó các thời gian tiền co giật của động vật đối chứng và thử thuốc là C và T, tương ứng. Sau sự phơi nhiễm đối chứng, chuột lang được điều trị với thuốc thử nghiệm 4 đến 7 ngày sau và lại được phơi nhiễm. Sau 4 đến 7 ngày nữa, chuột lại bị phơi nhiễm đối chứng. Loại bỏ các chuột có thời gian tiền co giật đối chứng C dưới 40 giây và trên 165 giây.

2.4. Thử nghiệm tác dụng trên huyết áp

Preziosi (1958) dùng thỏ để nghiên cứu thuốc kháng histamin. Đặt canun vào một động mạch cảnh để đo huyết áp. Tiêm histamin vào tĩnh mạch, ví dụ, vào một tĩnh mạch dưới hàm, với các liều 0,03, 0,05 và 0,1 mg/kg, và ghi các đáp ứng trên máy ghi. Rồi cho thỏ một liều thuốc kháng histamin. Sau nhiều phút, loạt các liều histamin được lặp lại. Sự giảm các đáp ứng cho thấy hoạt tính kháng histamin, và mức độ ức chế đáp ứng với một liều đặc biệt cho phép xác định định tính hiệu lực của thuốc.

2.5. Thử nghiệm đo lượng histamin trong phổi chuột lang được cảm thụ hóa (mô tả bởi Addy và cộng sự, 1986)

Chuột lang cảm thụ hóa được chia thành các nhóm, mỗi nhóm 6 con. Nhóm chuột đối chứng được cho nước muối đẳng trương trong thời gian thí nghiệm. Nhóm thử thuốc được cho thuốc thử nghiệm trong thời gian điều trị 3 tuần. Lượng histamin toàn phần trong phổi được đo bằng phương pháp đo huỳnh quang. Lượng histamin giải phóng do phản vệ từ mô phổi của chuột lang cảm thụ hóa cũng được đo bằng phương pháp huỳnh quang. Hoạt tính gây co thắt của các chất trung gian được giải phóng do phản vệ từ mô phổi được thử nghiệm trên hồi tràng chuột lang không cảm thụ hóa và được atropin hóa. Vẽ đồ thị đường cong nồng độ – đáp ứng, dùng các nồng độ khác nhau của histamin diphosphat, (tối đa 20 ng/ml trên cùng đoạn hồi tràng) và, từ đó, đánh giá lượng chất trung gian giải phóng từ phổi bằng đương lượng histamin.

2.6. Thử nghiệm co hồi tràng cô lập do phản vệ và histamin (mô tả bởi Addy và cộng sự, 1986)

Dùng các đoạn hồi tràng lấy từ các chuột lang được cảm thụ hóa. Các đoạn hồi tràng được treo trong bình chứa dịch ngâm, cho vào đó các nồng độ tăng lên của kháng nguyên hoặc histamin trên cùng đoạn hồi tràng. Ghi các co cơ với một máy biến năng gắn với máy ghi. Các nồng độ kháng nguyên là 10^{-1} µg/ml đến 1 mg/ml (nồng độ cuối cùng trong dịch ngâm). Các nồng độ của histamin ngoại sinh là 3,4 ng/ml đến 24 ng/ml (nồng độ cuối cùng trong dịch ngâm). Biểu thị các co cơ bằng tỷ lệ phần trăm của các co cơ gây bởi liều tối đa histamin diphosphat trên cùng mô. Trước lần cho thêm kháng nguyên hoặc histamin tiếp sau, rửa các đoạn hồi tràng nhiều lần với dung dịch Tyrode mới cho tới khi lấy lại trạng thái ban đầu.

CHƯƠNG 14

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ
THUỐC CHỐNG LOÉT DẠ DÀY VÀ
THUỐC KHÁNG ACID***GS. Đoàn Thị Nhu*

Loét dạ dày, tá tràng được hình thành do cân bằng giữa các yếu tố gây loét (sự tiết dịch vị và pepsin) và các yếu tố bảo vệ (sự sửa chữa niêm mạc bị tổn thương, sự cải thiện tuần hoàn máu ở biểu mô) và sự tiết prostaglandin bị phá hủy. Các thuốc dùng điều trị loét dạ dày, tá tràng có tác dụng tăng cường các yếu tố bảo vệ và làm giảm các yếu tố gây loét (Tanaka và cộng sự, 1997).

Về các thuốc kháng acid, có hai loại chính: các thuốc trung hòa acid dịch vị đang có, và các thuốc ức chế cơ chế sinh acid ở thành dạ dày. Phần lớn các thuốc kháng acid được dùng để làm giảm độ acid dịch vị và làm lành các loét dạ dày và tá tràng.

CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**I. CÁC THỬ NGHIỆM TRÊN TỔN THƯƠNG DẠ DÀY CẤP TÍNH****1.1. Loét Shay (mô tả bởi Souza Brito, 1998)**

Một tổng số 21 chuột cống trắng Wistar được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm và để nhịn ăn trong 24 giờ, và được uống nước tùy ý. Nhóm 1 được cho uống thuốc thử nghiệm, nhóm 2 được cho uống cimetidin (100 mg/kg) là đối chứng dương tính, nhóm 3 được cho uống dung môi, là dung dịch 12% Tween 80 (10 ml/kg). Thực hiện thắt môn vị dưới sự gây mê bằng ether. Đóng vết thương lại và để chuột phục hồi. Bốn giờ sau, giết chuột, mở bụng và thắt một dây khác quanh thực quản sát với cơ hoành. Cô lập dạ dày và quan sát bên ngoài, và dẫn lưu chất chứa bên trong vào

trong một ống ly tâm có chia độ, và ly tâm ở 2000 vòng/phút trong 10 phút. Ghi thể tích dịch nổi trên mặt và pH. Cũng xác định lượng acid toàn phần của dịch vị bằng chuẩn độ tới pH 7,0 với dung dịch 0,05 N NaOH. Đánh giá các tổn thương dạ dày bằng cách soi bề mặt bên trong dạ dày với một kính hiển vi phẫu tích hai thị kính. Đếm các tổn thương niêm mạc và xác định chỉ số loét trên cơ sở đánh giá mức độ của mỗi tổn thương loét (TTL) theo Thuillier và cộng sự (1968) theo thang điểm sau:

- 0 : Không có tổn thương
- 0,5 : Chảy máu nhỏ
- 1,0 : Chảy máu
- 1,5 : Loét niêm mạc có sự lan toả hạn chế không quá 1/3 toàn bộ bề mặt bên trong của dạ dày
- 2,0 : Loét niêm mạc có sự lan toả hạn chế không quá 2/3 toàn bộ bề mặt
- 2,5 : Loét niêm mạc có sự lan toả trên toàn bộ bề mặt
- 3,0 : Loét sâu có sự lan toả hạn chế
- 3,5 : Loét sâu có sự lan toả toàn bộ bề mặt
- 4,0 : Loét thủng.

Mức độ trung bình của loét dạ dày (LDD) đối với mỗi nhóm chuột được xác định bằng cộng gộp các TTL cho mỗi nhóm chuột cố gắng trắng rồi chia cho số lượng chuột. Trên cơ sở tỷ lệ phần trăm chuột có loét (% RU) chỉ số loét (UI) được tính bằng công thức sau:

$$\text{Chỉ số loét:} \quad (UI) = \frac{(LDD) \times (\% RU)}{100}$$

1.2. Loét do indomethacin

Một tổng số 21 chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm và để nhịn ăn trong 24 giờ, và được uống nước tùy ý trước khi thí nghiệm. Ba mươi phút sau khi cho uống thuốc thử nghiệm, cimetidin (100 mg/kg), hoặc dung dịch 12% Tween 80 (10 ml/kg), tiêm dưới da indomethacin cho chuột không gây mê ở mỗi nhóm, theo phương pháp của Hayden và cộng sự (được mô tả bởi Souza Brito và cộng sự, 1998). Giết chuột 4 giờ sau, cô lập và mở dạ dày và xác định các tổn thương dạ dày như mô tả ở trên.

1.3. Loét do ethanol

Một tổng số 21 chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm và để

nhịn ăn trong 24 giờ, và được uống nước tùy ý trước khi thí nghiệm. Thực hiện thử nghiệm loét do ethanol theo phương pháp của Morimoto và cộng sự (được mô tả bởi Souza Brito và cộng sự, 1998). Cho chuột uống 1 ml ethanol 99,5% một giờ sau khi đã cho uống thuốc thử nghiệm, omeprazol (20 mg/kg), hoặc dung dịch 12% Tween 80 (10 ml/kg). Một giờ sau khi cho uống ethanol, giết chuột, cô lập và mở dạ dày và xác định chỉ số loét.

1.4. Loét gây bởi stress do gò bó và hạ nhiệt

Một tổng số 21 chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm, để nhịn ăn trong 48 giờ, và được cho uống nước tùy ý trước khi thí nghiệm. Gây loét dạ dày do stress theo phương pháp được mô tả bởi Souza Brito, 1998, bằng cách đặt chuột trong một chuồng gò bó ở 4°C. Cho chuột ở các lô thí nghiệm uống 2 lần (18 giờ và 1,5 giờ) trước khi gây stress do gò bó-hạ nhiệt các chất sau đây: thuốc thử nghiệm, cimetidin (100 mg/kg), và dung dịch 12% Tween 80 (100 ml/kg), tương ứng. Sau 3 giờ, giết chuột, cô lập, mở dạ dày và xác định chỉ số loét.

Trong phương pháp mô tả bởi Tanaka và cộng sự (1997), gây loét do stress trên chuột cống trắng Wistar đực 8 tuần tuổi. Chuột được đặt trong các chuồng gò bó để gây stress và ngâm trong nước ở 23°C trong 7 giờ hoặc 16 giờ. Các thuốc thử nghiệm được cho uống ngay trước khi gây stress.

1.5. Loét gây bởi acid acetylsalicylic (ASA) (Phương pháp mô tả bởi Akhtar, 1996)

Chuột cống trắng Sprague-Dawley cả đực và cái được chia thành ba nhóm, mỗi nhóm 6 con. Nhóm đối chứng (gây loét) được cho uống dịch treo trong nước của ASA (200 mg/kg) trong 1% carboxymethylcellulose (CMC). Thuốc thử nghiệm được cho chuột uống 3 giờ trước và 3 giờ sau khi cho uống ASA. Một nhóm chuột được cho uống dung dịch 1% CMC (10 ml/kg), thay vì ASA, để thử tác dụng của thuốc trên chuột bình thường. Chuột được phẫu thuật vào ngày thứ tư. Để chuột nhịn ăn trong 18 giờ trước khi phẫu thuật theo phương pháp Shay (1945). Thất môn vị và hứng dịch vị trong thời gian 4 giờ. Sau đó giết chuột bằng liều lớn cloform, và cắt lấy dạ dày. Thu thập dịch vị và ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút. Tách phần dịch nổi bên trên, cho vào một ống nghiệm có chia độ và đo thể tích (ml/100g thể trọng).

Các dạ dày được làm căng đầy với 10 ml dung dịch 1% formalin trong 10 phút để cố định các thành bên trong của dạ dày. Ghi số lượng trung bình các vết loét đối với mỗi dạ dày. Tính tỷ lệ phần trăm ức chế hình thành loét.

Xác định hiệu suất acid. Xác định hiệu suất acid bằng chuẩn độ với 0,01N NaOH dùng phenolphthalein làm chất chỉ thị, như mô tả bởi Oser (1965). Hiệu suất acid được biểu thị bằng $\mu\text{Eq/ml}$ dịch vị (μ đương lượng/ml). Hiệu suất acid toàn bộ được biểu thị bằng micro đương lượng/4 giờ.

II. THỬ NGHIỆM TRUYỀN DỊCH DẠ DÀY CHUỘT CỐNG TRẮNG

Chuột cống trắng được gây mê bằng dung dịch nước 25% urethan, 0,5 đến 0,7 ml cho 100g thể trọng (Ghosh và Schild, 1958). Nếu liều thứ nhất không gây mê trong 30 đến 40 phút, tiêm bắp bổ sung một liều thích hợp. Nhiệt độ cơ thể được giữ ổn định ở 30°C bằng thiết bị sưởi ở dưới bàn mổ và chuột được sưởi ở trên bằng đèn, nhiệt độ được kiểm soát bằng một nhiệt kế tiếp xúc đặt vào trực tràng.

Đặt canun vào khí quản. Luồn một ống polyethylen, dài 11 cm và có đường kính ngoài 2 mm vào thực quản dưới ở cổ và buộc ở đó. Bộc lộ các tĩnh mạch cảnh và đặt canun; nối một tĩnh mạch cảnh với một huyết áp kế. Mở bụng và bộc lộ đường nối môn vị – tá tràng. Luồn một canun thủy tinh nhỏ, qua một lỗ bấm ở tá tràng, vào dạ dày và buộc chặt bằng một dây buộc quanh môn vị, cẩn thận trọng để không thắt các mạch máu với dây buộc. Đưa toàn bộ dạ dày về phía trước, và rạch một đường dọc dài khoảng 3 cm với một dao đốt điện dọc theo đường giữa của bề mặt trước, bắt đầu từ chỗ gần nhất với đáy dạ dày có thể được. Loại bỏ các mẫu thức ăn bằng các miếng gạc bông ẩm. Rửa bên trong dạ dày với bông thấm ứot nước muối sinh lý và kiểm tra để lỗ canun không có các mảnh vụn thức ăn trước khi đóng dạ dày bằng một đường khâu liên tục qua toàn bộ bề dày của thành. Tiếp đó đóng bụng bằng 3 mũi khâu gián đoạn.

Rồi truyền dạ dày liên tục với một dung dịch loãng của dung dịch 0,00025 N natri hydroxyd vào qua canun polyethylen và chảy qua canun thủy tinh. Dịch dâng lên từ môn vị đi qua trên một điện cực thủy tinh ghi pH một cách liên tục. Đã nhận xét thấy có mối liên quan tuyến tính giữa pH và độ acid. Tốc độ truyền là khoảng 1 ml trong một phút. Sau khi đi qua dạ dày không bị kích thích, dịch chảy ra có pH 6,0 đến 6,5. Khi đổi tốc độ truyền sang 2 ml trong một phút, pH tăng lên, nếu cần, tới phạm vi phù hợp ví dụ 6,0.

Thuốc được tiêm qua một tĩnh mạch cảnh, trong 0,1 đến 0,4 ml, tiếp theo bởi 0,1 ml dung dịch muối đẳng trương. Ví dụ, tiêm histamin dihydro phosphat (100 μg chất bazo), gây hạ pH từ 6,0 xuống 4,0 sau khoảng 14 phút, sau đó pH trở về 6,0 sau 1 giờ. Carbachol có tác dụng rất mạnh, thể hiện tác dụng với các liều hàng nanogam.

Để thử nghiệm các chất ức chế sự tiết acid dạ dày, các chất đối kháng được tiêm tĩnh mạch ngay trước hoặc sau chất chủ vận (như histamin). Vasopressin là một chất ức chế chuẩn ở 120 đến 480 mili-đơn vị. Methacholin được dùng thay cho histamin, với atropin là chất ức chế.

III. XÁC ĐỊNH DỊCH NHẢY THÀNH DẠ DÀY

Dịch nhày dạ dày được xác định theo phương pháp của Rafatullah và cộng sự, được mô tả bởi Souza Brito và cộng sự (1968). Một tổng số 21 chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm và được để nhịn ăn trong 48 giờ và được uống nước tùy ý. Mỗi nhóm chuột được cho uống thuốc thử nghiệm với liều thích hợp, carbenoloxon (200 mg/kg), và dung dịch 12% Tween 80 (10 ml/kg), tương ứng. Sau 1 giờ rưỡi, chuột được gây stress bằng gò bó – hạ nhiệt như mô tả ở trên. Sau đó, giết chuột, cô lập dạ dày và mở dọc theo bờ cong lớn. Cô lập các đoạn có tuyến từ dạ dày và cân. Ngâm mỗi đoạn trong 2 giờ trong 10 ml dung dịch 0,1% (trọng lượng/thể tích) chất xanh Alcian (Alcian blue), hòa tan trong dung dịch 0,16 M sucrose, được đệm với dung dịch 0,05 M natri acetat, pH 5. Loại bỏ lượng quá thuốc thừa chất nhuộm bằng cách rửa các đoạn dạ dày 2 lần với dung dịch 0,25 M sucrose trong thời gian 15 và 45 phút, tương ứng.

Chiết phức hợp dịch nhày – chất nhuộm bằng cách đặt các đoạn thành dạ dày trong 10 ml dung dịch 0,5 M magnesi clorid và lắc cách quãng trong một phút ở các khoảng cách 30 phút trong 2 giờ. Trộn 4 ml dịch chiết xanh với một thể tích bằng nhau diethyl ether và lắc mạnh trong 2 phút. Quay ly tâm như dịch thu được trong 10 phút ở 3600 vòng/phút và ghi sự hấp thụ của lớp dịch nước ở 580 nm. Chất xanh Alcian chiết được cho 1 gam của mô tuyến thực được tính.

IV. ĐO HOẠT ĐỘ CỦA ENZYM MYELOPEROXYDASE (mô tả bởi Cho và cộng sự, 2000)

Một số nghiên cứu đã chứng minh sự tăng có ý nghĩa hoạt độ của myeloperoxydase trong các tổn thương niêm mạc dạ dày gây bởi thất môn vị và bởi ethanol, cho thấy vai trò có ý nghĩa của sự tăng hoạt độ của enzym này trong tổn thương niêm mạc dạ dày.

Trong thử nghiệm gây loét dạ dày chuột cống trắng bằng ethanol, sau khi đã đo các diện tích loét hoặc xác định chỉ số loét, lấy niêm mạc dạ dày bằng cách nạo với một dụng cụ trượt thủy tinh và ngay lập tức làm đông bằng trong nitơ lỏng và bảo quản ở -70°C . Thử nghiệm hoạt độ của myeloperoxydase dựa trên phản ứng o-dianisidin và cuối cùng đánh giá ở 460 nm với một máy quang trắc phổ và dùng

peroxydase từ cải gia vị (horseradish) làm chuẩn. Thực hiện thử nghiệm protein bằng phương pháp của Lowry và cộng sự (1951).

V. ĐO HOẠT ĐỘ CỦA PEPSIN (mô tả bởi Akhtar và cộng sự, 1996)

Hoạt độ của pepsin được đo theo phương pháp của Rigges và Stadie (1933) với sự sửa đổi như sau: dùng 50 ml nước cất, thay vì 10 ml, cho mỗi gam lòng trắng trứng và dùng clorid thủy ngân làm chất bảo quản thay vì merthiolat. Hoạt độ của pepsin được biểu thị bằng mg/ml dịch vị và hiệu suất toàn phần được biểu thị bằng mg/4 giờ.

VI. XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ CỦA MUCIN (chất nhầy) (Akhtar và cộng sự, 1996)

Tỷ lệ của carbohydrat toàn phần (số tổng của fucose, hexose, hexosamin và acid sialic) so với protein toàn phần được lấy làm chỉ số về hoạt độ của mucin. Áp dụng phương pháp của Dische và Shettles (1948) để định lượng fucose. Dùng phương pháp có sửa đổi một ít của Lustig và Langer (1931) để xác định hexose kết hợp với protein. Phương pháp của Elson và Morgan (1933) được áp dụng để đánh giá hexosamin trên dịch vị đun nóng trong 16 giờ với acid hydrocloric (3N) trong cách thủy nước sôi. Phương pháp của Ayala và cộng sự (1951) được dùng để đánh giá acid sialic. Protein toàn phần được xác định bằng phương pháp của Winzler và cộng sự (1948).

VII. NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG *HELICOBACTER PYLORI* IN VITRO

Helicobacter pylori được phân lập từ hang dạ dày của bệnh nhân viêm dạ dày mạn tính bởi Waren và Marshall năm 1983. *Helicobacter pylori* thúc đẩy viêm dạ dày phát triển sang ung thư dạ dày. Vi khuẩn gây bệnh này sản sinh urease, enzym này thủy phân urê thành CO₂ amoniac, và được coi là có vai trò quan trọng trong bệnh sinh viêm dạ dày và loét dạ dày, tá tràng. Do đó việc tiêu diệt vi khuẩn *Helicobacter pylori* và ức chế urease là điều quan trọng đối với việc điều trị bệnh nhân viêm loét dạ dày, tá tràng.

7.1. Thử nghiệm tác dụng ức chế sự sinh trưởng của *H.pylori* (mô tả bởi Bae và cộng sự, 1999)

Thử nghiệm tác dụng ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn *H.pylori* được thực hiện như sau: 1 ml dung dịch thuốc với nồng độ xác định được cho thêm vào một đĩa

Petri chứa 7 ml thạch *Brucella* không bị đặc lại được bổ sung với 7% huyết thanh ngựa. Thuốc thử nghiệm được pha thành một loạt khoảng 10 nồng độ theo thứ tự giảm dần. Sau đó cấy truyền *H.pylori* với khoảng 5×10^5 CFU vào các đĩa thạch và nuôi cấy một cách ưa ít khí trong 3 ngày ở 37°C trong một vại ít khí (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂). Nồng độ ức chế thấp nhất được xác định sau một thời gian ủ 72 giờ, Ampicilin được dùng làm đối chứng dương tính. Tất cả các thí nghiệm được thực hiện 3 lần.

7.2. Chế tạo và thử nghiệm urease của *H.pylori*

H.pylori được nuôi cấy trong canh *Brucella* được bổ sung với 10% huyết thanh bào thai bò trong 3 ngày. Các tế bào được thu hoạch, rửa, siêu âm và ly tâm. Phần nổi bên trên được dùng làm enzym thô. Xác định hoạt độ của urease theo phương pháp của Gutmann và Bergmeyer (1974).

VIII. THỬ NGHIỆM TÁC DỤNG ỨC CHẾ SỰ NGƯNG KẾT HỒNG CẦU GÂY BỞI *HELICOBACTER PYLORI* (mô tả bởi Belogortseva, 2000)

Sự nhiễm khuẩn với *H.pylori* kết hợp chặt chẽ với sự sinh bệnh loét dạ dày, tá tràng và sự phát triển của ung thư tuyến dạ dày. Vi khuẩn gây bệnh dính chặt vào bề mặt tế bào biểu mô niêm mạc và lớp niêm mạc lót biểu mô dạ dày. Một trong các hướng dự phòng nhiễm vi khuẩn là phát triển các thuốc ức chế sự gắn của vi khuẩn dựa trên các carbohydrat chống bám dính.

- Sự tiêu hóa hồng cầu bởi trypsin

Dịch treo 10% hồng cầu trong 10 ml PBS (100 mM natri phosphat, pH 7,3, và 150 mM NaCl) được ủ với trypsin (2 mg) ở 37°C trong 3 giờ và được rửa 3 lần với PBS. Các hồng cầu trypsin hóa được treo ở nồng độ 2% (trọng lượng/thể tích) trong cùng dung dịch đệm, dịch treo này được dùng trong thử nghiệm về ngưng kết hồng cầu.

- Thử nghiệm ngưng kết hồng cầu và ức chế ngưng kết hồng cầu

Dịch treo vi khuẩn được pha loãng thành một loạt độ pha loãng với PBS (pH 6,0) trong các đĩa U vi chuẩn độ. Cho thêm 30 µl dịch treo hồng cầu trypsin hóa vào dịch treo vi khuẩn *H.pylori* (30 µl). Phủ đĩa vi chuẩn độ với parafilm và đặt đĩa này ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sự ngưng kết tiểu cầu được đánh giá bằng mắt nhìn và được dùng làm đối chứng dương tính. Một đối chứng âm tính chứa cùng các lượng PBS và hồng cầu trypsin hóa mà không có dịch treo vi khuẩn. Trong thử nghiệm về tác dụng ức chế của thuốc đối với ngưng kết hồng cầu gây bởi *H.pylori*,

pha thuốc thử nghiệm thành một loạt độ pha loãng khác nhau. Lấy 30 μ l dung dịch thuốc thử nghiệm, cho thêm vào đó 30 μ l dịch treo vi khuẩn có độ chuẩn gây ngưng kết hồng cầu 4 vào mỗi giếng, và ủ hỗn dịch đó trong 15 phút. Sau khi cho thêm dịch treo hồng cầu trypsin hóa (30 μ l), các đĩa được ủ và lắc nhẹ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Nồng độ ức chế thấp nhất được xác định bằng mắt nhìn và được xác nhận bằng soi kính hiển vi.

CHƯƠNG 15

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ
THUỐC CÓ TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN**

(Tác dụng chống tổn thương gan và tác dụng chống xơ gan)

PGS. TSKH. Đỗ Trung Đàm

I. ĐẶT VẤN ĐỀ**1.1. Tầm quan trọng của việc nghiên cứu thuốc bảo vệ gan****1.1.1. Bệnh viêm gan rất phổ biến**

Viêm gan là một bệnh rất phổ biến, ít người trong đời mình lại không bị viêm gan lần nào. Viêm gan có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau, như do thuốc (đặc biệt là thuốc chống ung thư, thuốc lao, nhiều loại thuốc kháng sinh), do thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, do nhiễm hóa chất (đặc biệt là các hóa chất có nhân benzen, các chất halogen hóa), do uống nhiều rượu hoặc do virus.

Virus gây viêm gan có thể là virus A, B, C, D, E, nhưng quan trọng nhất là virus viêm gan B. Trên thế giới có trên 2 tỷ người nhiễm virus viêm gan B, trong đó có 350 triệu người mắc viêm gan B mạn tính. Hàng năm, có 1 triệu người chết, trong đó Trung Quốc chiếm một phần ba. Ở Việt Nam, tỷ lệ người mang virus viêm gan B là 8 - 15% tùy theo vùng. Viêm gan, bất cứ do nguyên nhân nào, nếu bị kéo dài, đều có thể dẫn đến viêm gan mạn, xơ gan, ung thư gan và tử vong.

1.1.2. Chưa có thuốc đảm bảo an toàn, hiệu quả và kinh tế

Để điều trị viêm gan B mạn tính hiện nay Tây y thường dùng interferon alpha hoặc lamivudin. Nhưng tác dụng cũng chỉ có mức độ, lại có thể gây ra nhiều tác dụng phụ không mong muốn, và đặc biệt là giá quá đắt. Đối với thuốc từ cây cỏ, trước đây cũng như hiện nay, Tây y thường dùng cao từ quả cây Cúc gai *Silybum*

marianum (L.) Gaertn., hoặc chiết từ quả, chất flavonlignan, thường gọi là silymarin, một hỗn hợp gồm silybin, silydianin và silychristin. Người Ấn Độ còn dùng cao hoặc hỗn hợp glycosid iridoid từ cây *Picrorhiza kurroa*.

Hiện nay, các nhà khoa học đã thấy được tầm quan trọng của các thuốc bảo vệ gan có nguồn gốc từ cây cỏ. Vì vậy, phải có các phương pháp nghiên cứu thích hợp và thuyết phục. Tài liệu này trình bày một số phương pháp nghiên cứu được lý thông dụng nhất vẫn được áp dụng trên thế giới.

1.2. Tại sao lại phải dùng quá nhiều nghiệm pháp để nghiên cứu thuốc bảo vệ gan

Gan đảm nhiệm nhiều chức năng, mà không phải tất cả các chức năng này đều bị ảnh hưởng như nhau, khi có một bệnh gan nào đó. Cũng như vậy, một loại thuốc bảo vệ gan, không phải có thể làm phục hồi được tất cả các chức năng gan đã bị rối loạn. Do đó, cần phải có nhiều thí nghiệm khác nhau, khi đánh giá tác dụng bảo vệ gan của một thuốc. Các chức năng của gan có thể là nội tiết, như tạo ra các enzym làm nhiệm vụ tổng hợp và thoái giáng glycogen, cholesterol, prothrombin; có thể là ngoại tiết như tạo thành mật, các acid mật, muối mật; có thể là chức năng chuyển hóa như khử độc thuốc, miễn dịch.

Một chương trình nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan phải đánh giá được toàn diện các hoạt tính này, gồm ít nhất là các loại nghiệm pháp sau:

- Đối kháng với tác dụng gây tổn thương do các chất độc trên gan.
- Tác dụng lợi mật và chống ứ mật.
- Tác dụng điều hòa miễn dịch.
- Tác dụng trên virus viêm gan.

Chuột cống trắng và chuột nhắt trắng là những động vật thường dùng nhất trong thử nghiệm. Mỗi chất độc với gan có thể ảnh hưởng đến một số nhất định các chức năng khác nhau của cơ quan dưới tế bào của gan. Do đó, nhiều khi, cần phải thử thuốc trên nhiều chất độc của gan. Ngoài ra, có rất nhiều thông số hóa sinh khác nhau cần nghiên cứu để đánh giá sự tổn thương và sự phục hồi chức năng của các cơ quan dưới tế bào này như ty thể, lysosom, màng tương. Trên thế giới, người ta đã dùng tới trên 10 loại chất độc gan khác nhau, đã nghiên cứu gần 20 thông số về gan và 8 thông số trong huyết thanh.

Việc nghiên cứu có thể là nghiên cứu trên toàn con vật *in vivo*, hoặc *in vitro* trên tế bào gan phân lập và nuôi cấy. Ngoài đánh giá các thông số sinh hóa, cần đánh giá cả các thông số mô bệnh học. Cuối cùng là sự nghiên cứu trên sự tái sinh gan ở con vật bị cắt gan một phần.

Tác dụng trên lưu lượng mật và các thành phần của mật có thể được nghiên cứu ở chuột lang, chuột nhắt trắng, chuột cống trắng hoặc trên mèo gây mê, dùng ống thông luồn vào ống dẫn mật. Sự ứ mật có thể gây ra bằng các thuốc đặc hiệu như ethinyl estradiol hoặc các chất độc gan khác.

Đánh giá tác dụng điều hòa miễn dịch có thể được tiến hành ở chuột nhắt trắng dòng Balb-c hoặc chuột lang. Các thông số đánh giá là các tế bào có thẩm quyền miễn dịch và các thông số miễn dịch thể dịch.

Một nguyên nhân rất thông dụng gây rối loạn chức năng gan, đặc biệt là ở các nước đang phát triển, là viêm gan do virus. Do đó cần tiến hành một số nghiệm pháp thử hoạt tính kháng virus khi nghiên cứu thuốc bảo vệ gan.

II. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN TRÊN TỔN THƯƠNG GAN DO CÁC CHẤT ĐỘC VỚI GAN

2.1. Các chất được dùng để gây tổn thương gan

Có rất nhiều chất có thể gây tổn thương gan. Bảng 1 giới thiệu một số chất, liều dùng, đường dùng và số ngày sau khi dùng liều gây độc cuối cùng sẽ giết chuột để xác định các thông số.

Bảng 1. Các chất độc với gan được dùng để gây tổn thương gan thực nghiệm ở chuột nhắt trắng

Các chất độc với gan	Liều dùng/1 kg	Đường dùng	Giết chuột sau (ngày)
Aflatoxin B	7 mg	Uống	4
<i>Amanita phalloides</i>	50 mg	Uống	10
Carbon tetrachlorid	0,7 ml x 6 lần	i.p.	2
D-galactosamin	8,00 mg	i.p.	1
Lanthanum	4 mg	i.v.	4
Monocrotalin (alc.pyr.)	120 mg	Uống	12
Paracetamol	2,0 g	Uống	2
<i>Plasmodium berghei</i>	5.10 ⁵ HCNKST	i.p.	15
Thioacetamid	100 mg	s.c.	2

Ghi chú: alc.pyr : là alcaloid pyrrolizidin

0,7 ml x 6 lần: cách 1 ngày 1 lần

HCNKST: hồng cầu bị nhiễm ký sinh trùng thử ở mastomys.

Cần chú ý trong hầu hết các trường hợp thuốc có tác dụng bảo vệ gan gây ra tác dụng tối ưu, nếu dùng thuốc được 8 - 10 ngày, trước ngày giết con vật được 24 giờ. Từ đó, tính ra cần phải dùng thuốc nghiên cứu vào ngày nào là thích hợp.

2.1.1. Dùng CCl_4 gây tổn thương gan ở chuột nhắt trắng

Để nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của một thuốc trên tổn thương gan do CCl_4 , có thể tiến hành theo nhiều cách:

- Theo phương pháp kinh điển được ghi ở bảng 1, liều CCl_4 tiêm i.p. cho chuột nhắt trắng là mỗi lần 0,7 mg/kg, cứ cách một ngày dùng một lần, dùng 6 lần. Giết chuột để xét nghiệm vào ngày thứ hai sau lần tiêm CCl_4 cuối cùng, tức là ngày thứ 13 kể từ ngày tiêm CCl_4 đầu tiên, và tổng liều CCl_4 là 4,2 ml/kg. Cách tiến hành cụ thể như sau: Hoà CCl_4 với dầu thực vật theo tỷ lệ CCl_4 :dầu là 1:9 (v:v). Tiêm i.p. với liều của dung dịch CCl_4 là 0,14 ml/20g chuột. Giả sử muốn dùng thuốc nghiên cứu 8 ngày liên tiếp, thì phải dùng thuốc từ ngày thứ năm đến ngày thứ 12 kể từ ngày bắt đầu tiêm CCl_4 .
- Có tác giả chỉ dùng CCl_4 một lần, thì tiêm i.p. CCl_4 với liều 4 ml/kg hoặc 5 ml/kg. Lấy 4 ml hoặc 5 ml CCl_4 hòa với dầu thực vật cho đủ 10 ml, rồi tiêm i.p. 0,2 ml/20g chuột. Qua nghiên cứu của chúng tôi, thì đến ngày hôm sau, ALT đã tăng mạnh. Mức tăng mạnh nhất là vào ngày thứ ba đến ngày thứ năm sau khi tiêm CCl_4 . Từ sau ngày thứ bảy, ALT có khuynh hướng giảm dần. Tùy theo định giết chuột xét nghiệm vào ngày nào, mà ta cho chuột dùng thuốc nghiên cứu trước khi bắt đầu tiêm CCl_4 mấy ngày.
- Cũng có tác giả dùng liều 4 - 6 ml/kg i.p. hòa với dầu thực vật, nhưng chia làm 3 lần, cách 1 ngày dùng một lần.
- Favari và Alvares (1997) đã gây tổn thương gan bằng cách cho chuột nhắt trắng uống CCl_4 trong 7 ngày. Hai ngày đầu, uống dung dịch CCl_4 trong dầu thực vật với tỷ lệ 1:7, liều 10 ml/kg; 5 ngày tiếp theo, uống dung dịch CCl_4 trong dầu thực vật với tỷ lệ 1:6, cũng với liều 10 ml/kg (như vậy, tổng liều CCl_4 là 11,188 ml/kg, nhưng dùng uống). Thuốc nghiên cứu được uống hàng ngày trong 7 ngày. Lô đối chứng cho uống nước cất với cùng thể tích như thuốc. Đến ngày thứ tám thì giết chuột để xét nghiệm.

2.1.2. Dùng CCl_4 gây tổn thương gan ở thỏ

Thỏ tương đối nhạy cảm với CCl_4 . Nếu dùng liều CCl_4 lớn hơn 1 ml/kg, thỏ chết khá nhiều. Liều CCl_4 i.p. thích hợp gây tổn thương gan ở thỏ nếu dùng 1 lần là 1 ml/kg, hòa với dầu ô liu theo tỷ lệ 1:1. Một tài liệu Ấn Độ, dùng liều uống là 0,8 ml/kg cũng hòa loãng trong dầu thực vật. Qua nghiên cứu của chúng tôi, ngày

xét nghiệm tốt nhất từ ngày 3 đến ngày 5 sau CCl_4 . Tất nhiên, thử là con vật có thể lấy máu được nhiều lần, nên các xét nghiệm dùng huyết thanh hoặc huyết tương của máu có thể được xác định vào nhiều ngày khác nhau.

2.1.3. Dùng CCl_4 gây tổn thương gan ở chuột cống trắng hoặc chuột lang

Đối với chuột cống trắng, liều CCl_4 i.p. gây tổn thương gan là 2,0 – 2,5 ml/kg; một tác giả ở Nga, dùng liều tiêm s.c. là 2 ml/kg trong 3 ngày liên tiếp; còn đối với chuột lang là 1,0 - 1,5 ml/kg, cũng phải hòa loãng với dầu thực vật theo tỷ lệ 1 thể tích CCl_4 với 3 đến 5 thể tích dầu.

Ghi chú: Theo chúng tôi, liều CCl_4 như đã nêu ở trên, nên chia ra làm 2 – 3 lần, các lần cách nhau 1 ngày, để tránh phải dùng một lúc một liều quá cao CCl_4 dễ gây độc làm chết động vật thí nghiệm.

2.1.4. Dùng paracetamol gây tổn thương gan ở chuột nhắt trắng

Dùng chuột nhắt trắng trưởng thành, nặng 20 – 25 g, khỏe mạnh, không phân biệt đực cái. Cho chuột uống paracetamol với liều 2 g/kg. Theo kinh nghiệm của chúng tôi, ngày hôm sau, lại cho thêm một liều paracetamol là 1 g/kg nữa. Sau 2 ngày, lấy máu và lấy gan để làm các xét nghiệm.

2.1.5. Gây tổn thương gan bằng ethanol ở chuột nhắt trắng hoặc chuột cống trắng

Cho chuột nhắt trắng hoặc chuột cống trắng uống ethanol 96% với liều hàng ngày là 4 ml/kg (trước khi uống, phải hòa loãng ethanol với nước cất) liên trong 45 ngày, gan sẽ bị tổn thương. Lô thuốc, sau khi cho chuột uống ethanol được 30 ngày thì cho dùng thuốc (song song vẫn cho uống ethanol tiếp) hàng ngày cho đến ngày 45 (sau khi dùng thuốc) thì xét nghiệm.

2.2. Các thông số đánh giá chức năng gan trong huyết thanh

Các thông số để đánh giá chức năng gan trong huyết thanh được trình bày ở bảng 2. Trong bảng 2, có nêu các thông số, các trị số của các thông số này ở trạng thái bình thường và tài liệu nêu phương pháp xác định các thông số này.

Bảng 2. Các thông số đánh giá chức năng gan trong huyết thanh

Các thông số	Trị số bình thường	Tài liệu
AST EC 2.6.1.1	52-135 $\mu\text{mol/h/lít}$	Reitman và Frankel, 1957
ALT EC 2.6.1.2	52-112 $\mu\text{mol/h/lít}$	Reiman và Frankel, 1957

Các thông số đánh giá chức năng gan trong huyết thanh (tiếp theo)

Glutamic dehydrogenase EC 1.4.1.2	1,37-3,88 $\mu\text{mol/h/lít}$	King, 1963
Phosphatase kiềm EC 3.1.3.1	27-61 $\mu\text{mol/min/dl}$	Bessey và cộng sự, 1946
Protein tổng số	5,2-8,6 g/dl	Lowry và cộng sự, 1951
Albumin	3,20-3,38 g/dl	Stavric-Hirosho và cộng sự, 1974
Bilirubin	0,15-0,43 mg/dl	Malloy và Evelyn, 1937
Lipoprotein-X	Bình thường không có	Talfant và Tovarek, 1958

Tác dụng của các chất độc với gan ảnh hưởng đến các thông số ở bảng 2 như thế nào, được trình bày ở bảng 3. Bảng 3 cho thấy, đa số các chất gây độc gan làm tăng các thông số nghiên cứu trên huyết thanh, trừ tác dụng trên albumin, protein và cholesterol, thì có chất gây tăng, có chất gây giảm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của các chất độc gan trên các thông số huyết thanh

Thông số	Giảm	Tăng
1. ALT	Không chất nào	Tất cả trừ lanthanum
2. AST	Không chất nào	Tất cả trừ lanthanum
3. Phosphatase kiềm	Không chất nào	Tất cả trừ <i>A. phalloides</i> , Paracetamol, Alcaloid pyrrolizidin
4. Glutamat dehydrogenase	Không chất nào	Tất cả trừ <i>A. phalloides</i> , <i>P. berghei</i>
5. Bilirubin	Không chất nào	Tất cả trừ <i>A. phalloides</i>
6. Cholesterol	Galactosamin	<i>P. berghei</i>
7. Triglycerid	Không chất nào	Carbon tetraclorid
8. Lipoprotein-X	Không chất nào	Carbon tetraclorid, <i>P. berghei</i>
9. Protein	<i>P. berghei</i> , Alc. pyr.	Carbon tetraclorid
10. Albumin	<i>A. phalloides</i> Galactozamin Lanthanum	<i>P. berghei</i>

2.3. Các emzym chính trong gan phản ánh chức năng gan

Các enzym trong gan phản ánh chức năng gan được trình bày ở bảng 4. Trong bảng 4, ghi tên enzym kèm ký hiệu quốc tế của enzym là dấu ấn (marker) phản ánh cấu tạo nào của gan bị ảnh hưởng, trị số bình thường và tài liệu có ghi cách xác định các enzym đó.

Bảng 4. Các enzym trong gan phản ánh chức năng gan

Tên enzym	Dấu ấn (marker) phản ánh	Trị số bình thường (U/100 mg protein)	Tài liệu
Succinat dehydrogenase EC 1.3.99.1	Ty lập thể (Mitochondria)	0,73-1,08	Slater và Bonner, 1952
Glucose-6-phosphatase EC 3.1.3.9	Ty lập thể (Mitochondria)	8,0-9,7	Hubscher và West, 1965
Cytocrom P ₄₅₀ * EC 1.14.14.1	Vi lập thể (Microsom)	24,9-39,9	Omura và Sato, 1964
Cytocrom b ₅ * EC 1.6.2.2		25,2-27,5	
5-Nucleotidase EC 3.1.3.5	Màng sinh chất	3,00-4,21	Aronson và Touster, 1974
γ-GT EC 2.3.2.2.	Màng sinh chất	43,4-50,5	Boelsterli và Zbinden, 1979
Phosphatase acid EC 3.1.3.2	Phân đoạn tiêu thể (lysosom)	5,68-6,25	Wright và cộng sự, 1972
Ribonuclease acid EC 3.1.27.5	Phân đoạn tiêu thể	4,16-5,71	De Duve và cộng sự, 1955
Superoxyd dismutase* EC 1.15.1.1	Phân đoạn sau ty lập thể	2,52	McCord và Fridovich, 1969

* Cần ly tâm lạnh ở 12.000 – 150.000 g.

Tác dụng của các chất gây độc gan ảnh hưởng đến hoạt độ của các enzym này được trình bày ở bảng 5. Bảng 5 cho thấy, đa số các chất độc gan làm giảm hoạt độ của cytocrom P₄₅₀ và các enzym chuyển hóa thuốc, nhưng lại làm tăng phosphatase acid, ribonuclease acid, 5-nucleotidase và γ-GT.

Bảng 5. Ảnh hưởng của các chất độc gan trên enzym trong gan

Enzym	Giảm	Tăng
Succinat dehydrogenase	Carbon tetrachlorid Paracetamol, <i>P. berghei</i>	<i>A. phalloides</i> Lanthanum, Alc. pyr.
2. Glucose-6-phosphatase	<i>A. phalloides</i> Carbon tetrachlorid <i>rghei</i>	Không chất nào

Ảnh hưởng của các chất độc gan trên enzym trong gan (tiếp theo)

	Paracetamol <i>P.berghei</i> Thioacetamid	
3. Phosphatase acid	Không chất nào	Tất cả
4. Ribonuclease acid	Không chất nào	Tất cả
5. 5-Nucleotidase	Không chất nào	Tất cả
6. γ -GT	Không chất nào	Tất cả
7. Superoxyd dismutase	Carbon tetrachlorid <i>P. berghei</i>	Không chất nào
8. Cytocrom P ₄₅₀	Tất cả	Không chất nào
9. Enzym khác chuyển hóa thuốc	Tất cả	Không chất nào

2.4. Các cơ chất chính trong gan phản ánh chức năng gan

Nhiều cơ chất trong gan thay đổi khi gan bị tổn thương. Bảng 6 trình bày một số cơ chất chính là dấu ấn (marker) phản ánh thành phần nào hoặc trạng thái nào của gan bị ảnh hưởng, giá trị bình thường và tài liệu ghi phương pháp xác định các thông số này.

Bảng 6. Các cơ chất chính trong gan phản ánh chức năng gan

Thông số	Dấu ấn (marker) phản ánh	Giá trị bình thường (mg/g gan)	Tài liệu
1. Protein	Cấu tạo màng	132-158	Lowry và cộng sự, 1951
2. Phospholipid	Cấu tạo màng	?	Wagner và cộng sự, 1962
3. Cholesterol	Cấu tạo màng	7,8-12,0	Zlatkis và cộng sự, 1953
4. DNA	Tình trạng tế bào gan	2,00-2,76	Dische, 1930
5. RNA	Tình trạng tế bào gan	3,56-4,99	Meijbaum, 1939
6. Glycogen	Tổn thương tế bào gan	40,22-62,70	Montgomery, 1957
7. Lipid tổng số	Chứng nhiễm lipid	32,3-50,0	Folch và cộng sự, 1957
8. Peroxyd lipid	Chứng nhiễm lipid	145,8	Ohkawa và cộng sự, 1979
9. Lipoprotein-X	Chứng nhiễm lipid	Bình thường không có	Talafant và Tovarek, 1978

Tác dụng của một số chất gây độc gan trên cơ chất ở gan được trình bày ở bảng 7. Bảng 7 cho thấy, không có chất gây độc gan nào làm giảm lipid tổng số, peroxyd lipid, cholesterol và phospholipid, nhưng tất cả đều làm giảm glycogen.

Bảng 7. Ảnh hưởng của các chất độc gan trên cơ chất trong gan

Thông số	Giảm	Tăng
1. Lipid tổng số	Không chất nào	Tất cả trừ thioacetamid
2. Peroxyd lipid	Không chất nào	Tất cả trừ paracetamol và thioacetamid
3. Cholesterol	Không chất nào	Tất cả trừ alc. pyr. và thioacetamid
4. Phospholipid	Không chất nào	Paracetamol
5. Glycogen	Tất cả	Không chất nào
6. Protein	Alcaloid pyrrolizidin	Carbon tetrachlorid Paracetamol Thioacetamid
7. DNA	Alcaloid pyrrolizidin	Galactosamin Thioacetamid
8. RNA	Alcaloid pyrrolizidin	Thioacetamid

2.5. Đánh giá về mô bệnh học

Đến ngày xét nghiệm, sau khi lấy máu, mổ nhanh con vật ra, bóc tách lấy gan để xét nghiệm đại thể cũng như làm các xét nghiệm enzym và cơ chất trong gan. Nhưng thông thường, ngay sau khi bóc tách gan, cần lấy những miếng nhỏ của mỗi thùy gan, cố định trong dung dịch đậm formalin 10%. Sau khi xử lý bằng các phương pháp thường quy, đúc tiêu bản bằng parafin, rồi cắt những lát cắt gan dày 4 μm , và nhuộm trong hematoxylin eosin. Quan sát trên kính hiển vi. Cần phải xét nghiệm nhiều lát cắt của mỗi thùy. Tốt nhất, nên có 2 người quan sát độc lập, không cho họ biết mẫu gan nào là thuộc lô chứng, lô gây tổn thương gan và lô cũng gây tổn thương gan, nhưng có dùng thuốc. Những nghiên cứu về mô bệnh học thường bổ sung rất tốt cho những nghiên cứu hóa sinh đã mô tả ở trên, và rất có ích, khi nghiên cứu tác dụng của thuốc trên sự tái sinh gan.

2.6. Hoạt tính của enzym chuyển hóa thuốc

Hoạt tính của các enzym chuyển hóa thuốc giảm đi do tất cả các chất gây độc với gan (xem bảng 5). Có thể đánh giá hoạt độ của các enzym chuyển hóa thuốc bằng nhiều cách.

2.6.1. Xác định trực tiếp các enzym

Có thể đánh giá bằng cách định lượng hoạt độ của cytochrom P₄₅₀, cytochrom b₅ hoặc các enzym chuyển hóa thuốc khác. Bình thường, hoạt độ của cytochrom P₄₅₀ là 24,9 – 39,9 U/100 mg protein, của cytochrom b₅ là 25,2 – 27,5 U/100 mg protein. Khi dùng chất gây độc gan, hoạt độ của các cytochrom và các enzym chuyển hóa thuốc khác giảm rất mạnh. Gây độc gan kết hợp dùng thuốc. Nếu thuốc có tác dụng bảo vệ gan, chống lại tác dụng gây độc gan của chất đó, thì hoạt độ của cytochrom mạnh hơn lô không dùng thuốc, và có chiều hướng gần với giá trị hoạt độ cytochrom bình thường.

2.6.2. Đánh giá gián tiếp qua định lượng thuốc bị chuyển hóa

Nguyên tắc của phương pháp dựa vào sự kiện là gan bị tổn thương sẽ làm cho chuyển hóa thuốc bị giảm đi, nên lượng thuốc tồn tại trong cơ thể kéo dài. Ta chọn một thuốc mà ta có thể định lượng được trong huyết thanh, ví dụ như antipyrin. Thí nghiệm được tiến hành trên chuột nhắt trắng, dùng 3 lô, mỗi lô 10 – 15 con, chuột trưởng thành, khỏe mạnh, không phân biệt đực cái, nặng 20 – 25g.

- **Lô 1:** Cho chuột uống antipyrin, liều 200 mg/kg. Sau 2 giờ, lấy máu chuột để định lượng antipyrin. Nồng độ antipyrin trong huyết thanh chuột xác định được là a µg/ml.
- **Lô 2:** Từ ngày hôm trước, gây tổn thương gan bằng cách tiêm i.p cho chuột CCl₄ với liều 4 ml/kg hòa trong dầu thực vật. Sau 24 giờ cho chuột uống antipyrin, rồi định lượng antipyrin trong huyết thanh như lô 1. Nồng độ antipyrin trong huyết thanh chuột ở lô 2 xác định được là b µg/ml. Vì CCl₄ gây độc gan, làm giảm hoạt tính của các enzym chuyển hóa thuốc, do đó antipyrin bị chuyển hóa giảm đi, nên b > a.
- **Lô 3:** Lô dùng thuốc T. Giả thiết ta muốn dùng thuốc T trong 3 ngày, thì ta phải cho chuột uống thuốc T trước khi tiêm CCl₄ là 2 ngày. Đến ngày thứ ba, sau khi tiêm CCl₄, cho chuột uống T một lần nữa là 3. Sang ngày thứ 4, cho chuột uống antipyrin, rồi tiến hành định lượng antipyrin như lô 2. Nồng độ antipyrin trong huyết thanh chuột xác định được ở lô 3 là c µg/ml. Nếu thuốc T có tác dụng bảo vệ gan, thì hoạt độ của enzym chuyển hóa thuốc không bị giảm nhiều như lô 2, và ta sẽ được c < b. Nếu thuốc T có tác dụng bảo vệ gan càng mạnh, thì c càng nhỏ và càng gần với a.

2.6.3. Đánh giá gián tiếp qua định lượng BSP

Bromsulphalein (bromsulphalein, bromosulfophtalein, sulfobromophtalein, BSP) là một thuốc, trước đây vẫn được dùng để đánh giá chức năng gan, nhưng hiện nay

ít dùng là do độc tính cao. Nhưng có thể dùng cho động vật thí nghiệm. Nguyên tắc của phương pháp cũng giống như thí nghiệm với antipyrin. Đáng lẽ đánh giá hoạt tính của enzym chuyển hóa thuốc (chuyển hóa antipyrin), thì ở đây, đánh giá dựa vào sự chuyển hóa của BSP. Cách tiến hành cũng như mục 2.6.2.

- *Lô 1:* Tiêm chậm vào i.v. BSP cho chuột nhất trắng với liều 100 mg/kg. Sau 15 phút, lấy máu để định lượng BSP. Thông thường hàm lượng BSP trong huyết tương ở chuột bình thường là dưới 5,0 mg/100 ml.
- *Lô 2:* Từ ngày hôm trước, gây tổn thương gan bằng cách tiêm i.p. cho chuột CCl_4 với liều 4 ml/kg hòa trong dầu thực vật. Đến ngày hôm sau, tiêm i.v. BSP, rồi lấy máu định lượng BSP trong huyết tương như lô 1. Vì CCl_4 gây độc gan, làm giảm hoạt tính của các enzym chuyển hóa BSP, nên nồng độ BSP trong huyết tương chuột ở lô 2 sẽ lớn hơn 5,0 mg/100 ml. Thông thường, nếu nồng độ BSP > 5,8 mg/100 ml huyết tương, thì gan có bị tổn thương, và nồng độ BSP càng lớn, thì mức độ tổn thương gan càng nặng.
- *Lô 3:* Lô dùng thuốc T. Ta có thể dùng thuốc cho chuột trước ngày dùng BSP mấy ngày là tùy. Đến ngày tiêm CCl_4 , sau khi tiêm CCl_4 , cho chuột uống thuốc T một lần nữa. Sang ngày hôm sau, tiêm và định lượng BSP như lô 2. Nếu thuốc T có tác dụng bảo vệ gan, thì hoạt tính của enzym chuyển hóa BSP không bị giảm nhiều như lô 2, và nồng độ BSP trong huyết tương sẽ thấp hơn nhiều so với lô 2.

Tác giả Ấn Độ thí nghiệm trên thỏ 1,5 – 2,8 kg. Cho thỏ uống CCl_4 liều 0,8 ml/kg (có hòa với dầu thực vật với tỷ lệ 1:1 theo thể tích). Ngày hôm sau, tiêm tĩnh mạch BSP với liều 30 mg/kg. Sau khi tiêm BSP được 2 phút, lấy máu ở tai bên kia, và sau 30 phút, lại lấy máu để định lượng BSP. Ở lô đối chứng, không dùng CCl_4 , nồng độ BSP trong máu sau 30 phút chỉ bằng $1,33 \pm 0,23\%$ so với lúc 2 phút. Ở lô gây tổn thương gan bằng CCl_4 , nồng độ BSP còn $55,4 \pm 6,2\%$. Lô thuốc, thường dùng trước khi gây tổn thương gan 2 – 3 ngày và cả ngày gây tổn thương gan. Nếu thuốc có tác dụng bảo vệ gan, thì sự thải trừ BSP tăng, nên nồng độ BSP sẽ thấp hơn so với lô không dùng thuốc có ý nghĩa thống kê, và có thể có khuynh hướng dẫn tới nồng độ ở lô đối chứng không dùng CCl_4 .

2.6.4. Đánh giá gián tiếp dựa vào tác dụng của thuốc bị chuyển hóa

Nguyên tắc của phương pháp dựa vào sự kiện là, gan bị tổn thương sẽ làm cho chuyển hóa thuốc giảm nên tác dụng của thuốc sẽ kéo dài. Trong trường hợp này, ta cũng tiến hành 3 lô chuột nhất trắng, mỗi lô 10 – 15 con, chuột trưởng thành, khỏe mạnh, không phân biệt đực cái, nặng 20 – 25 g.

- **Lô 1:** Tiêm i.p. pentobarbital natri, liều 45 mg/kg, thời gian ngủ trung bình là $9,9 \pm 7,3$ phút. Xác định thời gian ngủ của chuột như sau: Sau khi tiêm pentobarbital natri, chuột sẽ ngủ. Đặt chuột nằm nghiêng, 4 chân về một bên. Thời gian ngủ được tính từ khi chuột bắt đầu ngủ cho đến khi chuột tỉnh, lật mình trở lại, 4 chân xuống phía dưới.
- **Lô 2:** Ngày hôm trước, tiêm dưới da (có thể tiêm i.p, nhưng vì ngày hôm sau, tiêm pentobarbital i.p., nên lần này có thể tiêm s.c.) CCl_4 liều 4 ml/kg hòa với dầu thực vật (hoặc dùng một chất gây độc gan khác). Hai mươi bốn giờ sau, tiêm pentobarbital như lô 1. Do CCl_4 gây độc gan, nên hoạt tính của các enzym chuyển hóa thuốc giảm. Pentobarbital natri chuyển hóa chậm, tồn tại trong cơ thể lâu hơn, làm cho thời gian ngủ trung bình của chuột tăng lên đến 23 phút.
- **Lô 3:** Dùng thuốc nghiên cứu T. Giả sử muốn dùng thuốc liên tục trong 5 ngày, thì phải dùng thuốc từ ngày trước khi tiêm CCl_4 là 4 ngày (và ngày tiêm CCl_4 nữa là 5 ngày). Sau đó, dùng CCl_4 và pentobarbital như lô 2. Nếu thuốc có tác dụng bảo vệ gan, chống lại tác dụng độc gan của CCl_4 , thì thời gian ngủ của chuột sẽ ngắn hơn 23 phút. Thuốc có tác dụng bảo vệ gan càng tốt, thì thời gian ngủ của chuột càng ngắn, càng gần với 7 phút.

Trong một thí nghiệm khác, cũng nghiên cứu trên chuột nhắt trắng, một tuần trước khi thí nghiệm chính thức, xác định thời gian ngủ bình thường của mỗi chuột để loại bỏ các chuột có thời gian ngủ quá bất thường với hexobarbital natri, liều 80 mg/kg i.p. Một tuần sau, chuột được chia thành nhiều lô có thời gian ngủ tương tự nhau giữa các lô. Lô đối chứng, thời gian ngủ là $26,3 \pm 3,0$ phút. Lô dùng CCl_4 liều 1,2 ml/kg, rồi 3 giờ sau tiêm hexobarbital natri, thời gian ngủ là $96,6 \pm 8,3$ phút. Lô dùng thuốc bảo vệ gan, chống lại độc do CCl_4 được dùng trước khi tiêm CCl_4 , thời gian bao nhiêu là tùy theo thuốc và đường dùng. Thậm chí có thể dùng mấy ngày trước đó, mỗi ngày một lần. Sau đó, tiến hành dùng CCl_4 và hexobarbital natri như lô 2. Nếu thuốc có tác dụng, thì thời gian ngủ sẽ nhỏ hơn $96,6 \pm 8,3$ phút có ý nghĩa thống kê, và có khuynh hướng gần với $26,3 \pm 3,0$ phút.

Ghi chú:

- Nếu thay pentobarbital natri bằng hexobarbital natri, thì phải dùng liều cao hơn, cụ thể là dùng liều 75 mg/kg. Tuy nhiên, liều ghi ở đây là liều có tính chất hướng dẫn. Khi tiến hành, phải thăm dò để dùng liều tối ưu, vì nếu thuốc có hàm ảm cao, hoặc thuốc để lâu rồi, thì liều dùng có khi phải cao hơn. Ngoài ra, cũng có thể thay pentobarbital bằng thuốc ngủ barbiturat khác.

- Cần chú ý, nếu thuốc nghiên cứu có thêm tác dụng an thần gây ngủ, thì dù thuốc có tác dụng bảo vệ gan, nhưng thời gian ngủ vẫn kéo dài. Khi đó, phải có biện pháp để loại trừ tác dụng này, nếu không sẽ có kết luận sai.

III. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CỦA THUỐC TRÊN XƠ GAN THỰC NGHIỆM

3.1. Gây xơ gan thực nghiệm

Có nhiều phương pháp gây xơ gan thực nghiệm. Sau đây là vài phương pháp.

3.1.1. Gây xơ gan bằng CCl_4 trong 12 tuần lễ (Maros, Lakatos, 1971)

Trên động vật thí nghiệm, nếu dùng CCl_4 liều thấp và ít lần sẽ gây tổn thương gan. Nhưng nếu dùng CCl_4 liều cao và kéo dài hơn thì tổn thương gan tiến triển, dẫn đến xơ gan. Xơ là kết quả của quá trình tăng tổng hợp và tích tụ collagen ở gan.

Thí nghiệm được tiến hành kéo dài 12 tuần trên chuột cống trắng khỏe mạnh, không phân biệt đực cái, cân nặng 85 – 100g. Để gây xơ, tiêm dưới da dung dịch CCl_4 trong dầu ô liu, 2 lần một tuần trong 12 tuần. Nồng độ CCl_4 và liều dùng tùy theo thời gian:

- 4 tuần đầu: Tỷ lệ CCl_4 : dầu ô liu là 4:1, liều mỗi lần 0,20 ml/100g (tức là 1,6 ml/kg).
- 4 tuần sau: Tỷ lệ CCl_4 : dầu ô liu là 4:2, liều mỗi lần 0,30 ml/100g (tức là 2,0 ml/kg).
- 4 tuần cuối: Tỷ lệ CCl_4 : dầu ô liu là 4:2, liều mỗi lần 0,40 ml/100g (tức là 2,4 ml/kg).

Sau khi tiêm CCl_4 lần cuối cùng, chuột bị xơ gan rõ.

3.1.2. Gây xơ bằng CCl_4 và chế độ ăn uống giàu lipid-ethanol trong 8 tuần (Li C. và cộng sự, 2003)

Dùng chuột cống trắng đã trưởng thành nặng 130 – 180 g khỏe mạnh, không phân biệt đực cái. Gây xơ gan bằng cách tiêm s.c. CCl_4 liều lần đầu là 5,0 ml/kg. Sau đó, mỗi tuần tiêm 2 lần với liều 1,2 ml/kg, liên trong 8 tuần. Song song với tiêm CCl_4 cho chuột ăn bằng thức ăn tổng hợp, có thêm 20% mỡ và 0,05% cholesterol; còn nước uống, cứ 1 ngày cho uống nước thường, lại 1 ngày cho uống nước có pha thêm 30% ethanol. Riêng những ngày tiêm CCl_4 , cho chuột uống nước thường. Chuột được cho ăn uống thoải mái, liên trong 8 tuần, hết 8 tuần, chuột sẽ bị xơ gan.

3.2. Tiến hành thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành trên 3 lô. Mỗi lô 10 – 15 con.

- *Lô 1*: Lô đối chứng, không dùng gì.
- *Lô 2*: Gây xơ như trên.
- *Lô 3*: Gây xơ và dùng thuốc. Nếu muốn nghiên cứu tác dụng ức chế sự hình thành xơ, thì cho chuột uống thuốc hàng ngày ngay từ khi bắt đầu tiêm CCl_4 cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Thường là sau liều CCl_4 cuối cùng được 2 – 3 ngày, thì lấy máu, rồi mổ chuột, lấy gan để xét nghiệm. Trường hợp muốn nghiên cứu tác dụng tiêu xơ, thì sau liều CCl_4 cuối cùng (lúc này xơ đã hình thành) được 3 ngày, mới bắt đầu cho chuột dùng thuốc hàng ngày, liên trong 6 tuần, thì kết thúc thí nghiệm.

3.3. Các thông số đánh giá

Khi nghiên cứu tác dụng của thuốc trên xơ gan, có thể xác định các thông số như khi nghiên cứu tác dụng của thuốc trên tổn thương gan thực nghiệm gồm:

- Các thông số đánh giá chức năng gan trong huyết thanh.
- Các enzym chính trong gan.
- Các cơ chất trong gan, đặc biệt là peroxyl lipid.
- Xét nghiệm mô bệnh học gan.

Tuy nhiên, khi nghiên cứu tác dụng trên xơ gan, vấn đề quan trọng nhất là phải nghiên cứu thông số ức chế xơ và tiêu xơ ở gan.

3.3.1. Nghiên cứu tác dụng ức chế xơ

Để nghiên cứu tác dụng ức chế xơ, người ta định lượng collagen trong gan. Nếu collagen gan ở nhóm dùng thuốc và gây xơ có hàm lượng thấp hơn nhóm chỉ gây xơ, thì chứng tỏ thuốc có tác dụng ức chế hình thành xơ.

Hàm lượng collagen trong gan được định lượng theo phương pháp Newman-Logan (1949). Nguyên tắc của phương pháp là thủy phân collagen ở gan để giải phóng ra hydroxyprolin (HP). Cho hydroxyprolin phản ứng với paradimethylaminobenzaldehyd sẽ sinh ra một chất màu. Đo quang ở bước sóng 557 nm. So sánh với đồ thị chuẩn HP, từ đó suy ra lượng collagen gan (1 mmol HP tương đương với 1 mg collagen).

3.3.2. Nghiên cứu tác dụng tiêu xơ

Để nghiên cứu tác dụng tiêu xơ, phải dựa trên cả thông số hàm lượng collagen trong gan và đặc biệt là hàm lượng hydroxyprolin trong nước tiểu. Nếu ở nhóm gây xơ + thuốc, hàm lượng HP trong nước tiểu cao hơn ở nhóm gây xơ không dùng thuốc, thì thuốc có tác dụng tiêu xơ.

CHƯƠNG 16

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC
CÓ TÁC DỤNG SINH MẬT VÀ THÔNG MẬT

PGS.TSKH. Đỗ Trung Đàm

MỞ ĐẦU

Thuật ngữ sinh mật (cholaretic, choleresis) ở nước ta còn gọi là lợi mật; còn thuật ngữ thông mật (cholagogic) hoặc là chống ứ mật (anticholestasis, anticholestatic). Tuy nhiên, thuật ngữ lợi mật, nhiều khi để chỉ chung khi mật tiết vào tá tràng tăng lên, không phân biệt đó là sinh mật hoặc là thông mật.

Để nghiên cứu tác dụng lợi mật nói chung, người ta dùng loại động vật có túi mật như chuột lang, chó hoặc thỏ. Gây mê con vật, mổ bụng, rồi luồn một ống thông vào ống mật chủ. Xác định lưu lượng mật chảy ra khi chưa dùng thuốc và sau khi dùng thuốc. Nếu sau khi dùng thuốc, lưu lượng mật chảy ra nhiều hơn so với chứng, thì kết luận là thuốc có tác dụng lợi mật nói chung, không phân biệt được sự tăng này là do gan sản xuất tăng, hay do mật từ túi mật chảy ra tăng.

Để nghiên cứu tác dụng sinh mật hoặc lợi mật với ý nghĩa chỉ tính mật được tạo ra, người ta phải dùng con vật không có túi mật như chuột cống trắng. Đối với các con vật có túi mật, phải thắt ống dẫn mật lại, để mật tạo ra từ các tế bào gan, đi vào các đường dẫn mật trong gan, tập trung vào ống gan phải và ống gan trái, rồi đổ vào ống mật chủ. Ở đây, mật được dẫn lưu qua ống thông và được ta hứng lấy. Như vậy, mật tạo ra được đến đâu, sẽ chảy ra ngoài và ta sẽ xác định lưu lượng mật tiết ra qua từng thời gian. Nếu mật tiết ra sau khi dùng thuốc tăng lên, thì thuốc có tác dụng tăng sinh mật.

Đối với chuột nhắt trắng, là con vật cũng có túi mật, nhưng lượng mật tiết ra ít và ống mật chủ nhỏ, rất khó luồn ống thông vào để dẫn lưu mật, thì cách tốt nhất là thắt ống mật chủ, để mật được sản xuất tập trung vào túi mật. Nếu lượng mật

xác định được ở lô dùng thuốc lớn hơn so với ở lô đối chứng, thì thuốc cũng có tác dụng tăng sinh mật.

Để nghiên cứu chỉ riêng tác dụng thông mật, tức là tác dụng kích thích để cho mật trong túi mật chảy ra thôi, cũng tiến hành luồn ống thông vào ống mật chủ (ductus choledocus), để dẫn lưu mật ở trong túi mật chảy ra, nhưng mật được sản sinh từ tế bào gan, phải được tháo ra ngoài, qua ống dẫn từ ống gan chính (ductus hepaticus). Phía dưới lỗ thông dẫn từ ống gan chính, nên thắt lại.

Tác dụng thông mật có thể do nhiều cơ chế:

- Do túi mật tăng co bóp.
- Do giãn ống dẫn mật.
- Đối với người hoặc con vật không dẫn lưu, có thể còn do giãn cơ thắt Oddi, do tiêu sỏi mật ở ống dẫn mật, do đẩy được sỏi ra ngoài...

Khi nghiên cứu thấy lưu lượng mật tăng, có thể còn phải xác định xem chất lượng mật như thế nào, vì có nhiều thuốc tuy làm tăng lưu lượng mật, nhưng là tiết mật loãng (hydrocholeresis). Muốn biết rõ, phải xác định các thành phần trong dịch mật. Ví dụ:

- Xác định tỷ trọng của mật.
- Xác định tỷ lệ cặn khô trong mật.
- Xác định các thành phần chính trong mật, như:
 - ◊ Định lượng các acid mật, muối mật.
 - ◊ Định lượng bilirubin, các sắc tố mật khác.
 - ◊ Định lượng cholesterol, phospholipid.
 - ◊ Định lượng carbonat, Cl^- , Ca, Na, K.

Chú ý:

Mật sản xuất từ tế bào gan loãng hơn nhiều so với mật có ở trong túi mật, vì mật trong túi mật đã được cô đặc gấp 5 – 10 lần.

I. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG LỢI MẬT CỦA THUỐC Ở CHUỘT LANG

1.1. Nguyên tắc

Chuột lang là loài động vật có túi mật, vì vậy, nếu nghiên cứu tác dụng lợi mật nói chung của thuốc, thì chỉ cần luồn ống thông vào ống mật chủ (ductus choledochus) rồi dẫn lưu mật ra ngoài. Nếu muốn xác định riêng tác dụng sinh

mật, thì phải thắt ống túi mật (ductus cysticus) để mật từ túi mật không thoát ra được, còn mật do tế bào gan sản xuất ra được dẫn lưu qua ống polyethylen luồn vào ống mật chủ để chảy ra ngoài. Còn nếu muốn nghiên cứu riêng tác dụng thông mật, thì dẫn lưu mật từ ống mật chủ ra, nhưng phải thắt ống gan chính (ductus hepaticus) để mật từ gan không thể chảy vào ống mật chủ được. Để tránh mật được tế bào gan sản xuất ra không bị ứ ở ống gan chính, có thể ảnh hưởng đến thí nghiệm, phải có một ống để dẫn mật từ ống gan chính ra ngoài. Dưới đây, xin trình bày phương pháp nghiên cứu tác dụng lợi mật nói chung.

1.2. Phương tiện, máy, dụng cụ

* Để xác định lưu lượng mật, cần:

- Chuột lang trưởng thành, khoẻ mạnh, không phân biệt đực hoặc cái, cân nặng 350 – 550g.
- Bơm và kim tiêm.
- Bàn mổ nhỏ bằng gỗ để cố định chuột, kích thước 20 x 30 x 2 cm.
- Đèn 100W đặt dưới bàn chuột để sưởi ấm chuột và nhiệt kế, để duy trì nhiệt độ 35°C, hoặc một phương tiện điều hoà nhiệt độ.
- Urethan hoặc etylurethan để gây mê.
- Dao mổ, kéo, banh.
- Kim chỉ.
- Ống polyethylen nhỏ, thành mỏng để dẫn lưu mật, đường kính trong 0,7 mm, đường kính ngoài 2 – 1,2 mm, dài 15 cm, một đầu lồng vào một kim dài khoảng 2 cm, đường kính ngoài 0,8 mm để luồn vào ống mật chủ.
- Ống polyethylen nhỏ có canun luồn vào tá tràng để bơm thuốc nghiên cứu vào, nếu muốn dùng thuốc trực tiếp vào tá tràng.
- Ống đong hoặc pipet chia độ đến 0,01 ml để hứng mật chảy ra.
- Đồng hồ để theo dõi thời gian

* Để xác định các thông số trong dịch mật như tỷ trọng, hàm lượng chất khô, hàm lượng bilirubin, hàm lượng các ion như Cl^- , CO_3^- , Na^+ , K^+ ... thì tùy theo ta muốn xác định thông số nào, mà cần các phương tiện, máy, dụng cụ thích hợp. Có tác giả còn định lượng trong dịch mật các thông số sau: cholesterol, acid cholic, acid deoxycholic, acid lithocholic, acid chenodeoxycholic, acid cetolithocholic, acid oxycholic.

1.3 Cách tiến hành

Cho chuột nhịn ăn từ tối hôm trước. Sáng hôm sau, gây mê chuột bằng cách tiêm trong màng bụng dung dịch urethan 20 – 25% với liều urethan 1 g/kg. Buộc chuột lang lên bàn mổ nhỏ, có kích thước 20 x 30 x 2 cm, lưng ở dưới bụng lên trên. Cạo lông mặt trước bụng và mặt trong đùi chuột.

Phía dưới ngực, rạch một vết rạch ở giữa bụng dài 2 - 3 cm. Bộc lộ tá tràng, đưa ra ngoài khoang bụng. Bóc tách ống mật chủ. Thắt một nút ở phía gần tá tràng. Lấy ống polyethylen một đầu có kim tiêm, luồn kim tiêm vào ống mật chủ, phía trên nút thắt, rồi buộc chặt lại để dẫn lưu mật. Thắt chặt môn vị, lấy ống polyethylen một đầu có canun, luồn canun hướng về phía tá tràng, rồi buộc chặt lại, để bơm thuốc vào tá tràng qua ống polyethylen này. Cuối cùng, đóng vết mổ lại.

Sau khi mổ xong, để cho con vật ổn định trong khoảng 30 phút đến 1 giờ. Mật qua ống polyethylen được thu vào một ống đong nhỏ hoặc một pipet có độ chia đến 0,01 ml. Đọc thể tích mật chảy ra trong 30 phút, gọi là thể tích mật cơ bản hoặc thể tích mật nền (background). Sau đó, bơm thuốc vào tá tràng. Đọc thể tích mật tiết ra trong 30 phút một, ngay sau khi bơm thuốc cho đến 90 phút. Lô đối chứng, thay thuốc bằng dung dịch NaCl 0,9% với cùng thể tích. Mỗi lô, dùng từ 6 con vật trở lên.

Có thể xác định một số thông số trong dịch mật tùy theo điều kiện của phòng thí nghiệm và yêu cầu của người nghiên cứu.

1.4. Đánh giá kết quả

Thể tích mật thu được ở mỗi chuột cứ 30 phút một được tính quy cho 100g cân nặng chuột. Sau đó, tính thể tích mật trung bình của mỗi nhóm cứ 30 phút một.

Trong một thí nghiệm thử trên 1 lô đối chứng và 1 lô thuốc nghiên cứu A, chúng tôi đã thu được các số liệu sau:

Tác dụng của thuốc A trên thể tích mật tiết ra ở chuột lang

Lô	Thể tích mật tiết ra (ml/100g)			
	30 phút nền	0-30 phút	30-60 phút	60-90 phút
Đối chứng n = 6	$V_{c0} =$ 0,38 ± 0,04	$V_{c30} =$ 0,37 ± 0,03	$V_{c60} =$ 0,36 ± 0,04	$V_{c90} =$ 0,32 ± 0,03
Thuốc n = 8	$V_{t0} =$ 0,36 ± 0,03	$V_{t30} =$ 0,68 ± 0,06	$V_{t60} =$ 0,39 ± 0,04	$V_{t90} =$ 0,35 ± 0,05

* Trong đó :

- V_{c0} , V_{t0} là số trung bình của thể tích mật nền trong 30 phút ở lô đối chứng và lô thuốc.
- V_{c30} , V_{c60} và V_{c90} là số trung bình thể tích mật tiết ra theo thứ tự 0-30, 30-60 và 60-90 phút ở lô đối chứng.
- V_{t30} , V_{t60} và V_{t90} là số trung bình thể tích mật tiết ra theo thứ tự 0-30, 30-60 và 60-90 phút ở lô thuốc.

* Trước hết, so sánh thể tích mật tiết ra trong 30 phút một và tính thống kê xác suất, sau khi dùng NaCl 0,9% so với thể tích mật nền ở lô đối chứng. Trong ví dụ trên, ở lô đối chứng, lưu lượng mật tiết ra trong 30 phút một khá ổn định. Càng về sau, lưu lượng mật có giảm, nhưng đến phút 90, sự giảm của lưu lượng mật vẫn không có ý nghĩa thống kê.

* Lưu lượng mật nền ở 2 lô thuốc và đối chứng xấp xỉ nhau và sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê.

* Cũng từ bảng trên, ở lô thuốc, ngay sau khi dùng thuốc, lưu lượng mật tăng khá mạnh. So với khi chưa dùng thuốc, hoặc so với lô đối chứng ở cùng thời điểm, sự khác nhau có ý nghĩa thống kê với $P < 0,001$. Nhưng sau đó, lưu lượng mật lại trở về xấp xỉ lưu lượng mật nền, và rồi thấp hơn. Như vậy, thuốc A có tác dụng làm tăng lưu lượng mật trong khoảng 30 phút ngay sau khi dùng thuốc.

Độ lợi mật L% có thể được tính theo công thức sau:

$$L\% = \frac{V_{t30} - V_{c30}}{V_{c30}} \times 100 = \frac{0,68 - 0,37}{0,37} = 83,8\% \quad (1)$$

Vì ở lô đối chứng, lưu lượng mật tiết ra khá ổn định, và lưu lượng mật nền ở lô thuốc không khác so với lô đối chứng. Vì vậy, độ lợi mật L% cũng có thể được tính theo công thức sau:

$$L\% = \frac{V_{t30} - V_{t0}}{V_{t0}} \times 100 = \frac{0,68 - 0,36}{0,36} = 88,9\% \quad (2)$$

Như vậy, nếu tính L theo công thức này, thì lô đối chứng được tiến hành chỉ có tính chất tham khảo và để kiểm tra phương pháp.

Pesson và cộng sự (1959), đã tính độ lợi mật theo công thức 2, và thu được các kết quả sau:

- Độ lợi mật của natri dehydrocholat là 70%.
- Độ lợi mật của acid ferrulic là 72%.
- Độ lợi mật của natri 4-methoxy-naphthoylpropionat là 162%.
 - Nếu $V_{130} > V_{10}$ thì thuốc nghiên cứu có tác dụng lợi mật.
 - Nếu $V_{130} < V_{10}$ thì thuốc nghiên cứu có tác dụng ức chế sự tiết mật.

Dựa trên các số liệu thu được, có thể vẽ đồ thị theo dạng hình cột hoặc hình gấp khúc.

II. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG SINH MẬT CỦA THUỐC Ở CHUỘT CỐNG TRẮNG

2.1. Nguyên tắc

Chuột cống trắng là loài vật không có túi mật. Thông thường, khi các tế bào gan sản xuất ra mật, mật sẽ vào các đường dẫn mật trong gan, vào ống gan, qua ống mật chủ, rồi đổ vào tá tràng. Như vậy, lưu lượng mật thu được ở ống mật chủ là do các tế bào gan tiết ra. Đó chính là sự sinh mật, không lẫn với tác dụng thông mật. Mô hình này để nghiên cứu tác dụng sinh mật hoặc thuốc làm giảm sự tiết mật (theo phương pháp của Claude Rozé).

2.2. Phương tiện, máy, dụng cụ

* Để xác định lưu lượng mật, cần:

- *Chuột cống trắng* trưởng thành, khỏe mạnh, không phân biệt đực hoặc cái (nếu dùng tất cả chuột đực sẽ cho kết quả tốt hơn vì đồng đều hơn), cân nặng 200 - 350g. Kinh nghiệm cho thấy, nếu chuột to, thì lưu lượng mật chảy ra nhiều hơn.
- Các dụng cụ khác, như mục 1.2.

* Để xác định các thông số trong dịch mật như tỷ trọng, hàm lượng chất khô, hàm lượng bilirubin, hàm lượng các ion như Cl^- , CO_3^{2-} , Na^+ , K^+ ... thì tùy theo ta muốn xác định thông số nào, mà cần các phương tiện, máy, dụng cụ thích hợp.

2.3. Cách tiến hành

Cho chuột nhịn ăn từ tối hôm trước. Sáng hôm sau, gây mê chuột bằng cách tiêm trong màng bụng dung dịch urethan 20 - 25% với liều urethan 1 g/kg. Buộc *chuột* lên bàn mổ nhỏ, có kích thước 20 x 30 x 2 cm, lưng ở dưới, bụng lên trên. Cạo lông mật trước bụng và mật trong đuôi chuột.

Phía dưới ngực, rạch một vết rạch ở giữa bụng dài 2 – 3 cm. Bộc lộ tá tràng, đưa ra ngoài khoang bụng. Bóc tách ống mật chủ. Thắt một nút ở phía gần tá tràng. Lấy ống polyethylen một đầu có kim tiêm, luồn kim tiêm vào ống mật chủ, phía trên nút thắt, rồi buộc chặt lại để dẫn lưu mật. Thắt chặt môn vị, lấy ống polyethylen một đầu có canun, luồn canun hướng về phía tá tràng, rồi buộc chặt lại, để bơm thuốc vào tá tràng qua ống polyethylen này. Cuối cùng, đóng vết mổ lại.

Trong trường hợp muốn tiêm thuốc vào tĩnh mạch đùi, rạch da ở mặt trong đùi, chỗ gần bẹn. Bộc lộ bó mạch thần kinh. Bóc tách tĩnh mạch đùi. Luồn 2 sợi chỉ ở dưới tĩnh mạch này. Một sợi thắt tĩnh mạch lại (về phía bàn chân). Luồn một kim tiêm vào tĩnh mạch, phía trên nút thắt. Thắt chặt kim đã luồn trong tĩnh mạch bằng sợi chỉ còn lại, rồi đóng da lại. Ngay sau khi mổ xong, làm nóng con vật để duy trì ở nhiệt độ $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Để cho con vật ổn định trong khoảng 30 phút đến 1 giờ.

Mật qua ống polyethylen được thu vào một ống đong nhỏ hoặc một pipet có độ chia đến 0,01 ml. Đọc thể tích mật chảy ra trong 30 phút, gọi là thể tích mật cơ bản hoặc thể tích mật nền (background). Sau đó, bơm thuốc vào tá tràng hoặc tiêm thuốc vào tĩnh mạch tùy theo yêu cầu. Đọc thể tích mật tiết ra trong 30 phút một, ngay sau khi bơm thuốc cho đến 90 phút. Lô đối chứng, thay thuốc bằng dung dịch NaCl 0,9% với cùng thể tích. Mỗi lô, dùng từ 6 con vật trở lên.

Cũng có thể xác định khối lượng mật chảy ra trong 30 phút một hoặc trong 1 giờ một, theo mg/30 phút hoặc mg/giờ. Muốn thế, phải chuẩn bị các cốc thủy tinh nhỏ đã sấy khô, cân bì và đánh số. Cứ 30 phút (hoặc 1 giờ) lại thay một cốc khác đã đánh số theo thứ tự. Cuối cùng, cho tất cả các cốc đã hứng lấy mật vào tủ sấy ở 100°C . Sấy đến khối lượng không đổi. Cho vào bình hút ẩm. Sau khi các cốc đã nguội, cân trên cân phân tích. Khối lượng mật ở mỗi cốc là hiệu số giữa khối lượng cốc có mật và khối lượng cốc khi chưa có mật.

Có thể xác định một số thông số trong dịch mật tùy theo điều kiện của phòng thí nghiệm và yêu cầu của người nghiên cứu.

2.4. Đánh giá kết quả

Giả thiết trong thí nghiệm này, ta tính lượng mật theo khối lượng mật thu được ở mỗi chuột cứ 30 phút một, được tính quy cho 100g cân nặng chuột. Sau đó, tính thể tích mật trung bình của mỗi nhóm cứ 30 phút một theo mg/100g chuột.

Trong một thí nghiệm thử trên 1 lô đối chứng và 1 lô thuốc nghiên cứu là natri dehydrocholat với liều 25 mg/kg, chúng tôi đã thu được các số liệu sau:

**Tác dụng của natri dehydrocholat trên lượng mật tiết ra
ở chuột cống trắng**

Lô	Khối lượng mật tiết ra (mg/100g)			
	30 phút nền	0-30 phút	30-60 phút	60-90 phút
Đối chứng n = 6	$m_{c0} =$ 233,7 ± 19,9	$m_{c30} =$ 223,3 ± 18,7	$m_{c60} =$ 219,5 ± 21,2	$m_{c90} =$ 212,6 ± 20,5
Thuốc n = 8 Liều 25 mg/kg	$m_{t0} =$ 221,4 ± 19,4	$m_{t30} =$ 319,4 ± 25,8	$m_{t60} =$ 234,8 ± 22,6	$m_{t90} =$ 194,3 ± 23,1

Trong đó :

- m_{c0} , m_{t0} là số trung bình của khối lượng mật nền trong 30 phút ở lô đối chứng và lô thuốc.
- m_{c30} , m_{c60} và m_{c90} là số trung bình khối lượng mật tiết ra theo thứ tự 0-30, 30-60 và 60-90 phút ở lô đối chứng.
- m_{t30} , m_{t60} và m_{t90} là số trung bình khối lượng mật tiết ra theo thứ tự 0-30, 30-60 và 60-90 phút ở lô thuốc.

* Trước hết, so sánh khối lượng mật tiết ra trong 30 phút một và tính thống kê xác suất, sau khi dùng NaCl 0,9% so với khối lượng mật nền ở lô đối chứng. Trong ví dụ trên, ở lô đối chứng, lưu lượng mật tiết ra trong 30 phút một khá ổn định. Càng về sau, khối lượng mật có giảm, nhưng đến phút 90, sự giảm của khối lượng mật vẫn không có ý nghĩa thống kê.

* Khối lượng mật nền ở 2 lô thuốc và đối chứng xấp xỉ nhau và sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê.

* Cũng từ bảng trên, ở lô thuốc, ngay sau khi dùng natri dehydrocholat, khối lượng mật tăng khá mạnh. So với khi chưa dùng thuốc, hoặc so với lô đối chứng ở cùng thời điểm, sự khác nhau có ý nghĩa thống kê với $P < 0,001$. Nhưng sau đó, khối lượng mật lại trở về xấp xỉ khối lượng mật nền, và rồi thấp hơn. Như vậy, natri dehydrocholat có tác dụng làm tăng lưu lượng mật trong khoảng 30 phút ngay sau khi dùng thuốc.

Độ lợi mật L% có thể được tính theo công thức sau:

$$L\% = \frac{m_{t30} - m_{c30}}{m_{c30}} \times 100 = \frac{319,4 - 223,3}{223,3} = 43,0\% \quad (1)$$

Vì ở lô đối chứng, khối lượng mật tiết ra khá ổn định, và khối lượng mật nền ở lô thuốc không khác so với lô đối chứng. Vì vậy, độ lợi mật L% cũng có thể được tính theo công thức sau:

$$L\% = \frac{m_{t30} - m_{t0}}{m_{t0}} \times 100 = \frac{319,4 - 221,4}{221,4} = 44,3\% \quad (2)$$

Như vậy, nếu tính L theo công thức (2) này, thì lô đối chứng được tiến hành chỉ có tính chất tham khảo và để kiểm tra phương pháp.

- Nếu $m_{t30} > m_{t0}$ thì thuốc nghiên cứu có tác dụng lợi mật.
- Nếu $m_{t30} < m_{t0}$ thì thuốc nghiên cứu có tác dụng ức chế sự tiết mật.

Ta cũng có thể dựa trên các số liệu thu được, vẽ đồ thị theo dạng hình cột hoặc hình gấp khúc.

III. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG SINH MẬT CỦA THUỐC Ở CHUỘT NHẮT TRẮNG

3.1. Nguyên tắc

Chuột nhắt trắng có túi mật, nhưng rất nhỏ. Lượng mật tiết ra cũng không nhiều, vì vậy, không thể dẫn lưu qua ống mật chủ được. Nguyên tắc của phương pháp là phải gây mê nhẹ chuột rồi thắt ống mật chủ ở cả 2 lô đối chứng và lô thuốc. Sau một thời gian, lại gây mê chuột, bóc tách túi mật, cân tươi túi mật. Sau đó, rạch túi mật, dùng giấy lọc, thấm hết dịch mật trong túi mật. Cân túi mật khi không còn mật. Từ đó, tính ra khối lượng mật của từng chuột. So sánh khối lượng mật trung bình của chuột trong lô thuốc so với lô đối chứng (phương pháp Rudi, 1977).

Ta coi như lúc ban đầu, khối lượng mật trong túi mật ở cả 2 lô là tương đương nhau. Như thế, nếu ở lô dùng thuốc, khối lượng mật trung bình lớn hơn ở lô đối chứng, thì thuốc có tác dụng tăng sinh mật. Ngược lại, nếu khối lượng mật trung bình ở lô thuốc nhỏ hơn ở lô đối chứng, thì thuốc có tác dụng ức chế sự sinh mật. Trong thí nghiệm này, ta chỉ có thể xác định được thông số khối lượng mật.

3.2. Phương tiện, máy, dụng cụ

- Chuột nhắt trắng trưởng thành, khoẻ mạnh, không phân biệt đực hoặc cái, cân nặng 20 - 22g, tốt nhất là 24 - 30g, nhưng không được dùng chuột già.
- Bơm và kim tiêm.
- Bàn mổ nhỏ bằng gỗ để cố định chuột, kích thước 13 x 5,5 x 1,2 cm.
- Đèn 100W đặt dưới bàn chuột để sưởi ấm chuột và nhiệt kế, để duy trì nhiệt độ ở 38°C, hoặc một phương tiện điều hoà nhiệt độ.

- Ether để gây mê chuột.
- Dao mổ, kéo, banh.
- Kim chỉ.
- Đồng hồ để theo dõi thời gian.
- Bông.

3.3. Cách tiến hành

Chia ngẫu nhiên chuột ra làm nhiều lô, mỗi lô ít nhất 10 con: một lô đối chứng, 1 lô dùng thuốc tham chiếu và 2 lô dùng thuốc nghiên cứu với 2 liều khác nhau (thường dùng liều lớn hơn nhau 2 lần). Trước hết, cho chuột dùng thuốc, lô đối chứng dùng dung môi pha thuốc. Sau 60 phút, gây mê nhẹ bằng ether. Cố định chuột trên bàn mổ, lưng ở dưới, bụng lên trên. Cạo lông mặt trước bụng và mặt trong đùi chuột.

Phía dưới ngực, rạch một vết rạch ở bụng dài 2 cm. Thắt ống mật chủ, rồi khâu vết mổ lại. Chuột sẽ tỉnh lại bình thường. Sau 30 phút kể từ khi thắt ống mật chủ, gây mê chết chuột. Mổ bụng chuột, bóc tách lấy túi mật, rồi cân trên cân phân tích được m_1 (mg). Rạch túi mật. Thấm hết mật trong túi mật bằng giấy lọc, rồi cân vỏ túi mật, được m_2 (mg). Khối lượng mật trong túi mật của chuột đó là $m_1 - m_2$ (mg). Từ đó, tính khối lượng mật trung bình của một chuột ở mỗi lô.

Thuốc có thể cho uống hoặc tiêm. Ở trên, đã trình bày cách cho dùng thuốc một lần. Nếu muốn dùng thuốc 4 lần chẳng hạn, thì 3 ngày trước khi mổ chuột, mỗi ngày cho chuột dùng thuốc 1 lần, đến ngày mổ chuột, cho dùng thuốc 1 lần nữa là 4.

3.4. Đánh giá kết quả

Gọi m_c là khối lượng mật trung bình của mỗi chuột ở lô đối chứng.

m_t là khối lượng mật trung bình của mỗi lô chuột ở lô thuốc.

Nếu $m_t > m_c$ thì thuốc có tác dụng làm tăng tiết mật.

Nếu $m_t < m_c$ thì thuốc có tác dụng ức chế tiết mật.

Trước hết, đánh giá ý nghĩa thống kê sự khác nhau giữa 2 lô dùng test "t" của Student.

Tác dụng lợi mật L% của thuốc được tính theo công thức:

$$L\% = \frac{m_t - m_c}{m_c} \times 100$$

Ghi chú

Theo kinh nghiệm của chúng tôi, ở lô không dùng thuốc, khối lượng trung bình dịch mật trong túi mật ở lô đối chứng vào khoảng 4,5 - 6,5 mg. Nếu dùng chuột nhắt trắng to, thì khối lượng này có thể lên đến 10 mg. Tất nhiên, sau khi tính toán, phải biểu thị trị số trung bình bằng số trung bình $\pm$ sai số chuẩn ($M \pm SE$).

IV. CÁC MÔ HÌNH KHÁC NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG LỢI MẬT**4.1. Nghiên cứu tác dụng lợi mật của thuốc ở thỏ**

Thỏ cũng là loài động vật có túi mật. Cách thức tiến hành nghiên cứu tác dụng lợi mật của thuốc ở thỏ cũng giống như khi nghiên cứu trên chuột lang. Nếu chỉ muốn nghiên cứu tác dụng của thuốc trên sự sinh mật, thì tốt nhất là thắt ống túi mật (ductus cysticus) lại.

Thường dùng thỏ không phân biệt đực cái, khỏe mạnh, trưởng thành hoặc gần trưởng thành, cân nặng 1,7 - 2,6 kg. Thường cũng gây mê bằng urethan với liều tiêm i.p. là 1,0 - 1,5 g/kg. Các thao tác khác cũng giống như tiến hành trên chuột lang.

4.2. Nghiên cứu tác dụng lợi mật của thuốc ở chó

Nghiên cứu trên chó sẽ có kết quả tốt hơn vì chó gần với người hơn so với chuột và thỏ. Tuy nhiên giá thành đắt, nên mỗi lô thường chỉ làm vài con, và do đó không đánh giá thống kê được. Chó cũng là loài động vật có túi mật, nên nếu nghiên cứu tác dụng sinh mật thì nên thắt ống túi mật lại.

Gây mê chó, nên dùng natri pentobarbital, tiêm i.p. liều 25 mg/kg, sau 10 phút, tiêm i.v. thêm 15 mg/kg. Sau khi chó đã mê, mổ bụng, dẫn lưu ống mật chủ. Thắt ống túi mật, để mật trong túi mật không ảnh hưởng đến mật được sinh ra do tế bào gan. Các thao tác khác được tiến hành như ở chuột lang.

4.3. Nghiên cứu tác dụng sinh mật trên con vật tỉnh

Để nghiên cứu sự tiết mật trên con vật tỉnh, không ở trạng thái mê, có thể dùng bất kỳ loài động vật nào có thể dẫn lưu mật được, trừ những con vật quá nhỏ như chuột nhắt trắng.

Trước hết, gây mê con vật. Mổ bụng. Thắt ống túi mật. Đặt ống thông polyethylen vào ống mật chủ để dẫn lưu mật. Dẫn ống thông ra khỏi khoang bụng, rồi luồn ống thông dưới da, đưa lên gáy con vật, rồi để đầu ống thông ra

ngoài ở khoảng giữa 2 tai con vật. Hàng ngày, thu mật. Tính thể tích dịch mật thu được. Phân tích hàm lượng một số chất trong dịch mật tùy theo yêu cầu của người nghiên cứu.

V. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG THÔNG MẬT

5.1. Nguyên tắc

Nghiên cứu tác dụng thông mật hoặc tác dụng chống ứ mật có thể tiến hành theo các cách sau:

5.1.1. Gây ứ mật

Việc gây ứ mật có thể được tiến hành bằng cách dùng ethynylestradiol liều 5 mg/kg tiêm dưới da trong 3 ngày liên tiếp; bằng paracetamol uống liều 2 g/kg hoặc bằng thioacetamid. Sau đó, chia các con vật ra làm 2 lô, một lô đối chứng và một lô thuốc và tiến hành dẫn lưu mật theo các phương pháp thông thường. Ở lô đối chứng, do dùng chất gây ứ mật, nên thể tích mật chảy ra ít. Nếu ở lô dùng thuốc, thể tích mật thu được nhiều hơn có ý nghĩa thống kê so với lô đối chứng, thì thuốc nghiên cứu có tác dụng thông mật.

5.1.2. Dẫn lưu mật từ ống túi mật chảy ra

Như đã trình bày ở trên, theo cách này, một mật, phải dẫn mật từ ống gan chính ra ngoài để mật sinh ra từ tế bào gan không lẫn vào với mật từ túi mật chảy ra; mặt khác, dẫn lưu mật từ túi mật chảy ra qua một ống polyethylen để dẫn lưu mật từ ống mật chủ. Cho thuốc nghiên cứu vào tá tràng, nếu thuốc có tác dụng kích thích mật từ túi mật chảy ra, thì thể tích mật thu được ở lô dùng thuốc sẽ nhiều hơn ở lô không dùng thuốc.

5.1.3. Tác dụng trên sự co cơ trơn của túi mật ở chuột lang hoặc thỏ *in vitro*

Giết chuột lang hoặc thỏ bằng cách lấy một mảnh gỗ chắc, đập mạnh vào đầu cho con vật chết đột ngột. Mở bụng, bóc tách ống túi mật rồi thắt lại. Cắt ống dẫn mật ở phía bên kia của túi mật. Bóc tách nhanh túi mật, rồi cho túi mật vào bình nuôi cơ quan cô lập đã có sẵn dung dịch Tyrode (NaCl 8g; KCl 0,2g; CaCl₂ 0,2g; MgCl₂ 0,1g; NaH₂PO₄.H₂O 0,065g; NaHCO₃ 0,5g; glucose 1g; nước cất vừa đủ 1000 ml) sục khí oxy và giữ ở 37°C. Ghi sự co bóp bình thường của túi mật qua một máy biến năng đẳng trương. Sau đó thêm thuốc vào bình cơ quan cô lập. Nếu thuốc có tác dụng làm tăng co bóp túi mật, thì biên độ co bóp của túi mật sẽ tăng lên.

Muốn nghiên cứu tác dụng chống co bóp túi mật, trước hết, phải làm cho túi mật tăng co bóp bằng cách dùng acetylcholin 50 ng/ml, hoặc histamin 0,5 µg/ml. Nhỏ dần dần từng giọt của chất gây co cho đến khi sự co bóp đạt yêu cầu. Ghi thể tích chất gây co (ví dụ a giọt). Rửa chế phẩm túi mật 3 lần để loại bỏ hết chất gây co. Thêm thuốc nghiên cứu vào môi trường. Sau 1 phút, thêm vào a giọt chất gây co. Tác dụng chống co bóp túi mật được đánh giá bằng cách so sánh biên độ co trước và sau khi dùng thuốc nghiên cứu.

5.1.4. Tác dụng trên sự co bóp túi mật của chó in vivo

Chó khoẻ mạnh, không phân biệt đực cái được gây mê và mổ như khi dẫn lưu mật trong thí nghiệm lợi mật. Luồn một canun vào ống túi mật. Canun này nối qua một biến năng đẳng áp, rồi qua máy ghi. Nếu không có máy biến năng đẳng áp và máy ghi, có thể nối vào một nhánh của huyết áp kế thuỷ ngân, rồi ghi trên giấy âm khối. Thuốc nghiên cứu được tiêm tĩnh mạch hoặc cho vào tá tràng, với liều đã thấy có tác dụng lợi mật trong thí nghiệm trước.

CHƯƠNG 17

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ
THUỐC CHỐNG ĐÁI THÁO ĐƯỜNG***GS. Đoàn Thị Nhu***MỞ ĐẦU**

Đái tháo đường được coi là do tổn thương các tế bào β của đảo tụy bởi các chất chuyển hoá có gốc oxy tự do, đặc biệt superoxyd và hydro peroxyd, do sự giảm hoạt độ của superoxyd dismutase (SOD) ở đảo tụy. Đái tháo đường típ 2 (đái tháo đường không phụ thuộc insulin) là một rối loạn chuyển hoá có tỷ lệ trường hợp mắc ở người lớn, đặc biệt ở người có tuổi, rất cao, và thường gây các biến chứng mạn tính. Đáp ứng không bình thường của insulin với glucose và sự kháng của các mô đích ngoại biên với insulin là những nét chính quan sát thấy trong đái tháo đường típ 2.

CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**I. THỬ NGHIỆM TÁC DỤNG HẠ ĐƯỜNG MÁU TRÊN CHUỘT CỐNG
TRẮNG BÌNH THƯỜNG (*mô tả bởi Nityanand, 1984*)**

Chuột cống trắng giống Charles Foster (khoảng 120 – 150g) được nuôi trong điều kiện chuẩn của phòng thí nghiệm và dùng để nghiên cứu.

a. Thử nghiệm một liều

Để chuột nhịn đói trong 18 giờ. Lấy máu ban đầu từ tĩnh mạch đuôi để xác định trị số đường máu. Cho chuột uống thuốc bằng luồn ống qua miệng hoặc bằng một kim cong dài đầu tù. Sau khi cho uống thuốc 2 và 4 giờ, lấy máu để xác định nồng độ đường máu.

b. Thử nghiệm nhiều liều

Chuột được uống thuốc thử nghiệm trong 2 tuần. Lấy máu để xác định đường máu trước khi cho uống thuốc và sau khi cho uống 7 ngày. Vào ngày cuối cùng của 2 tuần, xác định đường máu ở 1, 2 và 4 giờ sau khi cho uống glucose với liều 1,5 g/kg.

Đánh giá: Khi nồng độ đường máu ở lô chuột thử thuốc giảm 30% hay hơn vào lúc 3 hoặc 4 giờ so với lô chuột đối chứng thì thuốc được coi là có tác dụng.

II. THỬ NGHIỆM TÁC DỤNG HẠ ĐƯỜNG MÁU TRÊN ĐỘNG VẬT ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

2.1. Trên chuột cống trắng gây đái tháo đường bằng alloxan

Chuột cống trắng đực cân nặng 180 – 200 g được gây đái tháo đường bằng một mũi tiêm tĩnh mạch alloxan 150 mg/kg sau khi nhịn đói 18 giờ. Có thể dùng insulin thường hoặc Pz insulin có tác dụng kéo dài (1 đến 4 đơn vị tiêm dưới da/ngày/chuột) trong 3 tuần để vượt qua giai đoạn ban đầu tăng đường máu và nhiễm acid. Tám ngày sau khi tiêm alloxan, lấy máu để xác định đường máu. Các chuột có đường máu lúc đói 280 mg% hay hơn được dùng để nghiên cứu tiếp, và được chia thành 3 nhóm: một nhóm cho uống thuốc thử nghiệm, một nhóm cho uống một thuốc trị đái tháo đường để đối chiếu và một nhóm chứng không uống thuốc. Thuốc thử nghiệm được cho uống hàng ngày trong 21 ngày sau đó, pha trong nước muối sinh lý. Thuốc trị đái tháo đường cho nhóm đối chiếu và nước muối sinh lý cho nhóm đối chứng cũng được cho trong cùng thời gian. Lấy máu từ đuôi chuột ở 1, 2 và 3 tuần sau khi bắt đầu cho chuột uống thuốc để xác định đường máu (Anand và cộng sự, 1989; Nityanand, 1984).

2.2. Trên chuột cống trắng gây đái tháo đường bằng streptozotocin

Chuột cống trắng Wistar đực cân nặng khoảng 200 đến 250g được gây đái tháo đường bằng tiêm tĩnh mạch streptozotocin hoà tan trong dung dịch đệm 0,1 M citrat (pH 4,5) với liều 60 mg/kg. Các thí nghiệm trên chuột tăng đường máu được thực hiện 8 ngày sau khi tiêm streptozotocin. Trong thời gian này, đái tháo đường đã thể hiện một cách rõ rệt và các mức đường máu trong phạm vi 300 – 500 mg/100 ml. Đường máu được đo bằng phương pháp enzym đo glucose bằng một máy phân tích tự động. Chuột có mức đường máu trên 300 mg/100 ml được coi là đái tháo đường để đưa vào thử nghiệm.

Hoạt tính hạ đường máu của thuốc thử nghiệm được xác định trên chuột nhịn đói được cho uống dung dịch thuốc thử nghiệm với liều thích hợp. Tính toán kết quả

là tỷ lệ phần trăm giảm đường máu so với đường máu ban đầu. Các trị số đường máu ở lô chuột thử thuốc được so sánh với lô đối chứng đã được cho uống cùng thể tích dung môi (Hsu và cộng sự, 1997; Nityanand, 1984).

2.3. Trên chuột nhắt trắng gây đái tháo đường bằng streptozotocin

Dùng chuột nhắt trắng đực cân nặng 22 – 25 g. Chuột được nuôi trong phòng điều hoà nhiệt độ ở $22 \pm 2^\circ\text{C}$ với chu kỳ 12 giờ sáng và 12 giờ tối. Động vật được giữ trong phòng thí nghiệm động vật trong 7 ngày và được ăn uống tự do. Để xác định mức đường máu, lấy máu từ xoang hang. Chuột được chia thành hai nhóm. Một nhóm được tiêm tĩnh mạch 150 mg/kg thể trọng streptozotocin mới được hoà tan trong dung dịch đệm citrat pH 4,5 và nhóm kia được cho dung dịch đệm và được dùng làm đối chứng. Tám ngày sau khi tiêm streptozotocin, xác định đường máu của tất cả chuột. Các chuột tiêm streptozotocin có mức đường máu trên 300 mg/100 ml được coi là đái tháo đường và được dùng trong nghiên cứu. Đường máu được xác định bằng phương pháp glucose oxydase. (Miura, 1997).

2.4. Trên chuột cống trắng cắt bỏ tuyến tụy (Nityanand, 1984)

Chuột cống trắng được cắt bỏ 95% tuyến tụy bằng phương pháp Scow (1957). Sau 28 ngày phục hồi, chuột được tiêm bắp hydrocortison với liều 5 mg/chuột/ngày trong 10% ethanol trong 4 – 6 ngày để gây đái tháo đường, biểu hiện ở mức đường máu lúc đói trên 200 mg/100 ml trong 2 ngày liên tiếp.

2.5. Trên động vật đái tháo đường do di truyền (Nityanand, 1984)

Các loài động vật như chuột hamster Trung Quốc, chuột nhắt KK và chuột nhắt ob/ob có đường máu cao do đặc tính di truyền được dùng để nghiên cứu thuốc hạ đường máu.

III. THỬ NGHIỆM DUNG NẠP GLUCOSE

Sau khi để chuột cống trắng nhịn ăn một đêm (18 giờ), cho chuột uống dung dịch glucose (2 g/kg thể trọng). Lấy máu để xác định đường máu trước khi cho uống glucose và ở 1/2, 1, 2 và 3 giờ sau khi cho uống ở các nhóm chuột. Nhóm chuột thử thuốc được cho uống thuốc thử nghiệm 30 phút trước hoặc cùng lúc với glucose. Một thuốc đái tháo đường chuẩn được dùng để so sánh (Nityanand, 1984 ; Miura, 1997).

IV. THỬ NGHIỆM TÁC DỤNG TRÊN SỰ TIẾT INSULIN *IN VITRO* (NMILA, 2000)

- *Cô lập tuyến tụy*

Các tiêu bản tuyến tụy thu được từ chuột cống trắng Wistar đực cân nặng 350g và được cho ăn tụy thích. Chuột được gây mê với natri pentobarbiton 60 mg/kg bằng tiêm phúc mạc. Cô lập tuyến tụy và truyền dịch.

Cô lập hoàn toàn tuyến tụy khỏi các mô và cơ quan bên cạnh và truyền dịch qua hệ động mạch của tuyến với một dung dịch đệm bicarbonat Krebs - Ringer chứa albumin huyết thanh bò tinh chế (2 g/l lít). Tiêu bản này bảo tồn tính toàn vẹn về giải phẫu của cơ quan cũng như các mạch máu của tuyến tụy.

Như vậy có thể nghiên cứu đồng thời các tác dụng của thuốc thử nghiệm trên sự tiết insulin và trên sức kháng của mạch tụy.

Chọn nồng độ glucose (8,3 mM) để kích thích nhẹ sự tiết insulin. Một hỗn hợp O₂ (95%) và CO₂ (5%) được bơm thành bọt khí qua môi trường ở áp suất không khí. Dung dịch có pH khoảng 7,4. Tiêu bản được giữ ở 37,5°C. Mỗi cơ quan được truyền dịch ở áp suất hằng định. Lựa chọn áp suất để gây tốc độ chảy khoảng 2,5 ml/phút lúc bắt đầu thí nghiệm. Khi có sự co mạch hoặc giãn mạch, tốc độ chảy giảm hoặc tăng, tương ứng. Lấy mẫu đầu tiên sau thời gian cân bằng 30 phút. Lấy thêm hai mẫu sau 10 và 15 phút. Mẫu sau (là mẫu lấy ở 45 phút) biểu thị trị số đối chứng. Tốc độ chảy được đo trong một phút và các mẫu được làm đông bằng ngay lập tức để định lượng bằng xét nghiệm phóng xạ miễn dịch insulin.

Thuốc thử nghiệm cho vào dịch truyền được truyền trong 20 phút và được so sánh với đối chứng âm tính (dịch truyền không chứa thuốc) và đối chứng dương tính (dịch truyền chứa một thuốc chống đái tháo đường tiêu biểu).

- *Cô lập đảo tụy*

Cô lập đảo tụy chuột cống trắng sau sự ủ tuyến tụy với collagenase. Ngay sau khi cô lập, các đảo tụy được ủ trước trong 90 phút ở 37,5°C trong dung dịch đệm bicarbonat Krebs - Ringer (pH 7,4) chứa 1 g/lít albumin huyết thanh bò và 8,3 mM glucose. Các mẻ 3 đảo tụy sau đó được ủ với sự có mặt của 8,3 hoặc 16,7 mM glucose trong 30 phút trong 1 ml môi trường chứa nồng độ thích hợp thuốc thử nghiệm hoặc nước muối đẳng trương (đối chứng). Vào cuối thời gian ủ, lấy một ước số của môi trường để làm xét nghiệm phóng xạ miễn dịch insulin.

- *Xét nghiệm*

Đo các nồng độ insulin bằng phương pháp Herbert và cộng sự (1965) dùng một kháng thể cung cấp bởi Miles Laboratories (Paris). ¹²⁵I - insulin được cung cấp bởi

International CIS (Gif sur Yvette, Pháp). Chất chuẩn dùng là insulin của chuột cống trắng (Novo, Copenhagen, Đan Mạch), có hoạt độ sinh học là 22,3 μ đơn vị/nanogam. Độ nhạy của phương pháp là 0,1 ng/ml. Hiệu suất insulin trong một phút được xác định bằng cách nhân nồng độ hormon trong dung dịch chảy ra (ng/ml) với tốc độ chảy của dịch truyền (ml/phút).

V. THỬ NGHIỆM CÁC TÁC DỤNG NGOÀI TUYẾN TUY (Welihinda và cộng sự, 1986)

Trong các thí nghiệm, dùng các chuột cống trắng Sprague – Dawley đực cân nặng 200 ± 25 g, được cho chế độ ăn phòng thí nghiệm chuẩn. Chuột để nhịn ăn một đêm trước khi thí nghiệm trong trường hợp dùng để nghiên cứu sự tổng hợp glycogen và triglycerid. Trong nghiên cứu sự tạo glucose, chuột được để nhịn ăn trong 48 giờ.

5.1. Thử nghiệm tác dụng trên hô hấp tế bào

Giết chuột bằng cách cắt đầu và lấy cơ hoành để nghiên cứu. Đánh giá hoạt động hô hấp của mô bằng cách đo bằng máy áp kế Warburg. Mô (150 mg) được treo trong dung dịch đệm phosphat Krebs Henseleit Ringer (2 ml; pH 7,4) chứa 20 mM glucose. Sau khi ủ trước (40 phút ở 37°C và 100 lần đập/phút trong máy Warburg), thuốc thử nghiệm, với sự bổ sung thêm 20 mM glucose, được đổ từ nhánh bên vào bình chính và ủ (40 phút ở 37°C và 100 lần đập/phút). Trong các thí nghiệm đối chứng tương tự, dung dịch 20 mM glucose (0,3 ml) được đổ vào thay vì thuốc thử nghiệm. Tính tỷ lệ oxy hấp thu theo phương pháp của Umbreit và cộng sự (1957).

5.2. Thử nghiệm tác dụng trên sự hấp thu glucose

Trong nghiên cứu này, giết chuột bằng cách cắt đầu và lấy cơ hoành (150 mg). Ủ trước cơ này trong máy Warburg (10 phút ở 37°C và 100 lần đập/phút) trong dung dịch đệm phosphat Krebs - Henseleit (2 ml; pH 7,4) được bổ sung với 20 mM glucose. Đổ thuốc thử nghiệm, được bổ sung với 20 mM glucose, từ nhánh bên vào bình Warburg chính. Trong các thí nghiệm đối chứng tương tự, đổ dung dịch 20 mM glucose vào thay vì thuốc thử nghiệm. Sau khi ủ (60 phút ở 37°C và 100 lần đập/phút), lấy các mô ra để cân trọng lượng và xác định hàm lượng glucose trong môi trường ủ bằng phương pháp glucose oxydase của Hugget và Nixon (1957).

5.3. Thử nghiệm tác dụng trên sự tổng hợp glycogen và triglycerid

Trong các nghiên cứu này, các động vật được chia ngẫu nhiên thành hai nhóm. Nhóm thứ nhất được cho thuốc thử 30 phút trước khi được cho uống glucose

(1 ml/100 g thể trọng; dung dịch 50% trọng lượng/thể tích). Nhóm thứ hai (đối chứng) được cho uống nước cất (1 ml/100 g thể trọng) thay vì thuốc thử nghiệm, trước khi được cho uống glucose với cách thức như trên. Giết các động vật 90 phút sau khi cho uống glucose (nghĩa là 120 phút sau khi cho uống thuốc thử nghiệm) bằng cách cắt đầu và thu lấy gan, cơ và mô mỡ.

Sự quyết định giết chuột 120 phút sau khi cho uống thuốc vì thuốc thử nghiệm ở đây là dịch ép mướp đắng và người ta đã biết tác dụng hạ đường máu tối đa xảy ra khoảng 120 phút sau khi cho uống dịch ép mướp đắng. Đối với các thuốc khác, cần lựa chọn thời gian thích hợp. Xác định hàm lượng glycogen trong gan và cơ theo phương pháp vi lượng của Kemp và Van Heijningen (1954) sau khi loại bỏ glucose tự do trong mô bằng chiết xuất trong methanol (80%, thể tích/thể tích). Xác định hàm lượng triglycerid theo phương pháp đo màu dựa trên phản ứng Hantzsch (Varley và cộng sự, 1980).

5.4. Thử nghiệm tác dụng trên sự tạo glucose

Hai nhóm chuột được để nhịn đói trong 48 giờ. Một nhóm được cho thuốc thử nghiệm và nhóm thứ hai (đối chứng) được cho liều tương đương nước cất. Chuột bị giết 120 phút hoặc một thời gian thích hợp sau và thu lấy thận để xác định sự tạo glucose theo phương pháp của Tutwiler và Brentzel (1980). Thận được rửa trong nước muối sinh lý lạnh, thái thành lát mỏng và cắt thành mảnh nhỏ 30 – 40 mg. Sau khi rửa trong môi trường bicarbonat Krebs Ringer lạnh được bơm khí tốt ($O_2 + CO_2$; 95:5), các mô thận thử thuốc và đối chứng được ủ trước riêng biệt từng loại (trong 2 nhóm, thử thuốc và đối chứng) trong cùng môi trường (4 ml) trong 25 phút ở 37°C với sự lắc liên tục. Sau đó các mô được ủ (trong 2 nhóm như trước) trong môi trường bicarbonat Krebs Ringer được thông khí tốt (4 ml, được bổ sung với 0,01 M pyruvat) trong 60 phút ở 37°C với sự lắc liên tục. Sau khi ủ, hút lấy môi trường để định lượng glucose theo phương pháp glucose oxydase sửa đổi của Krebs và cộng sự (1963). Các mô được sấy (110°C) một đêm và cân.

5.5. Thử nghiệm tác dụng trên sự tạo glucose của các lát thận

Các thận được thu từ các chuột cống trắng đã nhịn đói 48 giờ như đã mô tả trong thí nghiệm trước. Chuẩn bị các mảnh của các lát thận như ở trên và chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm. Một nhóm mô thận (thử thuốc) được ủ trước riêng biệt (trong 25 phút ở 37°C với sự lắc liên tục) trong môi trường bicarbonat Krebs Ringer được thông khí tốt chứa thuốc thử nghiệm (4 ml). Nhóm kia (đối chứng) của các lát thận được ủ trước một cách tương tự trong môi trường bicarbonat Krebs Ringer

(4 ml). Sau đó, cả những lát thận thử nghiệm và đối chứng đều được ủ riêng biệt trong môi trường bicarbonat Krebs Ringer được bổ sung với pyruvat (0,01 M, 4 ml) trong 60 phút ở 37°C với sự lắc liên tục. Lấy môi trường để định lượng glucose, và sấy các mô và cân như trên.

VI. THỬ NGHIỆM TÁC DỤNG TRÊN HOẠT ĐỘ CỦA SUPEROXYD DISMUTASE Ở ĐẢO TUY ĐỘNG VẬT ĐÁI THÁO ĐƯỜNG (*Bhattacharya, 1995*)

Cô lập các tế bào đảo tụy bằng kỹ thuật của Papaccio và cộng sự (1991) và xác định hoạt độ của superoxyd dismutase (SOD) bằng khả năng ức chế sự tự oxy hoá tự nhiên của adrenalin thành adenochrom. Thực hiện định lượng protein bằng phương pháp của Lowry và cộng sự (1951), và hoạt độ của superoxyd dismutase được biểu thị bằng số lượng đơn vị của hoạt độ cho 1 mg protein, một đơn vị hoạt độ SOD gây oxy hoá adrenalin khoảng 50%.

Chuột cống trắng Wistar đực (160 - 180g) được dùng. Cho chuột uống thuốc thử nghiệm hoà trong nước cất qua một ống miệng - dạ dày với một số mức liều, giữ thể tích hằng định ở 5 ml/kg. Các chuột đối chứng được cho uống lượng dung môi tương đương. Bắt đầu cho uống thuốc 1 giờ sau khi tiêm tĩnh mạch cho chuột alloxan 140 mg/kg (1 giờ trước khi tiêm alloxan, tiêm dưới da cho chuột insulin thường 0,1 đơn vị). Tiếp tục cho chuột uống thuốc ngày một lần trong 7, 14, 21 hoặc 28 ngày, ở các nhóm chuột khác nhau. Lô chuột đối chứng cũng được tiêm alloxan và được cho uống cùng thể tích nước cất thay vì thuốc thử nghiệm với cách thức như trên.

Giết chuột bằng cách cắt đầu, lấy máu động mạch để xác định đường máu và lấy tuyến tụy để cô lập các tế bào đảo tụy. Ghi thể trọng chuột trước khi giết chuột.

VII. THỬ NGHIỆM TÁC DỤNG ỨC CHẾ ALDOSE REDUCTASE (*Schin và cộng sự, 1993*)

Enzym aldose reductase gây tích lũy sorbitol trong tế bào, đã được chứng minh có vai trò quan trọng trong bệnh sinh các biến chứng mạn tính của đái tháo đường như bệnh võng mạc, bệnh thần kinh và bệnh thận. Đã có nhiều nghiên cứu để xác định không những các thuốc tổng hợp mà cả những thuốc nguồn gốc thiên nhiên có tác dụng ức chế aldose reductase và do đó có khả năng dự phòng hoặc làm chậm phát triển các bệnh là biến chứng của đái tháo đường.

Thủy tinh thể bò là nguồn cung cấp enzym aldose reductase được lấy từ mắt bò thu nhận từ một lò mổ gia súc ngay sau khi giết bò. Các thủy tinh thể nguyên vẹn sau khi bóc tách được làm đông bằng ở -60°C cho đến khi dùng.

- Chế tạo enzym

Thực hiện chế tạo enzym theo phương pháp mô tả bởi Hayman (1965) với một ít sửa đổi. Thủy tinh thể được đồng thể hoá trong 5 thể tích dung dịch đệm phosphat 5 mM bằng giá (pH 7,4) trong máy xay nhuyễn Waring và được ly tâm ở 18.000g trong 15 phút để loại bỏ các chất không hoà tan. Dịch nổi bên trên được cho thêm amoni sulfat bão hoà với sự bão hoà 40%.

Dịch treo đặc được để yên trong 15 phút, thỉnh thoảng khuấy để đảm bảo sự kết tủa hoàn toàn và được ly tâm. Phân đoạn nổi bên trên thu được như vậy được dùng làm nguồn enzym aldose reductase mà không cần tinh chế thêm.

- Thử nghiệm enzym

Đo hoạt độ của aldose reductase theo phương pháp mô tả bởi Brubaker (1986) với một ít sửa đổi. Phản ứng được bắt đầu với việc cho thêm aldose reductase vào, và theo dõi tỷ suất oxy hoá NADPH (nicotinamid adenin dinucleotid phosphat, dạng đã khử) bằng cách ghi sự giảm hấp thụ ở 340 nm trong máy quang trắc phổ. Hỗn dịch của phản ứng đối chứng chứa 0,4 M amoni sulfat, 0,16 mM NADPH trong dung dịch đệm phosphat 0,1 M (pH 6,2), 0,2 ml dung dịch enzym và 0,1 ml cơ chất trong tổng thể tích 1,0 ml. Một thử nghiệm trắng gồm tất cả các thuốc thử trừ cơ chất được dùng để hiệu chỉnh sự oxy hoá không đặc trưng của NADPH không kết hợp với sự khử cơ chất.

Hiệu chỉnh hoạt độ của enzym bằng pha loãng trong nước sao cho 0,2 ml dung dịch enzym cho tỷ suất phản ứng trung bình đối với các phản ứng đối chứng là $0,055 \pm 0,005$ đơn vị hấp thụ/5 phút. Tất cả các phản ứng enzym được khởi đầu bởi việc cho thêm cơ chất và được thực hiện ở 25°C với sự có mặt hoặc không có mặt các thuốc thử nghiệm.

VIII. THỬ NGHIỆM TÁC DỤNG TRÊN HÀM LƯỢNG SORBITOL *(Aida và cộng sự, 1990)*

8.1. Thử nghiệm tác dụng trên hàm lượng sorbitol ở hồng cầu người *in vitro*

Xác định tác dụng của thuốc thử nghiệm trên sự tích lũy của sorbitol trong hồng cầu người *in vitro*. Hồng cầu lấy từ người khoẻ mạnh được ủ trong 60 phút trong dung dịch đệm bicarbonat Krebs – Ringer (pH 7,4), chứa 28 mM glucose với hoặc không có các nồng độ khác nhau của thuốc thử nghiệm. Sau khi ủ, các hồng cầu được rửa nhanh với nước muối đẳng trương lạnh, được xử lý với acid perchloric 6% lạnh và sau đó được ly tâm để khử protein.

Trung hoà phân dịch nổi bên trên và xác định hàm lượng sorbitol bằng phương pháp enzym dùng sorbitol dehydrogenase.

8.2. Thử nghiệm tác dụng trên hàm lượng sorbitol ở chuột đái tháo đường

Chuột cống trắng Wistar đực được gây đái tháo đường bằng tiêm màng bụng một liều streptozotocin (80 mg/kg) trong dung dịch đệm natri citrat (pH 4,5). Chuột đối chứng chỉ được tiêm dung dịch đệm. Chuột được cho thức ăn chuẩn và nước uống tùy thích trong suốt thời gian thí nghiệm. Hai tuần sau khi gây đái tháo đường, chuột được bắt đầu cho uống thuốc thử nghiệm (lô chuột thử thuốc), hoặc chỉ cho uống dung môi (lô đối chứng) mỗi ngày 2 lần trong 2 tuần. Thuốc được hoà tan trong nước muối đẳng trương, hoặc nếu là chất không hoà tan thì pha thành dịch treo trong nước muối đẳng trương chứa 0,5% carboxymethyl cellulose. Gây mê bằng ether và giết chuột. Xác định hàm lượng của sorbitol trong hồng cầu, dây thần kinh hông và thủy tinh thể của chuột bằng phương pháp enzym.

CHƯƠNG 18

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ
THUỐC CÓ TÁC DỤNG NỘI TIẾT SINH DỤC***GS. Đoàn Thị Nhu***I. NGHIÊN CỨU THUỐC CÓ TÁC DỤNG ESTROGEN**

Một công dụng chính của các thuốc estrogen là dùng làm thuốc tránh thụ thai uống. Lý do căn bản đối với các chế phẩm này là lượng estrogen ngoại sinh quá mức ức chế sự tiết hormon kích nang trứng (FSH) và do vậy ngăn cản sự rụng trứng. Các công dụng khác là trong điều trị vô sinh, các rối loạn thời kỳ mãn kinh, các rối loạn kinh nguyệt và một số thể ung thư tuyến tiền liệt và ung thư vú. Estrogen cũng có tác dụng trong một số trường hợp loãng xương. Việc sử dụng các thuốc estrogen phải hết sức thận trọng vì thuốc này làm tăng nguy cơ mắc ung thư nội mạc tử cung và ung thư vú nếu dùng liều cao và trong thời gian kéo dài.

CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**1.1. Các phương pháp chung**

Chuột cống hoặc chuột nhắt trắng từ một nguồn đáng tin cậy thường được dùng để nghiên cứu hoạt tính estrogen. Dùng các động vật non, chưa trưởng thành hoặc bị cắt bỏ buồng trứng. Động vật được nuôi trong các điều kiện môi trường được kiểm soát. Các chế phẩm thử phải mới, dưới dạng dung dịch hoặc dịch treo trong một chất dẫn thích hợp, ví dụ, dầu thực vật. Có thể tiêm thuốc thử trong màng bụng, dưới da hoặc trong cơ, hoặc cho uống cùng với thức ăn, hoặc qua ống thông. Đường cho thuốc phụ thuộc vào loại thử nghiệm thực hiện. Việc điều trị cho động vật đối chứng trong mọi thử nghiệm luôn phải theo sát phương pháp áp dụng cho động vật thử thuốc.

Vì các lượng nhỏ estrogen có thể dẫn đến các đáp ứng rõ rệt, điều thiết yếu là tránh sự ô nhiễm qua thiết bị dùng, các chuồng và thức ăn cung ứng. Trong thiết kế nghiên cứu phải có một nhóm động vật chỉ được cho dầu thực vật. Vẽ đường cong logarit liều - đáp ứng của estradiol với mỗi thí nghiệm.

Có sự thay đổi đáng kể trong đáp ứng với hormon này tùy thuộc vào điều kiện của động vật, mùa trong năm, và nhiều yếu tố khác. Do đó, phải luôn so sánh các thuốc thử nghiệm với estradiol, là một phần của thiết kế thử nghiệm.

Cắt bỏ buồng trứng

Thực hiện phẫu thuật này tốt nhất trên các động vật chưa trưởng thành trước khi chất mỡ tích trữ làm cho sự xác định vị trí của buồng trứng trở nên khó khăn. Gây mê nhẹ động vật với ether, và duy trì sự gây mê bằng một miếng bông tẩm ether đặt trong một cốc vại có mỏ nhỏ gần mũi con vật, đặt ở vị trí cho phép nó thở hỗn hợp ether và không khí. Thực hiện một đường rạch nhỏ ở phía lưng trên một bên của cột sống ngay trên chậu hông ở chuột cống trắng; ở chuột nhắt trắng, thực hiện một đường rạch duy nhất ngang qua đường giữa của lưng. Trước hết, nên xác định vị trí của các buồng trứng bằng cách xem xét một động vật chết, sau đó, khi cán bộ nghiên cứu đã quen với sự xác định vị trí của các buồng trứng, sẽ tiến hành phẫu thuật trên động vật sống. Có thể nhìn thấy các buồng trứng là các thể nhỏ màu hồng trên một lớp mỡ hơi trắng nằm ngay dưới thành phía lưng của cơ thể. Để cắt bỏ các buồng trứng, thực hiện một lỗ chọc nhỏ với một cái kẹp nhọn, nhỏ ở thành của cơ thể ngay trên buồng trứng; kéo buồng trứng và lớp mỡ qua lỗ chọc, mà không làm vỡ buồng trứng.

Sau đó kẹp ống dẫn trứng ngay dưới buồng trứng với một cái kẹp trong trường hợp chuột nhắt trắng, hoặc thắt lại trong trường hợp chuột cống trắng. Bây giờ có thể cho lại ống dẫn trứng vào trong khoang cơ thể, và đóng đường rạch da với một kẹp khâu. Ở chuột cống trắng, có thể phải đóng thành cơ thể với một đường khâu bằng chỉ bông. Lau diện tích mổ với cồn, và động vật được giữ ấm cho tới khi hết tác dụng thuốc mê. Sau một ít thời gian luyện tập, có thể thực hiện phẫu thuật rất nhanh chóng với sự hồi phục thành công của con vật. Trong 5 ngày, thực hiện các kính phết âm đạo để kiểm tra các buồng trứng có được cắt bỏ hoàn toàn hay không. Loại bỏ các động vật có các kính phết động dục trong 3 ngày cuối (trong 5 ngày) khỏi thí nghiệm. Sau một liều estrogen mỗi (2 μ g trong dầu), thực hiện các kính phết để xác minh khả năng đáp ứng của động vật. Các động vật không cho các kính phết động dục, nghĩa là không đáp ứng, sẽ bị loại bỏ.

1.2. Các thử nghiệm về hiệu lực *in vivo*

1.2.1. Thử nghiệm về hút thu nước

Thử nghiệm này được mô tả đầu tiên bởi Astwood (1938), và dựa trên nhận xét là tử cung đáp ứng với estrogen bằng sự tăng hút thu và giữ nước. Mức hút thu tối đa ở 6 giờ sau khi cho estrogen.

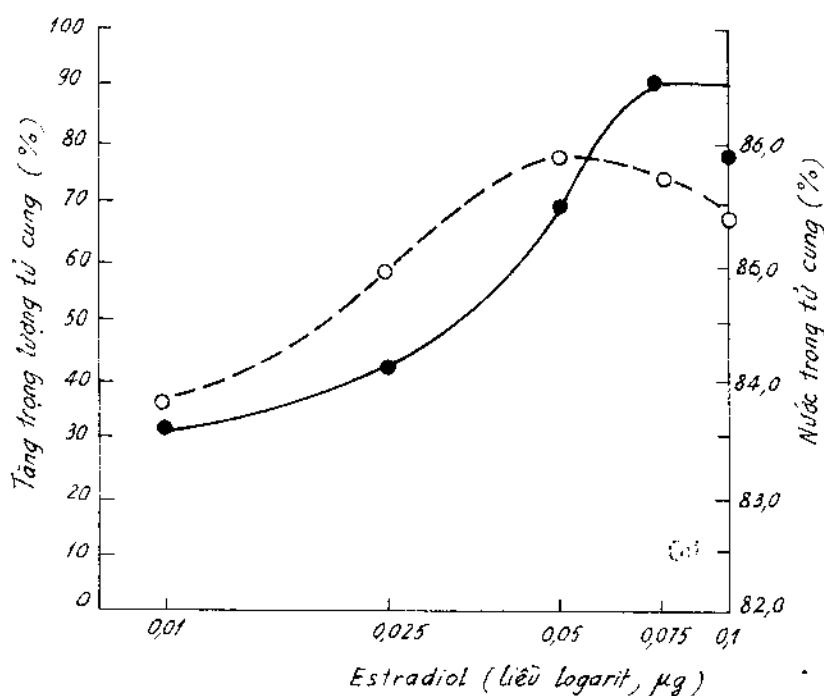
Phương pháp được tiến hành như sau:

- Có thể dùng các động vật cắt bỏ buồng trứng. Vì thử nghiệm này dùng đáp ứng là sự tăng trọng lượng tử cung, tử cung phải còn nguyên vẹn trong khi cắt bỏ buồng trứng. Sẽ đơn giản hơn khi dùng chuột nhắt trắng non 18 ngày tuổi hoặc chuột cống trắng 22 ngày tuổi nhận được 2 ngày trước khi bắt đầu thí nghiệm.

- Chia động vật thành nhóm một cách ngẫu nhiên. Nhóm đối chứng được tiêm dưới da 0,1 ml dầu thực vật. Nhóm đối chứng estrogen được tiêm một loạt liều (0,01 - 0,1 μ g) để xác lập đường cong liều-đáp ứng. Trong thí nghiệm đầu tiên, tiêm thuốc thử cho các nhóm chuột với một liều cao và một liều thấp. Trong các thí nghiệm tiếp sau, tiêm một loạt liều để có đường cong liều - đáp ứng. Tiêm tất cả các liều trong 0,1 ml dầu thực vật.

- Năm giờ sau khi tiêm thuốc, giết động vật bằng cách cắt cổ và cắt lấy tử cung một cách nhanh chóng. Bắt đầu phẫu thuật bằng một đường rạch qua da bụng và qua thành cơ thể. Kẹp tử cung lên với cái kẹp và cắt đứt khỏi âm đạo. Tách các sừng tử cung khỏi các mô nối kết và sau đó cắt ở chỗ thắt lại gần buồng trứng (đi nhiên không trông thấy buồng trứng ở động vật cắt bỏ buồng trứng). Giữ ẩm tử cung bằng cách đặt trên giấy lọc ẩm (không ướt) và phủ giấy lọc ẩm lên trên. Sau đó cân nhanh với sai số 0,1 mg. Sấy tử cung trong tủ sấy ở 100°C trong 24 giờ và cân lại. Có thể tính tỷ lệ phần trăm tăng hút thu nước so với đối chứng, và có thể so sánh với các trị số của các nhóm khác. Vẽ đồ thị của logarit liều đối với đáp ứng, có thể xác định liều cần thiết để cho sự tăng 50% hút thu nước, liều ED_{50} , để so sánh hiệu lực của thuốc thử với estradiol (hình vẽ).

Lập lại thử nghiệm với các khoảng cách thời gian khác ngoài 6 giờ, cụ thể là 2, 4, 8 và 19 giờ sau khi tiêm thuốc thử để xác định đỉnh của hoạt tính. Đối với estradiol, đỉnh của hoạt tính là ở 6 giờ, nhưng nó có thể sớm hơn hoặc muộn hơn với một thuốc thử nghiệm.



Thử nghiệm estrogen 6 giờ (chuột nhắt trắng):

Đường đứt quãng với các vòng tròn trắng: nước trong tử cung (%).

Đường liên tục với các vòng tròn đen: tăng trọng lượng tử cung (%).

1.2.2. Thử nghiệm trọng lượng tử cung bốn ngày

Thử nghiệm này dựa trên nhận xét là estrogen gây tăng tổng hợp protein và như vậy làm tăng trọng lượng tử cung. Định tác dụng được nhận xét thấy trong vòng 40 giờ. Phương pháp như sau:

Có thể dùng chuột nhắt hoặc chuột cống trắng chưa trưởng thành hoặc cắt bỏ buồng trứng. Tiêm bắp thuốc thử trong dầu thực vật, trong 3 ngày liên. Vào ngày thứ tư, giết động vật bằng cắt cổ, cắt lấy tử cung nhanh chóng, và nhẹ nhàng bóp chất chứa bên trong ra (kết quả không đáng tin cậy nếu không loại bỏ chất chứa trong tử cung). Cân ngay tử cung ở trạng thái ướt. Có thể làm tử cung mất nước bằng sấy trong một tủ sấy ở 100°C trong 24 giờ và cân lại để có sự tăng trọng lượng khô. Vẽ đồ thị logarit liều đối với trọng lượng ướt cho một đường cong hình xích ma, và có thể xác định ED_{50} bằng so sánh thuốc thử với estradiol.

1.2.3 Mở âm đạo

Có thể nhận xét chuột nhắt trắng cái bình thường trưởng thành qua các giai đoạn mở âm đạo. Cho động vật cái chưa trưởng thành thuốc thử (chuột nhắt trắng

18 ngày tuổi, chuột cống trắng 21 ngày tuổi) và quan sát thời gian mở âm đạo hoàn toàn là dấu hiệu của hoạt tính estrogen. Chỉ nên dùng thử nghiệm này để đánh giá định tính thay vì định lượng hoạt tính của thuốc.

1.2.4. Sự sừng hoá âm đạo

Thử nghiệm này dựa trên sự kiện là chuột cống và chuột nhắt trắng thể hiện sự rụng trứng chu kỳ với các thay đổi kết hợp ở tế bào âm đạo (Greenblatt, 1966). Có thể quan sát thấy tác dụng của các thay đổi định lượng trong sự tiết các hormon trên âm đạo bằng cách thực hiện một loạt kính phết âm đạo và quan sát các kính này về tế bào sừng hoá, bạch cầu và tế bào biểu mô. Ở động vật bình thường, có thể quan sát các thay đổi này bằng cách làm kính phết âm đạo mỗi ngày 2 lần trong thời gian 4 ngày và so sánh các kính phết để xác định khi nào xảy ra động dục. Khi đã quen với các thay đổi bình thường ở tế bào âm đạo, có thể xây dựng một thiết kế thí nghiệm để thử hiệu lực của các thuốc thử khác nhau.

Phương pháp làm kính phết âm đạo như sau:

Cầm động vật bụng lên trên, dùng ống hút nhỏ một giọt nước vào âm đạo. Cần thận trọng để đảm bảo là âm đạo không bị tổn thương, vì tổn thương có thể dẫn đến các kính phết dương tính sai được ghi. Giọt nước được hút và nhỏ lại nhiều lần, sau đó được hút ra và chuyển sang bản kính của kính hiển vi và để khô. Đánh dấu mỗi bản kính để nhận dạng các kính phết khác nhau. Cố định các kính phết bằng cách đặt bản kính trong cồn tuyệt đối trong 5 giây, để khô, và nhuộm với dung dịch nước xanh methylen 5% trong 10 phút. Rửa thuốc nhuộm thừa với nước máy, làm khô bản kính và quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại thấp.

Một kính phết động dục dương tính là một kính phết trong đó chỉ thấy có các tế bào lớn, không đều, sừng hóa, cho thấy sự tăng trưởng tối đa của niêm mạc âm đạo. Một kính phết sau động dục có nhiều tế bào sừng, nhưng cũng có một số bạch cầu và tế bào biểu mô, cho thấy giai đoạn sau rụng trứng và sự tróc vảy niêm mạc âm đạo. Một kính phết không động dục có một ít tế bào biểu mô, dịch nhầy, và một ít bạch cầu, cho thấy một tử cung yên tĩnh và biểu mô âm đạo ở trạng thái nghỉ. Một kính phết trước động dục có nhiều tế bào biểu mô với bào tương có hạt, cho thấy sự tăng trưởng nhanh của biểu mô âm đạo và giai đoạn trước rụng trứng (Yochim và McCarthy, 1964).

Thử nghiệm này là một phương pháp nghiên cứu tốt về tác dụng estrogen. Không cần giết động vật và có thể dùng lại. Tuy vậy, một số thuốc có thể biểu lộ các tác dụng kéo dài, nên cần quan sát kỹ và lưu ý các thay đổi ở động vật trong khi thí nghiệm (như động dục kéo dài, phù, rụng lông, hoạt động giao phối, các thay đổi về âm đạo).

II. NGHIÊN CỨU THUỐC CÓ TÁC DỤNG KIỂU PROGESTERON (PROGESTOGEN)

Các công dụng điều trị chính của các thuốc có tác dụng kiểu progesteron phụ thuộc vào các tác dụng sinh lý trên tử cung. Các thuốc này được dùng điều trị động thai do rau thai không bắt đầu tiết progesteron ở tuần thứ 12 của thời kỳ mang thai, điều trị chảy máu tử cung cơ năng do thiếu progesteron, và được dùng nhiều hơn trong các thuốc ngừa thai. Liều lớn thuốc này ức chế sự rụng trứng qua tác dụng ức chế sự giải phóng hormon tạo hoàng thể (LH).

Các phương pháp nghiên cứu

Các thông số dùng để xác định hoạt tính kiểu progesteron của thuốc dựa trên (a) các thay đổi hình thái học và hoá sinh gây bởi tác dụng trực tiếp trên màng trong tử cung của thỏ hoặc loài vật gặm nhấm; (b) các tác dụng trên sự rụng trứng ở thỏ hoặc chuột cống trắng gây gián tiếp qua tác dụng trên tuyến yên; (c) tác dụng đối với sự tạo thành hoàng thể trong buồng trứng; và (d) các tác dụng trên sự làm tổ và sự duy trì thai nghén ở chuột hamster, thỏ, hoặc loài vật gặm nhấm.

2.1. Các thử nghiệm trên màng trong tử cung

2.1.1. Phương pháp Clauberg - Mc Phail

Phương pháp bán định lượng này dựa trên sự đánh giá mức độ phát triển của các tuyến ở màng trong tử cung ở thỏ được gây cảm ứng bởi estrogen và được điều trị với một progestin. Thỏ cái chưa trưởng thành (800 - 1000 g) được để trong các chuồng cá nhân và tiêm dưới da 0,5 ml dung dịch 17β -estradiol hoà tan trong dầu vừng (0,5 $\mu\text{g/ml}$) hàng ngày trong 6 ngày. Hàng ngày trong 5 ngày tiếp sau, tiêm dưới da 0,5 ml dung dịch thuốc thử hoà tan trong dầu vừng. Hai mươi bốn giờ sau liều cuối cùng, giết thỏ và cắt lấy các sừng tử cung, cân tối sai số 0,1 mg, và chuẩn bị để xét nghiệm mô học. Hai đoạn từ phần giữa của mỗi sừng được cố định trong ethanol 80% trong 24 giờ và được bao sáp ong hoặc cố định trong dung dịch formalin 5% trong 24 giờ, và các đoạn đóng băng được cắt. Nhuộm các đoạn với hematoxylin Ehrlich và eosin và chấm điểm từ 0 đến 4+, tùy thuộc vào mức độ tạo thành mô tuyến (Mc Phail, 1934).

Các động vật đối chứng dương tính được tiêm progesteron ở một liều cao và một liều thấp bao giờ cũng phải có. Lựa chọn các liều sao cho đạt các đáp ứng trung bình ở mức 3+ và 1+, tương ứng. Tổng liều dùng thích hợp là 0,5 và 0,2 mg progesteron. Mỗi nhóm thỏ gồm 5 - 6 con. Phương pháp này cho một trị số ước đoán về hiệu lực tương đối so với progesteron, chỉ là một trị số gần đúng.

2.1.2. Phương pháp Mc Ginty

Mc Ginty và cộng sự (1939) sửa đổi phương pháp Claulberg – Mc Phail để xác định hoạt tính kiểu progesteron của các chất áp dụng tại chỗ vào bề mặt màng trong tử cung. Gây cảm ứng cho thỏ với estrogen, và 24 giờ sau liều cuối cùng, gây mê thỏ với ether và rạch một đường ở da ở vùng bụng phải dưới sau khi xén lông. Rạch một đường dài 2,5 cm nửa chừng giữa đường giữa và phía bên phải được bộc lộ của thành cơ thể, khoảng 2,5 cm từ đầu chậu hông của màng bụng. Xác định vị trí của sừng tử cung phải dưới đường rạch. Đẩy nhẹ nhàng phần giữa của sừng tử cung ra, và đặt một dây buộc bằng sợi bông chung quanh phần trước của sừng bằng cách đưa vào một kim nhọn thẳng có xâu chỉ giữa các mạch máu chủ yếu trong mạc treo ruột và thành cơ tử cung. Phương pháp này đảm bảo các mạch máu vẫn mở. Một vòng chỉ thứ hai được chuẩn bị, nhưng không buộc lại, khoảng 3,8 cm sau dây buộc thứ nhất. Thuốc thử, hoà tan trong 0,1 ml dầu vừng, được tiêm vào lòng ống của tử cung bằng cách đưa kim số 26 vào qua thành tử cung sau dây buộc thứ hai. Buộc dây này lại khi đã tiêm xong và đã rút kim ra. Đặt lại tử cung trong khoang phúc mạc, và đóng các đường rạch ở thành cơ thể và ở da bằng các đường khâu bằng chỉ bông. Ba ngày sau, giết thỏ, và chuẩn bị các đoạn của sừng tử cung giữa hai dây buộc để làm xét nghiệm mô học. Có thể tiêm dầu vừng vào sừng tử cung thứ hai để làm đối chứng.

Kỹ thuật này cần sự tham gia của 2 người. Điều quan trọng là dung dịch thuốc thử nghiệm không rò ra ngoài hoặc không đi qua dưới dây buộc thứ hai. Có thể phòng ngừa điều này nếu một người bóp nhẹ nhàng tử cung với ngón tay trở và ngón tay cái đặt ngay dưới dây buộc lỏng thứ hai, giữ chặt kim trong khi tiêm. Cách làm này cũng ngăn ngừa sự di chuyển kim trong lòng ống tử cung, điều này quan trọng vì sự tổn thương cơ học đối với niêm mạc bởi mũi kim dẫn đến các kết quả dương tính sai. Cần phải đo chính xác thể tích dung dịch tiêm. Nên dùng một bơm tiêm trác vi. Một đáp ứng dương tính sai ở sừng tử cung tiêm dầu có thể do chấn thương trong khi tiêm và không có ý nghĩa đối với đáp ứng của sừng tử cung tiêm thuốc thử nghiệm.

Thử nghiệm này rất nhạy cảm. Progesteron gây một đáp ứng ở các liều thấp 0,2 μg .

2.1.3. Hoạt độ của carbonic anhydrase màng trong tử cung

Sau sự nhận xét của Lutwak-Mann (1955) là mức của carbonic anhydrase trong màng trong tử cung phụ thuộc vào hoạt động chức năng của hoàng thể, mối quan hệ định lượng giữa hoạt độ của enzym và liều progesteron dùng cho một thỏ được gây cảm ứng với estrogen đã được mô tả, và một phương pháp thử nghiệm sinh học progesteron đã được gợi ý (Pincus và cộng sự; Ogawa và Pincus, 1961).

Trong phương pháp này, thỏ được gây cảm ứng với estrogen và tiêm hàng ngày trong 5 ngày progesteron hoặc một progestogen bị giết bằng cất cổ và làm chảy máu bằng cắt một động mạch cảnh. Cô lập tử cung, mở tử cung bằng một đường cắt dọc, rửa bằng nước muối đẳng trương lạnh và sau đó thấm bằng giấy thấm đến khô. Cạo màng trong tử cung lên trên một miếng giấy sáp đã được cân bì bằng một cái bay cùn. Xác định trọng lượng mô màng trong tử cung, và chuyển một lượng mô vào trong máy làm đông thể bằng thủy tinh được làm mát. Sau khi làm đông thể mô với 10 lần thể tích nước cất, dịch đông thể được ly tâm ở 2000 x g trong 15 phút ở 4°C trong một máy ly tâm lạnh. Ghi tổng thể tích, và dùng dịch nổi lên trên để xác định hoạt độ enzym. Có thể bảo quản dịch nổi lên trên ở 4°C trong thời gian tối đa 7 ngày mà không mất hoạt tính của enzym.

Để xác định hoạt độ của enzym, có thể dùng phương pháp đo màu của Miyake và Pincus (1958), hoặc phương pháp áp kế của Ogawa và Pincus (1960). Phương pháp áp kế nhạy hơn phương pháp đo màu. Với phương pháp áp kế, tổng liều progesteron 0,125 mg cho đáp ứng lớn hơn có ý nghĩa so với trị số đối chứng.

Trọng lượng màng trong tử cung cho thấy mối quan hệ liều - đáp ứng tuyến tính có ý nghĩa từ 0,25 đến 4,0 mg progesteron. Tuy vậy các thay đổi cá thể của đáp ứng trong một nhóm điều trị ngăn cản việc dùng thông số này làm thử nghiệm định lượng progesteron và các progestogen.

2.1.4. Sự hình thành u màng rụng

Màng trong tử cung của loài vật gặm nhấm được gây cảm ứng với estrogen và điều trị với progesteron đáp ứng với chấn thương cục bộ bằng sự tăng phân chia tế bào và sự hình thành thành phần thuộc mẹ của rau thai là u màng rụng. Cách tiến hành được Astwood (1939) mô tả đầu tiên và được một số tác giả khác sửa đổi.

Chuột cống trắng cái trưởng thành (150 - 200 g) được lựa chọn sau khi đã hoàn thành hai chu kỳ động dục bình thường. Dùng kỹ thuật kính phết âm đạo để xác định điều này. Chuột cống trắng đang động dục (không có bạch cầu ở kính phết âm đạo) được làm cho bắt đầu một giai đoạn có thai giả bằng cách kích thích điện cổ tử cung. Một điện cực cùn cạnh được đưa vào trong âm đạo, và một điện cực kim được cắm dưới da tới cột sống vùng thắt lưng. Cho dòng điện điện ứng đi qua trong 5 giây, và lặp lại cách làm này 1 giờ sau. Bốn ngày sau, cắt bỏ buồng trứng của chuột, gây chấn thương một sừng tử cung bằng cách đưa một kim cỡ 27 vào trong đầu vòi của một sừng tử cung, đưa kim dọc theo sừng tử cung tới cổ tử cung, và sau đó rút kim ra ở một góc sao cho màng trong tử cung bị xước dọc theo bên đối diện với áo cơ tử cung. Tiêm progesteron dưới da hàng ngày trong 3 ngày. Giết chuột 24 giờ sau mũi tiêm cuối cùng, và phân lập mỗi sừng tử cung. Đo đường kính của mỗi sừng tử

cung (Velardo và Hisaw, 1951), hoặc xác định trọng lượng của mỗi sừng (Greenwald, 1961). Tỷ lệ % tăng trọng lượng của sừng bị chấn thương so với sừng không bị chấn thương được tính và vẽ đồ thị đối với liều của progesteron. Sự xác định trọng lượng thuận tiện và chính xác hơn là đo đường kính của mỗi sừng tử cung.

Kỹ thuật này phụ thuộc vào sự sản sinh nội sinh estrogen và progesteron trước khi cắt bỏ buồng trứng. Có thể chuẩn hoá kỹ thuật một cách chính xác hơn bằng cách dùng chuột cắt bỏ buồng trứng và gây động dục bằng các mũi tiêm 17β -estradiol (1 μ g mỗi ngày trong 4 ngày, tiêm dưới da). Sau đó tiêm progesteron hàng ngày trong 9 ngày. Ở ngày thứ năm của đợt điều trị với progesteron, gây chấn thương một sừng tử cung. Có thể tiêm trong lòng ống histanin dihydroclorid (1 mg trong 0,005 ml nước muối đẳng trương) thay vì gây chấn thương sừng tử cung (Zarrow và cộng sự, 1958).

Thử nghiệm này có công dụng hạn chế đối với progesteron vì độ nhạy cảm yếu với progesteron. Tuy vậy, nó có thể có giá trị trong nghiên cứu các thuốc có thể tác động đối với sự phát triển của rau thai, có thể do có ảnh hưởng trên tác dụng của progesteron.

2.2. Các thử nghiệm về tác dụng trên sự rụng trứng

Progesteron được biết là có một tác dụng hai pha trên sự rụng trứng, trung gian bởi các tác dụng kích thích hoặc ức chế trên sự sản sinh và giải phóng các hormon hướng sinh dục của tuyến yên. Do đó, sự định thời gian tiêm progesteron liên quan với thời gian dự tính rụng trứng rất quan trọng. Như vậy progesteron được tiêm ở dưới 4 giờ trước thời gian rụng trứng ở thỏ làm dễ dàng sự rụng trứng. Ngược lại, sự rụng trứng bị ức chế bởi progesteron tiêm ở 4 giờ hoặc hơn trước thời gian dự tính rụng trứng (Saweyer, 1952).

2.2.1. Tác dụng làm dễ dàng rụng trứng

McCormack và Meyer (1963) mô tả kỹ thuật dùng chuột cống trắng cái chưa trưởng thành 22 ngày tuổi được nuôi ở một chu kỳ chiếu sáng hằng định gồm 14 giờ sáng và 10 giờ tối (nghĩa là chiếu sáng từ 6 giờ sáng đến 8 giờ tối). Tiêm dưới da cho chuột 15 đơn vị quốc tế gonadotropin huyết thanh ngựa cái có thai trong 0,5 ml nước muối đẳng trương giữa 7 và 8 giờ sáng. Hai ngày sau, tiêm dưới da progesteron giữa 9 và 10 giờ sáng. Vào ngày sau, giết chuột giữa 8 giờ sáng và 1 giờ chiều, và phẫu tích các ống dẫn trứng và xác định số lượng trứng. Hoặc có thể chọn lựa cách đếm số lượng các điểm rụng trứng trên buồng trứng bằng một kính hiển vi hai thị kính. Tuy vậy, khả năng sai của kỹ thuật sau lớn hơn do đó không được khuyến dùng.

Các liều thấp progesteron 0,01 mg cho một chuột cống trắng gây tác dụng khác biệt có ý nghĩa so với các trị số đối chứng.

2.2.2. Tác dụng ức chế sự rụng trứng (Shipley, 1965)

Thỏ rụng trứng trong vòng vài giờ sau sự ghép đôi, sau sự kích thích cơ học âm đạo hoặc sau một mũi tiêm tĩnh mạch đồng acetat (0,3 mg/kg, dùng đồng acetat 1% trong dung dịch muối 0,9%). Progesteron tiêm 24 giờ trước khi thực hiện việc gây sẽ dự phòng sự rụng trứng. Các thỏ cái trưởng thành về sinh dục, cân nặng 3 – 4 kg, được điều trị với một progestogen, và 24 giờ sau, thực hiện kích thích gây rụng trứng. Giết thỏ và xem xét buồng trứng 18 – 24 giờ sau. Ghi tổng số các điểm rụng trứng trên cả hai buồng trứng đối với mỗi thỏ.

Dữ liệu duy nhất có liên quan thu được trong thử nghiệm này là số lượng thỏ không rụng trứng trong một nhóm điều trị, có thể dùng trong xác định hiệu lực tránh thai của các progestogen. Để có các dữ liệu định lượng đáng tin cậy, cần dùng 8 – 10 thỏ cho mỗi mức liều.

2.2.3. Thử nghiệm tác dụng trên sự hình thành hoàng thể

Caligaris và cộng sự (1968) đã mô tả tác dụng hai giai đoạn của progesteron trên sự giải phóng hormon tạo hoàng thể (LH). LH cần thiết cho sự rụng trứng và để biến đổi nang trứng thành hoàng thể. Tác dụng ức chế của progesteron trên sự hình thành hoàng thể là hậu quả của sự ức chế giải phóng LH. Progesteron dùng riêng hoặc phối hợp với một estrogen không ức chế sự rụng trứng và sự hoàng thể hoá do tác dụng trực tiếp trên buồng trứng vì các sự kiện này tiếp diễn bình thường với sự hiện diện của một estrogen, progesteron, hormon kích nang trứng (FSH) và LH dùng đồng thời cho các chuột cống trắng cắt bỏ tuyến yên.

Shipley (1962, 1965) đã gợi ý sự cần thiết tiêu chuẩn hoá thử nghiệm này bằng cách chọn một giống chuột cống trắng thích hợp và xác định tuổi hoặc trọng lượng thích hợp của chuột cho một đáp ứng thích hợp và kiên định với progesteron. Shipley dùng chuột cống trắng cái 35 - 37 ngày tuổi (95 – 110g). Tiêm dưới da cho chuột progesteron hoặc một thuốc thử hàng ngày trong 7 ngày. Giết chuột 24 giờ sau mũi tiêm cuối cùng. Cân các buồng trứng, và ghi số lượng hoàng thể. Tính số lượng hoàng thể trung bình cho nhóm điều trị và vẽ đồ thị tỷ lệ phần trăm ức chế so với trị số đối chứng đối với liều.

2.2.4. Sự làm tổ của trứng và sự duy trì thai ghén

Cả estrogen và progestogen đều thể hiện tác dụng hai giai đoạn trên sự làm tổ của trứng đã thụ tinh và trên sự duy trì thai nghén ở động vật phòng thí nghiệm.

Các liều nhỏ estrogen (10 – 20 µg estron/kg) gây sự tổng nhanh trứng ra khỏi ống dẫn trứng của chuột. Các liều nhỏ progesteron dùng riêng làm chậm sự làm tổ của trứng ở chuột, và các liều trung bình và cao cần thiết để duy trì thai nghén. Ngoài ra, sự duy trì thai nghén ở chuột cống trắng bởi nhiều progestogen cần sự hiện diện của một estrogen.

Một số phương pháp thử nghiệm đã được mô tả. Tất cả các phương pháp này có liên quan với việc xác định sự ghép đôi thành công thường bằng quan sát tinh trùng trong kính phết âm đạo. Thực hiện cắt bỏ buồng trứng với việc gây mê nhẹ bằng ether không muộn hơn ở giữa thời kỳ mang thai. Thai nghén được để tiếp tục dưới ảnh hưởng của progestogen cho uống hoặc tiêm. Ngay trước kỳ hạn sinh, giết động vật và xem xét tử cung để xác định số lượng các chuột con sống và số lượng các vị trí làm tổ. Có thể biểu thị kết quả một cách định lượng, nghĩa là bằng tỷ lệ phần trăm của động vật được điều trị có con đẻ ra sống, không kể đến số lượng các bào thai hiện có đến hạn, hoặc tốt hơn là có thể xác định hiệu quả của thuốc bằng số lượng các con đẻ ra sống cho mỗi thai nghén thành công và số lượng các vị trí làm tổ. Có thể tính hiệu quả của một thuốc thử nghiệm cho mỗi nhóm động vật điều trị theo công thức sau:

$$\text{Chỉ số hiệu quả} = \frac{\text{Số lượng chuột con sống}}{\text{Số lượng chuột mẹ} \times 11} \times 100$$

Con số 11 ở mẫu số dựa trên số lượng trung bình các vị trí làm tổ nhận xét thấy ở một nhóm 70 chuột cống trắng không điều trị đến hạn sinh. Nên có nhóm chuột mô hình đối chứng và nhóm chuột phẫu thuật giả đối chứng.

Thỏ

Cắt bỏ buồng trứng thỏ vào ngày thứ 12 sau khi ghép đôi và cho các liều thuốc thử nghiệm hàng ngày cho đến ngày 30, khi đó giết thỏ và xem xét tử cung. Liều tối thiểu mỗi ngày có hiệu quả của progesteron là 1 miligam. Kỹ thuật này cần sự cho thuốc hàng ngày trong 20 ngày. Có thể rút ngắn thời gian thí nghiệm đặc biệt nếu thuốc thử nghiệm không có tác dụng, bằng cách xem xét tình trạng các bào thai trong khi mở bụng vào ngày 20.

Chuột cống trắng

Chuột cống trắng có thai bị cắt bỏ buồng trứng vào ngày 8 và bị giết vào ngày 18 (Saunders và Elton, 1959). Liều có hiệu quả đối với progesteron là giữa 5 và 10 mg/ngày. Tuy nhiên, tác dụng của progesteron được tăng lên bởi việc dùng đồng thời estrogen. Như vậy, để làm tăng độ nhạy của thử nghiệm, nên dùng một estrogen trong thời gian điều trị với progestogen.

Chuột nhắt trắng

Chuột nhắt trắng có thai bị cắt bỏ buồng trứng vào ngày 10 sau khi ghép đôi. Progesteron, tiêm dưới da với liều 1 mg/ngày, sẽ duy trì các thai sống ở 90% chuột được điều trị. Đường cho thuốc, cũng như tần số và thời gian điều trị là quan trọng, và có thể thay đổi đối với các thuốc progestogen khác nhau.

III. NGHIÊN CỨU THUỐC CÓ TÁC DỤNG ANDROGEN

Công dụng điều trị của các thuốc có tác dụng androgen được giới hạn ở (a) liệu pháp thay thế trong các điều kiện sự sản sinh các androgen nội sinh dưới mức sinh lý bình thường và (b) điều trị một số carcinom vú với các mức liều có tác dụng được lý. Trong liệu pháp thay thế, cần có cả hoạt tính androgen và hoạt tính đồng hoá. Hoạt tính androgen gây các tác dụng kích thích trên sự sinh trưởng, phát triển và duy trì các cơ quan sinh dục phụ ở giống đực, và hoạt tính đồng hoá có đặc tính là khả năng làm tăng sinh trưởng, hoặc làm tăng trọng lượng cơ thể bằng cách gây một cân bằng nitơ dương.

CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Các thử nghiệm về hoạt tính androgen

Các thử nghiệm về hoạt tính androgen phụ thuộc vào sự nhạy cảm với androgen của các cơ quan sinh dục phụ thuộc vào loài gặm nhấm đực (tuyến tiền liệt và các túi tinh) và các cấu trúc giới tính phụ của chim và động vật có vú (mào gà trống thiên hoặc gà con, các tuyến bã thay đổi và tuyến lệ lỗi mắt của chuột cống trắng).

3.1.1. Mào gà con

Dùng gà trống vào ngày sau khi nở. Thuốc thử nghiệm có thể được cho uống, tiêm dưới da, tiêm trong mào, hoặc áp dụng tại chỗ. Liệu pháp tiếp tục hàng ngày trong 5 hoặc 7 ngày. Hai mươi tư giờ sau liều cuối cùng, giết gà con bằng ether, cắt lấy mào gà bằng kéo đặt sát sọ. Vẽ đồ thị trọng lượng của mào gà biểu thị bằng mg, hoặc tỷ lệ của trọng lượng mào gà với trọng lượng cơ thể đối với logarit liều. Thử nghiệm này có độ nhạy lớn nhất khi androgen được áp dụng tại chỗ, hoà tan trong ethanol tuyệt đối hoặc ethyl ether. Bằng một bơm tiêm vi lượng, tiêm 0,05 ml dung dịch vào mào gà. Testosteron có hiệu quả trong phạm vi liều 0,1 - 1,0 µg/ngày. Dùng 10 gà con cho mỗi mức liều trong thử nghiệm này. Việc tăng thể tích dung dịch áp dụng đặc biệt với các thuốc tan trong dầu, dẫn đến giảm độ nhạy và một chỉ số chính xác thấp hơn (Lerner và Bianchi, 1963).

3.1.2. Mào gà trống thiên

Gà trống non được thiên ở 6 – 9 tuần tuổi. Sự tăng kích thước mào gà trống thiên chứng tỏ sự thiên không hoàn toàn, và những gà như vậy bị loại bỏ. Sáu tháng sau, chúng có thể được dùng để thử nghiệm sinh học thuốc về hoạt tính androgen dùng tại chỗ, cho uống, hoặc tiêm. Cho thuốc hàng ngày trong 5 ngày, và 24 giờ sau lần cho thuốc cuối cùng, đo chiều dài và chiều cao của mào và so sánh với các trị số thu được ngay trước khi bắt đầu điều trị. Sự tăng trị số của tổng các số đo chiều dài và chiều cao bằng milimet tỷ lệ thuận với logarit liều.

Việc sử dụng thử nghiệm mào gà con tốt hơn thử nghiệm mào gà trống thiên vì không cần phải thiên, không cần phải nuôi gà trong thời gian dài, và độ chính xác trong việc cân lớn hơn độ chính xác trong việc đo bằng com-pa hoặc một cái thước kẻ.

3.1.3. Các cơ quan sinh dục phụ của loài gặm nhấm

Các túi tinh và tuyến tiền liệt bụng của chuột nhắt trắng và chuột cống trắng thiên tăng trọng lượng bởi các chất có tác dụng androgen. Thử nghiệm chuột nhắt trắng nhạy hơn thử nghiệm chuột cống trắng. Tuy vậy, việc phẫu tích và cân mô đích ở chuột nhắt khó hơn so với ở chuột cống trắng.

Trong y văn, có nhiều thay đổi về tuổi ở thời gian thiên, khoảng thời gian giữa lúc thiên và điều trị, và thời gian kéo dài điều trị. Phương pháp thuận tiện và tiết kiệm nhất là dùng các chuột cống trắng đực chưa trưởng thành, 21 – 23 ngày tuổi. Với việc gây mê bằng ether, cắt bỏ tinh hoàn qua một nhất rạch ở đường giữa trong túi bìu sau khi lau với ethanol 70%. Thắt mỗi động mạch tinh hoàn bằng chỉ bông trong khi một người phụ tá nâng tinh hoàn lên, kẹp chặt đầu ngoại biên của tinh hoàn bằng kẹp. Sau khi lấy đi cả hai tinh hoàn, khâu vết rạch với chỉ bông, và lau vùng phẫu thuật với cồn. Không cần các kỹ thuật vô khuẩn.

Tiêm dưới da thuốc thử nghiệm, các liều chuẩn testosterone, và dung môi đối chứng trong ngày thiên. Tiêm lặp lại (0,2 ml) hàng ngày trong 7 ngày. Hai mươi bốn giờ sau liều cuối cùng, giết chuột bằng ether, và phẫu tích lấy tuyến tiền liệt bụng và túi tinh. Ép nhẹ dịch chứa bên trong ra và xác định trọng lượng ướt với sai số 0,1 mg. Cũng có lập cơ năng hậu môn. Tuy vậy, cơ này có độ nhạy cảm kém hơn với androgen so với các mô khác, và sự tăng trọng lượng của cơ năng hậu môn có liên quan nhiều hơn với hoạt tính đồng hoá so với hoạt tính androgen.

Với các thử nghiệm ban đầu, có thể dùng nhóm 6 chuột cống trắng cho mỗi mức liều. Tuy vậy, để các thử nghiệm về hiệu lực chính xác hơn, cần dùng 8 - 10 chuột cho mỗi mức liều. Testosterone gây sự tăng tuyến tính về trọng lượng các túi tinh và tuyến tiền liệt bụng trong phạm vi từ 10 đến 100 μ g cho mỗi chuột mỗi ngày. Sự tăng trọng lượng các túi tinh là một chỉ số về hoạt tính androgen kém nhạy hơn so với sự tăng trọng lượng tuyến tiền liệt bụng.

Ghi các số đo trọng lượng cơ thể ngày đầu điều trị và ngày giết chuột. Các thay đổi về trọng lượng cơ thể không cho thấy hoạt tính androgen (hoặc đồng hoá) nhưng có thể gợi ý về tác dụng độc của thuốc hoặc nhiễm khuẩn. Loại bỏ các dữ liệu từ các cá thể động vật không tăng cân so với nhóm đối chứng.

3.2. Các thử nghiệm về hoạt tính đồng hoá

3.2.1. Cơ nâng hậu môn chuột cống trắng

Cơ này là một phần của các cơ quan sinh dục phụ của chuột đực và không thấy có ở chuột cống trắng cái. Nó khác với các mô đích khác dùng trong các thử nghiệm về androgen ở chỗ nó không phải là một biểu mô. Mặc dù testosterone gây tăng kích thước của cơ này, các cơ cấn của chuột lang, và hệ cơ chi của người, có sự nghi ngờ về giá trị của thử nghiệm cơ nâng hậu môn để tiên đoán hoạt tính đồng hoá ở người. Thực tế là có ít sự tương quan giữa các chất có hoạt tính trong thử nghiệm này với các chất có tác dụng trên người. Phương pháp của Hershberger và cộng sự (1953) là thử nghiệm chuẩn về hoạt tính đồng hoá. Áp dụng cách thức tiến hành mô tả ở mục 3.1.3. Ngoài việc xác định trọng lượng của tuyến tiền liệt bụng và các túi tinh, phẫu tích lấy cơ nâng hậu môn và cân. Cắt da của bìu (dương vật) dọc theo đường giữa từ đáy của dương vật đến hậu môn. Loại bỏ mỡ tích trữ bằng kẹp, và các tuyến Cowper trắng nhỏ được định vị dưới các cơ hoành - hang. Cơ nâng hậu môn nằm sát ngay tuyến Cowper, lồng vào cơ hoành - hang và thắt lại thành vòng ở phía lưng trên trực tràng. Tách cơ bằng phẫu tích với kẹp. Cắt trực tràng và gấp lại về phía trước. Sau khi tách cơ nâng hậu môn khỏi trực tràng, cắt cơ này ở chỗ lồng vào cơ hành - hang.

Tỷ lệ của sự tăng trọng lượng cơ nâng hậu môn và sự tăng trọng lượng tuyến tiền liệt bụng được xác định. Một chất có một tỷ lệ lớn hơn 0,3 có thể là một chất đồng hoá có hoạt tính androgen giảm.

3.2.2. Sự chuyển hoá nitơ

Phương pháp chuyển hoá nitơ mô tả bởi Arnold và cộng sự (1959), giống nhiều hơn với các phương pháp thử nghiệm lâm sàng đối với các thuốc đồng hoá so với phương pháp cân cơ nâng hậu môn. Cho chuột cống trắng một chế độ ăn hạn chế sao cho đạt được trọng lượng cơ thể không đổi. Tổng lượng nitơ trong nước tiểu được xác định trước khi cho một thuốc thử nghiệm, và sự giảm lượng nitơ bài tiết sau khi cho thuốc cho thấy hoạt tính đồng hoá hoặc giữ nitơ. Phương pháp này có tính chất tiên đoán đối với hoạt tính đồng hoá ở người, nhưng không cho thấy hoạt tính androgen có liên quan của thuốc.

CHƯƠNG 19

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ
THUỐC CÓ TÁC DỤNG HƯỚNG SINH DỤC VÀ
THUỐC CÓ TÁC DỤNG ĐIỀU TIẾT SINH SẢN***GS. Đoàn Thị Nhu***I. NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CÓ TÁC DỤNG HƯỚNG SINH DỤC**

Có ba hormon hướng sinh dục nguồn gốc thiên nhiên được dùng làm thuốc chữa bệnh, gồm gonadotropin A (hay hormon kích nang trứng, FSH), và gonadotropin B (hay hormon tạo hoàng thể, LH), 2 chất này có nguồn gốc từ thủy trước tuyến yên; và chất thứ ba là gonadotropin màng đệm có nguồn gốc từ rau thai. Các hormon hướng sinh dục này được dùng để điều trị các chứng chậm dậy thì, rối loạn kinh nguyệt, vô sinh, nhi tính sinh dục nam, tật tinh hoàn ẩn và chứng không có tinh trùng.

CÁC PHƯƠNG PHÁP (Segaloff, 1962)**1.1. Thử nghiệm trên trọng lượng tử cung chuột nhắt và chuột cống trắng**

Thử nghiệm được dùng nhiều nhất là trọng lượng tử cung của chuột nhắt cái chưa trưởng thành. Chuột nhắt trắng mới thôi bú từ một nguồn duy nhất có thể được dùng. Nếu chuột được lấy từ ngoài phòng thí nghiệm thì sẽ không được dùng ngay trong ngày được lấy về. Tổng liều thuốc để tiêm cho mỗi chuột được chứa trong 2,5 ml dung dịch. Chuột được tiêm 5 mũi tiêm dưới da, mỗi mũi tiêm 0,5 ml, một mũi trong ngày đầu, 2 mũi trong ngày thứ hai (một mũi buổi sáng và một mũi cuối buổi chiều) và 2 mũi ngày thứ ba. Giết chuột với một liều chết thuốc gây mê

vào chiều ngày thứ tư. Phẫu tích loại bỏ mỡ và mô không liên quan. Cắt đứt âm đạo ngay dưới cổ tử cung và kẹp nó với một kẹp nhỏ, cắt bỏ các dây chằng và mô khác khỏi tử cung với một kéo nhỏ, bắt đầu ở cổ và phẫu tích tới các buồng trứng. Sau đó cắt đường nối tử cung - vòi và rạch tử cung. Bóp và thấm dịch trong tử cung trên giấy lọc hoặc trên khăn lau bằng giấy. Rồi cân tử cung.

Có thể dùng động vật khác là chuột cống cái chưa trưởng thành. Chuột phải có tuổi giống nhau và từ một nguồn duy nhất. Chuột cống trắng được tiêm những mũi tiêm dưới da hàng ngày trong 4 ngày, giết chuột và phẫu tích tử cung vào ngày thứ năm.

1.2. Thử nghiệm trên trọng lượng tử cung và buồng trứng

Trong thử nghiệm này, chuột nhắt hoặc chuột cống trắng mới thôi bú được dùng để có kết quả tốt nhất. Chuột được chia thành các nhóm điều trị một cách ngẫu nhiên hoá và mỗi nhóm có 6 chuột hoặc hơn.

Thuốc được hoà tan trong dung dịch muối đẳng trương và được chia thành 5 phần để có thể lấy mỗi phần để tiêm trong một lần. Thường tiêm cho chuột một lần trong ngày thứ nhất, 2 lần trong ngày thứ hai và 2 lần trong ngày thứ ba, và giết chuột vào buổi chiều ngày thứ tư. Kiểm tra các chuột để xem âm đạo có thông không. Giết chuột bằng ether và phẫu tích tử cung và các buồng trứng để loại bỏ mô không liên quan. Rạch tử cung và sau khi đã ép và thấm hết dịch trong tử cung thì đem cân tử cung. Phẫu tích cắt bỏ vòi, bao và mỡ khỏi các buồng trứng và cân buồng trứng. Hiệu lực của thuốc thử nghiệm được tính bằng cách so sánh với các thuốc chuẩn.

1.3. Thử nghiệm tác dụng của gonadotropin A (hoặc FSH)

Phương pháp thường được dùng để thử nghiệm tác dụng của gonadotropin A (hoặc hormon kích thích nang trứng, FSH) là xác định sự tăng trọng lượng các buồng trứng; hoặc xác định sự tăng trọng lượng tử cung ở chuột cống trắng cái chưa trưởng thành về sinh dục. Hiệu lực của thuốc thử nghiệm được so sánh với hiệu lực của một thuốc chuẩn để tham chiếu. Thường dùng 2 liều thuốc thử nghiệm và 2 liều thuốc chuẩn đối chiếu sau một thử nghiệm sơ bộ với một mức liều.

1.4. Thử nghiệm tác dụng của gonadotropin B (hoặc LH, hay ICSH)

Một phương pháp thường dùng là xác định sự tăng trọng lượng thùy trước tuyến tiền liệt. Thùy trước tuyến tiền liệt của chuột cống trắng đực cắt bỏ tuyến yên đường như là cơ quan đích tốt nhất để đánh giá tác dụng này. Một vấn đề quan

trọng đối với thử nghiệm này là ở nhiều giống chuột cống, các hormon khác của tuyến yên, đặc biệt prolactin và hormon sinh trưởng có sự hiệp đồng tác dụng với androgen (hormon nam tính) hoặc LH trên tuyến tiền liệt bụng. Độ dài thời gian giữa thời điểm cắt bỏ tuyến yên và lúc bắt đầu điều trị có ảnh hưởng quan trọng trên cả độ nhạy cảm và trên tác dụng của prolactin. Thời gian sau khi cắt bỏ tuyến yên càng dài, thì độ nhạy cảm càng kém và tác dụng của các hormon khác của tuyến yên càng lớn. Người ta thấy dùng động vật 24 giờ sau khi cắt bỏ tuyến yên là tốt nhất.

Như vậy trong phương pháp thử nghiệm này, người ta dùng các chuột cống đực non (khoảng 75 g thể trọng) và tiêm cho chúng mũi tiêm thứ nhất 24 giờ sau khi cắt bỏ tuyến yên. Sau đó tiêm cho chuột 2 lần vào ngày thứ hai và 2 lần vào ngày thứ ba thuốc thử nghiệm, tổng cộng là 5 mũi tiêm, mỗi mũi tiêm 0,5 ml dung dịch trong thời gian 3 ngày. Giết chuột bằng ether vào chiều ngày thứ tư. Tuyến tiền liệt bụng, các túi tinh và tinh hoàn được phẫu tích phân lập và cân. Cũng như trong các thử nghiệm khác, dùng một thuốc chuẩn so sánh đối chiếu với thuốc thử nghiệm và dùng thiết kế thử nghiệm 4 hoặc 6 điểm (2 hoặc 3 liều của thuốc thử nghiệm và của thuốc chuẩn).

II. NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ THUỐC CÓ TÁC DỤNG ĐIỀU TIẾT SINH SẢN

CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CHỐNG SINH SẢN

2.1. Thử nghiệm tác dụng chống sinh sản trên giống cái

2.1.1. Thử nghiệm tác dụng chống rụng trứng (Kamboj, 1984)

- Chuột cống trắng

Dùng chuột cống trắng cái trưởng thành có chu kỳ động dục đều, chia thành các nhóm, mỗi nhóm 6 con. Nhóm thử thuốc được cho uống thuốc thử nghiệm, và nhóm đối chứng chỉ được uống dung môi, mỗi ngày một lần trong 10 ngày. Làm xét nghiệm kính phết âm đạo hàng ngày. Nếu chuột thể hiện giai đoạn không động dục kéo dài, thì điều này chứng tỏ thuốc có tác dụng chống rụng trứng. Nếu chuột thể hiện chu kỳ động dục đều, thì có nghĩa là thuốc không có tác dụng chống rụng trứng.

- Thỏ

Dùng thỏ cái trưởng thành (5 đến 6 tháng tuổi). Cho thỏ uống thuốc thử nghiệm qua ống thông dạ dày hàng ngày trong 7 ngày cho nhóm thỏ thử thuốc và chỉ cho thỏ ở nhóm đối chứng uống dung môi; mỗi nhóm gồm 6 thỏ. Ghép đôi với thỏ

đục vào ngày thứ 8. Thực hiện thủ thuật mở bụng vào ngày thứ 9 và ghi số điểm rụng trứng ở mỗi buồng trứng của thỏ thử thuốc, và so sánh với trị số này ở nhóm thỏ đối chứng.

2.1.2. Thử nghiệm tác dụng chống làm tổ của trứng

- **Chuột cống trắng:** Dùng chuột cái lớn còn trinh (*chưa hề giao phối với chuột đực*), có chu kỳ động dục đều (8 đến 10 tuần tuổi) và chuột cống trắng đực (10 đến 12 tuần tuổi) có khả năng sinh sản được chứng minh. Ghép đôi 2 chuột cống trắng cái với một chuột đực vào buổi chiều. Bỏ chuột đực ra vào sáng hôm sau và thực hiện kính phết âm đạo trên chuột cái. Kính phết được soi ướt hoặc sau khi nhuộm màu dưới kính hiển vi về sự hiện diện của tinh trùng. Ngày thấy có tinh trùng ở kính phết được coi là ngày 1 của thời kỳ thai nghén. Lặp lại cách thức tiến hành này cho tới khi các chuột cái đã được giao phối.

Chia các chuột cái đã được giao phối một cách ngẫu nhiên thành các nhóm thử thuốc và đối chứng, mỗi nhóm 6 - 10 con. Cho uống thuốc thử nghiệm trong một chất dẫn thích hợp (dung dịch nước, dịch treo trong gôm acacia, dịch treo trong Tween 80) trên cơ sở thể trọng hàng ngày qua một kim cho uống từ ngày 1 đến ngày 7 của thời kỳ thai nghén; các chuột đối chứng chỉ uống chất dẫn.

Giết chuột vào ngày thứ 10. Xác định số lượng chuột có thai, số lượng vị trí làm tổ, số lượng thai sống và thai chết và số lượng hoàng thể ở nhóm thử thuốc, và so sánh với các trị số này ở nhóm đối chứng (Kamboj, 1984).

- **Chuột nhắt trắng:** Ghép đôi chuột nhắt trắng cái lớn có chu kỳ động dục đều với chuột đực có khả năng sinh sản được chứng minh. Cho chuột cái đã được giao phối uống thuốc thử nghiệm trong chất dẫn thích hợp từ ngày 1 đến ngày 5 của thai nghén, và cho chuột cái đối chứng uống chất dẫn. Mở bụng chuột cái ở ngày 10 của thai nghén, và ghi tỷ lệ chuột có thai cũng như kích thước và số lượng vị trí làm tổ. Thực hiện phẫu thuật đóng bụng và để thai nghén tiếp tục tiến triển. Vào ngày thứ 20 của thai nghén, phẫu tích mở bụng chuột cái và mở tử cung để lấy thai ra. Ghi số lượng thai sống và thai chết. Cố định các buồng trứng và tử cung chuột cái không có thai trong dung dịch formalin 10% để làm xét nghiệm mô học (Daware và cộng sự, 2000).

2.1.3. Thử nghiệm tác dụng chống sinh sản bằng tiêm thuốc vào tử cung

Áp dụng phương pháp của Upadhyay và cộng sự (1990) với một ít sửa đổi để nghiên cứu tác dụng cục bộ của thuốc chống sinh sản. Dùng chuột nhắt trắng cái có khả năng sinh sản được chứng minh và cân nặng 30 - 40 g. Mở bụng chuột và tiêm thuốc thử nghiệm như sau:

Nhóm 1: tiêm 50 μ l chất dẫn vào cả 2 sừng tử cung. *Nhóm 2:* tiêm 50 μ l chất dẫn vào sừng trái và 50 μ l dung dịch hoặc dịch treo thuốc thử nghiệm vào sừng phải. *Nhóm 3:* tiêm 50 μ l dung dịch hoặc dịch treo thuốc thử nghiệm vào cả 2 sừng tử cung. Phẫu thuật đóng bụng và ghép đôi những chuột cái này với các chuột nhất trắng đực có khả năng sinh sản đã được biết sau thời gian hồi phục 10 ngày sau phẫu thuật. Sự giao phối được xác nhận bởi nút âm đạo hoặc kính phết âm đạo có tinh trùng dương tính. Phẫu tích mở bụng các chuột cái đã giao phối vào ngày thứ 14 của thời kỳ thai nghén. Ghi số lượng chuột cái có thai, độ lớn và số lượng các thai. Các buồng trứng và tử cung được quan sát và được cố định trong dung dịch formalin 10% để làm xét nghiệm mô học.

2.1.4. Thử nghiệm tác dụng gây sẩy thai

- Tác dụng gây sẩy thai sớm (Kamboj, 1984)

Dùng chuột cống trắng cái đã được giao phối với chuột đực và chia một cách ngẫu nhiên thành các nhóm thử thuốc và đối chứng, mỗi nhóm 6 con. Cho chuột ở nhóm thử thuốc và nhóm đối chứng uống thuốc thử nghiệm và chất dẫn, tương ứng, từ ngày 5 đến ngày 7 của thời kỳ thai nghén. Quan sát về sự chảy máu tử cung, sáng và chiều, từ ngày 6 đến ngày 10 và ghi các điều nhận xét thấy. Giết chuột vào ngày thứ 16 và ghi các sự nhận xét như ở thử nghiệm tác dụng chống làm tổ.

- Tác dụng gây sẩy thai kiểu prostaglandin (Kamboj, 1984)

Đối với các thuốc có tác dụng tương tự prostaglandin, dùng các chuột lang cái đã được ghép đôi với chuột đực. Chia chuột lang thành các nhóm thử thuốc và đối chứng, mỗi nhóm 6 con. Cho chuột ở nhóm thử thuốc uống thuốc thử nghiệm vào các ngày 21 - 23 của thai nghén. Giết động vật vào ngày 30 và ghi các nhận xét như ở thử nghiệm chống sự làm tổ.

- Tác dụng gây sẩy thai sớm và sẩy thai muộn (Kato và cộng sự, 1983)

Chuột cống trắng được chia thành 6 nhóm, mỗi nhóm 6 con, và các nhóm 1, 2 và 3 được dùng để đánh giá tác dụng gây sẩy thai sớm.

Các nhóm 1, 2 và 3 được mở bụng vào ngày 7 của thời kỳ thai nghén dưới sự gây mê nhẹ bằng ether; bộc lộ cả 2 sừng tử cung, quan sát và đếm các thai. Khâu vết mổ. Nhóm 1 được dùng làm đối chứng trong khi các nhóm 2 và 3 nhận 2 liều khác nhau của thuốc thử nghiệm bằng đường uống từ ngày 8 đến ngày 12 của thời kỳ thai nghén. Ở ngày 20 của thai nghén, mở tử cung để lấy thai ra; ở mỗi nhóm, đếm số lượng các chuột con và quan sát đại thể về bất cứ sự dị thường nào.

Các nhóm 4, 5 và 6 được dùng để đánh giá tác dụng gây sảy thai muộn. Các động vật này được mổ bụng vào ngày 11 của thời kỳ thai nghén. Sau khi quan sát và ghi số lượng thai, khâu vết mổ. Bắt đầu cho chuột ở nhóm thử thuốc uống thuốc thử nghiệm mỗi ngày một lần từ ngày 12 đến ngày 20 của thời kỳ thai nghén, và để chuột tiếp tục mang thai đến kỳ hạn. Vào ngày 20 của thai nghén, mổ tử cung để lấy thai ra; đếm số lượng các chuột con và quan sát đại thể về bất cứ sự dị thường nào ở mỗi nhóm. Đánh giá sự sinh trưởng của các thai đẻ ra bằng cách xác định trọng lượng và chiều dài từ đầu của mõm đến đuôi, và so sánh với các trị số này ở nhóm đối chứng. Xác định giới tính các thai.

2.2. Thử nghiệm tác dụng chống sinh sản trên giống dục

2.2.1. Thử nghiệm tác dụng chống sinh tinh trùng (Kamboj, 1984)

Dùng chuột cống trắng dục lớn (10 – 12 tuần tuổi). Cho chuột ở nhóm thử thuốc uống thuốc thử nghiệm trong một chất dẫn thích hợp và cho chuột ở nhóm đối chứng uống chỉ riêng chất dẫn mỗi ngày một lần trong 60 ngày, mỗi nhóm gồm 6 chuột. Mỗi chuột dục được ghép riêng biệt với chuột cái ở thời kỳ tiền động dục/động dục với tỷ lệ 1:2 vào các ngày 12 đến 15 và 56 đến 60 của thời gian uống thuốc. Giết chuột vào ngày 61. Ghi số lượng chuột có giao phối/không giao phối, số lượng chuột sinh đẻ và số lượng con của lứa đẻ. Ghi trọng lượng và hình thái (quan sát bằng mắt) của tinh hoàn và các cơ quan sinh dục phụ, và quan sát dưới kính hiển vi hình thái của tinh trùng. Ghi các nhận xét về mô bệnh học của tinh hoàn. Các sự giao phối vô sinh vào các ngày 12 đến 15 sẽ cho thấy sự vô sinh chức năng và các giao phối vô sinh vào các ngày 56 – 60 gắn liền với sự ngừng sinh tinh trùng cho thấy hoạt tính chống sinh tinh trùng. So sánh giữa nhóm thử thuốc và nhóm đối chứng.

2.2.2. Thử nghiệm về sự dị thường của hình dạng tinh trùng

Áp dụng phương pháp thử nghiệm sự dị thường về hình dạng tinh trùng của Wyrobeck và Bruce (1978). Dùng chuột nhắt trắng dục non cân nặng 25 – 30 g, và cho uống 3 liều thuốc thử nghiệm cho 3 nhóm chuột thử thuốc khác nhau. Cho chuột dục ở nhóm đối chứng uống lượng tương đương chất dẫn. Cho chuột uống thuốc mỗi ngày một lần trong 5 ngày, và vào ngày 35 giết chuột. Pha dịch treo tinh trùng trong nước muối đẳng trương, nhuộm màu với dung dịch nước Eosin-Y 1%, phết lên kính và để khô ngoài không khí. Ghi nhận xét về các dị thường về hình thái, và so sánh giữa nhóm chuột thử thuốc và nhóm đối chứng.

2.2.3. Thử nghiệm về sự vô sinh chức năng (Kamboj, 1984)

Dùng chuột cống trắng đực lớn, thiếu chuột và tiêm trong cơ testosterone propionat với liều 250 μg /chuột, mỗi ngày một lần trong 7 ngày. Cho chuột ở nhóm thử thuốc uống thuốc thử nghiệm và chỉ cho chuột ở nhóm đối chứng uống chất dẫn bắt đầu từ ngày thiếu, mỗi ngày 1 lần trong 7 ngày; mỗi nhóm gồm 6 chuột. Ghép chuột đực với chuột cái ở thời kỳ tiền động dục vào ngày thứ 3 và ngày thứ 7. Giết chuột vào ngày thứ 8 và ghi nhận xét về hình thái của tinh trùng. Ghi số lượng chuột có giao phối / chuột không giao phối, số lượng chuột sinh đẻ và số lượng con của lứa đẻ. So sánh các trị số ở nhóm thử thuốc với nhóm đối chứng.

2.2.4. Thử nghiệm tác dụng gây tắc ống dẫn tinh (Kamboj, 1984)

Thực hiện thí nghiệm trên chuột cống trắng đực lớn. Thuốc thử nghiệm được tiêm trong một chất dẫn đông đặc nhanh cho chuột ở nhóm thử thuốc và chỉ riêng chất dẫn được tiêm cho nhóm đối chứng vào trong lòng ống của ống dẫn tinh (diện tích 0,5 cm^2); mỗi nhóm gồm 6 chuột. Mổ 3 chuột vào ngày thứ 31 và 3 chuột vào ngày thứ 61. Phân lập vùng tiêm của ống dẫn tinh và nghiên cứu theo từng dãy các lát cắt mô học để ghi sự tắc ống dẫn tinh, nếu có, bởi sự hình thành nút mô hạt.

2.2.5. Thử nghiệm tác dụng diệt tinh trùng (Kamboj, 1984)

- **Thí nghiệm 1.** Dùng tinh dịch thu được do phóng tinh của người được làm cho lỏng có chất lượng tốt 30 phút sau sự thủ dâm. Đặt một giọt tinh dịch trên một bản kính. Cho thêm 2 giọt thuốc thử nghiệm trong chất đệm phosphat Sorensen (pH 7,0). Trộn kỹ với một đũa thủy tinh (5 giây) và đặt một lá kính dày. Quan sát dưới kính hiển vi. Sự bất động xảy ra ngay lập tức của tinh trùng cho thấy thuốc thử nghiệm có hoạt tính diệt tinh trùng. Lặp lại thử nghiệm trên 3 mẫu khác nhau và xác định nồng độ thấp nhất có tác dụng.

- **Thí nghiệm 2.** Pha chế dung dịch thuốc thử nghiệm với nồng độ gấp 10 lần nồng độ thấp nhất có tác dụng ở thử nghiệm 1. Cho thêm 1 ml dung dịch thuốc thử nghiệm vào 0,2 ml tinh dịch người được làm cho lỏng. Khuấy trên một máy trộn xoáy tròn trong 10 giây. Quan sát dưới kính hiển vi về sự làm bất động tinh trùng. Nếu có sự bất động toàn bộ, cho thêm 1 ml dung dịch glucose 1,7% cộng với natri clorid 0,38%. Khuấy trên một máy trộn xoáy tròn và đặt ở 37°C trong 30 phút. Quan sát dưới kính hiển vi. Nếu không thấy có sự phục hồi tính chuyển động của tinh trùng, thì điều này chứng tỏ thuốc thử nghiệm có hoạt tính diệt tinh trùng.

CHƯƠNG 20

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG
KHÁNG KHUẨN *IN VITRO****PGS. TSKH. Đỗ Trung Đàm***MỞ ĐẦU**

Mục đích của việc thử nghiệm tác dụng kháng khuẩn *in vitro* là xác định thuốc nghiên cứu có tác dụng trên vi khuẩn nào và mức độ tác dụng *in vitro* như thế nào. Có nhiều phương pháp nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn *in vitro*, cũng như có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng góp phần vào sự nhạy cảm của vi khuẩn với thuốc nghiên cứu. Nếu các yếu tố này thay đổi sẽ ảnh hưởng rất nhiều đến kết quả nghiên cứu. Những yếu tố ảnh hưởng quan trọng nhất có thể kể là điều kiện vô trùng, tính tan của chất thử, môi trường nuôi cấy, pH của môi trường, nhiệt độ, thời gian nghiên cứu, cách cấy chủng và kỹ thuật nghiên cứu.

I. NHỮNG YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG**1.1. Điều kiện vô trùng**

Nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn phải tiến hành trong điều kiện vô trùng, tránh đưa vi khuẩn khác vào làm nhiễu kết quả nghiên cứu. Tất cả các dụng cụ dùng trong thí nghiệm, môi trường nuôi cấy, không khí làm việc đều phải tiệt trùng. Mặt khác, trong các môi trường làm việc không được có chất kháng khuẩn nào có thể gây ra dương tính giả, ngộ nhận là tác dụng do thuốc nghiên cứu, mà thực ra do chất kháng sinh ta đã để lẫn vào.

1.2. Tính tan của chất thử

Đây là vấn đề rất quan trọng. Chất thử phải tan thì kết quả thử mới chính xác. Khi thí nghiệm, hòa chất thử vào trong nước. Nếu chất thử tan hoàn toàn trong nước là tốt nhất. Nếu chất thử không tan trong nước, thì phải hòa tan trong một dung môi đặc biệt như dimethylformamid (DMF), dimethylsulfoxid (DMSO) hoặc polyethylenglycol (PEG). Sau đó, dùng nước pha loãng ra. Lúc này, nồng độ chất thử thấp, nên có thể tan được. Nếu chất thử không tan, kết quả nghiên cứu sẽ sai.

1.3. Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu thử có thể là dược liệu khô, cao đã chiết từ dược liệu, hợp chất tinh khiết do tổng hợp, hoặc chiết từ dược liệu và kháng sinh chuẩn để tham chiếu.

1.3.1. Mẫu là dược liệu

Có thể chiết bằng cách sắc với nước, chiết bằng cồn, hoặc một dung môi nào khác, nhưng sau đó, phải chuyển sang dạng cao lỏng trong nước theo tỷ lệ 1:1 (1 g dược liệu được 1 ml cao lỏng). Ví dụ, chiết 100 g dược liệu bằng cồn. Sau khi chiết, gộp các dịch chiết cồn lại, cô đuổi hết cồn đi. Thêm nước vừa đủ 100 ml. Lọc, ta sẽ được cao lỏng 1:1. Khi dùng, nếu hoạt tính quá mạnh, thì phải hòa loãng tiếp với nước cất để được dịch thử 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; còn nếu hoạt tính yếu, thì từ cao lỏng 1:1, có thể cô cách thủy tiếp để được dịch thử đặc hơn: 2:1; 3:1; 4:1.

1.3.2. Mẫu là cao thô chiết từ dược liệu

(Cần phải biết 1 g cao này tương đương với bao nhiêu gam dược liệu).

Cân chính xác 200 mg cao, hòa vào 2 ml nước. Nếu dung dịch tan hoàn toàn, dùng dung dịch này làm gốc (100 mg/ml). Nếu dung dịch có vẩn tạp chất, thì ly tâm, lấy dịch trong làm dung dịch gốc (cũng 100 mg/ml). Nếu cao không tan trong nước, thì thay nước bằng dung môi khác như DMSO, DMF hoặc PEG theo đúng cách làm như với nước. Ta vẫn được dịch thử 100 mg/ml.

Khi thử, tùy theo hoạt tính mạnh hay yếu, ta hòa loãng tiếp với nước để được dịch thử có nồng độ thấp hơn: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg/ml. Kết quả về nồng độ ở đây, nên tính theo mg cao trong 1 ml dung dịch.

1.3.3. Mẫu là hợp chất tinh khiết

(Chất tổng hợp hoặc chiết từ dược liệu. Nếu là chất chiết được từ dược liệu, cần biết hàm lượng hợp chất trong dược liệu là bao nhiêu %).

Cân chính xác 20 mg, hòa vào 2 ml nước cất. Nếu hợp chất tan hoàn toàn, dùng dung dịch này làm gốc (10 mg/ml). Nếu hợp chất không tan hoặc khó tan trong nước, thay nước cất bằng DMSO, DMF hoặc PEG để hòa tan. Ta cũng được dung dịch gốc 10 mg/ml.

Khi thử, từ dung dịch gốc 10 mg/ml, pha thành dung dịch thử loãng gấp 10 lần, tức là dung dịch 1 mg/ml. Nếu hoạt tính mạnh quá, ta có thể hòa loãng 2 lần liên tiếp với nước để được dịch thử có nồng độ thấp hơn như 500; 250; 125; 62,5... µg/ml.

1.3.4. Mẫu là thuốc kháng sinh để tham chiếu

Cân chính xác 100 mg thuốc kháng sinh cần thử, hòa tan vào 10 ml nước cất, hoặc nếu thuốc không tan trong nước thì hòa với DMSO, DMF hoặc PEG, ta sẽ được nồng độ dung dịch mẹ 10 mg/ml. Dung dịch mẹ này, nếu để ở tủ lạnh, thì hoạt tính kháng khuẩn vẫn không giảm sau khi bảo quản được nhiều tuần.

Khi thí nghiệm, để đánh giá có tính chất định lượng, lấy 1 ml dung dịch kháng sinh mẹ vào ống nghiệm 1. Thêm 9 ml nước cất vô trùng sẽ được dung dịch có nồng độ 1 mg/ml. Từ ống nghiệm 1, lấy 1 ml chuyển sang ống nghiệm 2, thêm vào đó 1 ml nước cất vô trùng, sẽ được nồng độ 0,5 mg/ml, rồi cứ làm như vậy, ta sẽ được một loạt ống 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8... có nồng độ theo thứ tự là 1000; 500; 250; 125; 63; 32; 16; 8 µg/ml. Ta thử một nồng độ nào đó của chất thử, thấy tác dụng của nồng độ đó tương đương với nồng độ nào của chất kháng sinh tham chiếu. Như vậy, ta đã đánh giá có tính chất định lượng tác dụng của chất thử, so sánh với kháng sinh tham chiếu. Nếu chỉ thử 1 nồng độ của chất thử và 1 nồng độ của chất kháng sinh tham chiếu, thì kết quả đánh giá chỉ có tính chất tương đối.

1.4. Môi trường

Có nhiều loại môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Việc lựa chọn môi trường phụ thuộc vào loại vi khuẩn và bản chất của chất thử. Có những trường hợp đòi hỏi những môi trường rất phức tạp. Trong Dược điển Việt Nam 3, có ghi trên 30 loại môi trường khác nhau. Ở đây chỉ nêu loại môi trường thường dùng cho đa số các vi khuẩn thử.

1.4.1. Môi trường thạch nền

Khi nghiên cứu dùng môi trường đặc (môi trường thạch), để tiết kiệm môi trường chứa vi khuẩn, người ta trải trên tấm kính một lớp thạch nền. Sau đó, mới trải một lớp thạch có vi khuẩn thử.

Thành phần của lớp thạch nền này gồm:

Pepton	10 g
NaCl	4 g
Thạch	15 – 20 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH sau khi tiệt khuẩn là $7,4 \pm 0,2$	

1.4.2. Môi trường lỏng dinh dưỡng cho vi khuẩn

Khi nuôi cấy trên môi trường lỏng, đa số các vi khuẩn thích hợp với môi trường sau đây:

Cao thịt bò	10 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml

Hòa tan bằng nhiệt. Điều chỉnh đến pH 8,0 – 8,4 bằng NaOH 5M hoặc NaOH 1N và đun sôi trong 10 phút. Lọc. Điều chỉnh đến pH 7,2 – 7,4 bằng NaOH 5M hoặc HCl 5M (hoặc HCl 1N). Tiệt trùng ở 115°C trong 30 phút.

Nếu không có cao thịt bò, dùng thịt bò 500 g, ninh lên, lấy nước cốt, được khoảng gần 1000 ml. Thêm pepton 10g, NaCl 5g. Khuấy cho tan đều, thêm nước cất vừa đủ 1000 ml, rồi tiến hành như trường hợp cao thịt bò.

1.4.2. Môi trường thạch dinh dưỡng cho vi khuẩn

Dùng môi trường lỏng dinh dưỡng, thêm thạch 1,2 – 2%. Đun đến tan đều. Trường hợp dùng thịt bò, thì thạch phải dùng nhiều hơn, thường 1,5 – 2,5%. Có những vi khuẩn không phát triển được trên môi trường thạch dinh dưỡng thường, như một số loại *Pneumococcus*, *Streptococcus*..., phải dùng môi trường thạch dinh dưỡng đặc biệt như thạch máu, thạch huyết thanh, thạch canh thang glucose...

1.5. Chuẩn bị chủng vi khuẩn

Từ ống chủng gốc, cấy trên mặt thạch dinh dưỡng. Sau 24 giờ, tách các khuẩn lạc phát triển trên mặt thạch, nghiền trong nước muối sinh lý cho đồng nhất, rồi cho vào một ống nghiệm để đo độ đục. Thêm nước muối sinh lý để được hỗn dịch vi khuẩn có tỷ lệ số tế bào vi khuẩn thích hợp, còn gọi là số *cfu* (colony forming unit: đơn vị tạo khuẩn lạc) trong 1 ml, ví dụ 10 triệu cfu/ml. Xác định số lượng tế bào vi khuẩn trong 1 ml bằng cách đo độ đục so với một ống mẫu. Hỗn dịch vi khuẩn đã được chuẩn hóa số lượng vi khuẩn trong 1 ml (số cfu/ml) gọi là **canh khuẩn gốc**.

Các vi khuẩn thử tùy theo yêu cầu của chất thử và điều kiện thử. Theo một tài liệu của Ấn Độ, người ta thường dùng các vi khuẩn sau để thử:

Staphylococcus aureus

Streptococcus faecalis

Pseudomonas aeruginosa

Klebsiella pneumoniae

Escherichia coli

Nếu có điều kiện, nên thử 10 loại vi khuẩn, trong đó có 5 loại vi khuẩn Gram dương và 5 loại vi khuẩn Gram âm.

1. Các vi khuẩn Gram dương thường hay dùng là:

Bacillus cereus

Bacillus pumilus

Bacillus pyocyaneus

Bacillus subtilis

Clostridium perfringens

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecium

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus saprophyticus

Streptococcus mutans

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pyogenes

Streptococcus salivarius

Streptococcus sanguis

Streptococcus viridans

2. Các vi khuẩn Gram âm thường hay dùng là:

Acinetobacter calcoaceticus

Citrobacter diversus

Citrobacter freundii

Enterobacter aerogenes
Enterobacter agglomerans
Enterobacter cloacae
Escherichia coli
Haemophilus influenzae
Hafnia alvei
Klebsiella pneumoniae
Moraxella catarrhalis
Neisseria gonorrhoeae
Neisseria meningitidis
Proteus mirabilis
Proteus vulgaris
Pseudomonas aeruginosa
Salmonella paratyphi
Salmonella typhi
Salmonella typhimurium
Serratia marcescens
Shigella boydii
Shigella dysenteriae
Shigella flexneri
Shigella sonnei

1.6. Nhiệt độ ủ và thời gian ủ

Phải đảm bảo nhiệt độ ủ đúng theo yêu cầu của từng vi khuẩn. Trong đa số các trường hợp đối với vi khuẩn, thường ủ ở nhiệt độ $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Thời gian ủ cũng tùy loại vi khuẩn, nhưng thông thường là 24 giờ.

1.7. Các phương pháp thử *in vitro*

Như trên đã trình bày, có rất nhiều phương pháp thử kháng khuẩn *in vitro*, sau đây là một số phương pháp chính:

- Kỹ thuật định tính để thăm dò tác dụng trên vi khuẩn
- Kỹ thuật dùng môi trường đặc

- Kỹ thuật dùng môi trường lỏng
- Kỹ thuật sinh tự ký

II. KỸ THUẬT ĐỊNH TÍNH ĐỂ THẨM DÒ TÁC DỤNG TRÊN VI KHUẨN

Giả thiết ta phải thử tác dụng kháng khuẩn của một dược liệu A trên 10 loại vi khuẩn mà ta có là:

5 vi khuẩn Gram dương

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus faecalis*
- *Bacillus subtilis*
- *Enterococcus faecium*
- *Clostridium perfringens*

5 vi khuẩn Gram âm

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Escherichia coli*
- *Proteus mirabilis*
- *Salmonella typhimurium*

Nếu tiến hành thử có tính chất định lượng tác dụng của A trên cả 10 loại vi khuẩn trên, sẽ mất nhiều thời gian, mà có khi cũng không thu được kết quả mong muốn. Để giảm thiểu khối lượng công việc, mà vẫn thu được kết quả, trước hết, thử định tính tác dụng của A trên cả 10 loại vi khuẩn.

- Nếu thử định tính mà thấy A không có tác dụng trên một loại vi khuẩn nào, có thể kết luận ngay mà không cần phải thử có tính chất định lượng.
- Nếu thử định tính, thấy A có tác dụng trên loại vi khuẩn nào, thì khi thử có tính chất định lượng, chỉ cần thử trên loại vi khuẩn đó.
- Nếu thử định tính, thấy A có tác dụng trên nhiều trong số 10 loại vi khuẩn thử, cũng có thể phân tích, đánh giá xem A có chiều hướng tác dụng trên vi khuẩn Gram dương hoặc Gram âm nhiều hơn, cũng như chiều hướng sẽ sử dụng A để làm thuốc có tác dụng trên loại vi khuẩn gây bệnh gì, để đi sâu vào nghiên cứu có tính chất định lượng một số loại vi khuẩn nhất định.

Như vậy, nếu thử định tính thẩm dò trước, thì ta chỉ cần tập trung vào một số loại vi khuẩn, khi thử có tính chất định lượng.

2.1. Phương tiện dụng cụ

- Các hộp Petri
- Que cấy bạch kim

- Tủ ẩm 37°C
- Tủ sấy để tiệt trùng
- Cốc đựng môi trường
- Ống hút, ống đong, ống nghiệm
- Đèn cồn để khử trùng que cấy
- Bút viết trên kính

2.2. Bước chuẩn bị

- Chuẩn bị mẫu thử: xem phần 1.3.1. (vì là được liệu A) đến khi được cao lỏng 1:1.
- Chuẩn bị các ống canh khuẩn gốc của 10 loại vi khuẩn định thử (xem phần 1.5).
- Chuẩn bị môi trường thạch nền (xem phần 1.4).
- Chuẩn bị môi trường thạch dinh dưỡng (xem phần 1.4).
- Chuẩn bị môi trường thạch dinh dưỡng có thuốc: Lấy 100 ml môi trường thạch dinh dưỡng, thêm 1 ml dịch cao lỏng thuốc 1:1. Đun nóng chảy, khuấy cho thật đều, dùng ống hút, hút môi trường đã có thuốc, lãng đều trên mặt lớp thạch nền của các đĩa Petri, tạo thành một lớp thạch có thuốc, dàn đều trên lớp thạch nền, dày 1 - 1,5 mm. Nếu không có thạch nền, có thể dùng toàn bộ thạch có thuốc, cho vào đĩa Petri để có độ dày khoảng 2,5 mm.

Cũng có trường hợp dùng nồng độ thuốc thấp hơn, như chỉ cho 100 µl dịch thuốc 1:1 vào 100 ml môi trường thạch dinh dưỡng, nhất là trường hợp, nếu dùng 1 ml dịch thuốc, được thạch có màu quá đậm. Cũng có trường hợp muốn thăm dò với 3 nồng độ thuốc khác nhau, thì dùng lần lượt 1 ml; 400 µl và 100 µl thuốc hòa vào 100 ml môi trường thạch dinh dưỡng.

2.3. Tiến hành

Dùng các hộp Petri có đường kính 90 mm, hoặc 100 mm, 160 mm (cũng có thể thay bằng khay kính). Phía dưới là một lớp môi trường thạch nền dày khoảng 1,5 mm. Với loại hộp Petri đường kính 90 mm, thể tích thạch nền cần 8 - 10 ml. Đun chảy thạch nền. Dùng ống hút, hút thạch nền, rồi lãng đều trên đĩa Petri đã được đặt trên một mặt phẳng nằm ngang. Để ở nhiệt độ phòng 15 - 20 phút, cho thạch nền trong đĩa Petri đặc lại. Dùng ống hút, hút môi trường thạch dinh dưỡng có

thuốc đang nóng chảy láng đều lên trên mặt lớp thạch nền, tạo thành một lớp dày 1 – 1,5 mm. Với hộp Petri đường kính 90 mm, thể tích thạch có thuốc cần khoảng 6 – 9 ml. Nếu không có lớp thạch nền, thì phải dùng cho mỗi hộp Petri khoảng 15 ml thạch có thuốc. Để ở nhiệt độ phòng cho lớp thạch có thuốc trong đĩa Petri đặc lại. Dùng que cấy bằng bạch kim, cấy vi khuẩn trên mặt thạch của hộp Petri. Mỗi đĩa Petri có thể cấy được 3 – 5 loại vi khuẩn. Do đó, với mỗi nồng độ của thuốc trong môi trường thạch dinh dưỡng, cần 2 – 3 đĩa Petri. Đánh dấu rõ vị trí của mỗi loại vi khuẩn ở mặt ngoài của đáy đĩa Petri.

Đậy nắp các hộp Petri lại. Cho các hộp Petri vào tủ ẩm và ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, lấy các hộp Petri ra, đọc kết quả. Nếu vi khuẩn mọc chưa rõ, thì cho các hộp Petri vào tủ ẩm và tiếp tục ủ ở 37°C trong 24 giờ nữa. Lấy các hộp Petri ra. Đọc kết quả.

2.4. Đọc kết quả

- Vi khuẩn nào không mọc được, thì thuốc có tác dụng trên vi khuẩn đó.
 - Vi khuẩn nào mọc được, thì thuốc không có tác dụng trên vi khuẩn đó.
- Nếu vi khuẩn mọc càng mạnh thì thuốc càng không có tác dụng.

Đến đây, ta có thể kết luận về mặt định tính là thuốc A không có tác dụng trên vi khuẩn nào, và có tác dụng trên vi khuẩn nào. Chọn các vi khuẩn mà thuốc có tác dụng để nghiên cứu tiếp.

2.5. Chọn kháng sinh làm thuốc tham chiếu

Sau bước thăm dò, ta đã xác định được thuốc A có tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn nào, thì khi chọn kháng sinh làm thuốc tham chiếu trong thí nghiệm tiếp theo, phải cho phù hợp.

Chúng ta biết rằng, mỗi loại vi khuẩn thường nhạy cảm, chịu tác dụng của một hoặc một số thuốc kháng sinh nhất định. Vì thế, không nên dùng một kháng sinh bất kỳ để tham chiếu cho một vi khuẩn, mà đối với một vi khuẩn nhất định, nên chọn kháng sinh nào có tác dụng ức chế mạnh vi khuẩn đó để tham chiếu. Ví dụ:

- Nếu thử trên *Staphylococcus aureus*, có thể dùng kháng sinh tham chiếu là một trong các cephalosporin (như cephalixin, cephalothin, cephradine, cefaclor, cefuroxim, cefotaxim, ceftriaxon), hoặc một trong các cyclin (tetracyclin, oxytetracyclin, clotetracyclin, doxycyclin), hoặc ampicilin, oxacilin, penicilin.

- Nếu thử trên *Bacillus cereus*, có thể dùng kháng sinh tham chiếu là một trong các cyclin (tetracyclin, oxytetracyclin, clotetracyclin, doxycyclin).

- Nếu thử trên *Bacillus subtilis*, có thể dùng kháng sinh tham chiếu là ampicilin, oxacilin, tetracyclin.

- Nếu thử trên *Klebsiella pneumoniae*, có thể dùng kháng sinh tham chiếu là neomycin, streptomycin.

Trường hợp nếu thử trên *Staphylococcus aureus* mà dùng kháng sinh tham chiếu là streptomycin thì không hợp lý. Ví dụ, khi thăm dò định tính, thấy thuốc A có tác dụng trên *Staphylococcus aureus*, nhưng lại dùng kháng sinh tham chiếu là streptomycin chẳng hạn. Kết quả thấy, ví dụ, dịch thuốc A nồng độ 1:2 (1 g được liệu của A chế ra được 2 ml dịch thuốc) có đường kính vòng vô khuẩn là 12 mm. Như vậy, A có tác dụng yếu. Nhưng nếu dùng streptomycin để tham chiếu và thấy streptomycin nồng độ 25 µg/ml có đường kính vòng vô khuẩn chỉ là 10 mm, rồi kết luận là thuốc A mạnh hơn streptomycin, sẽ dễ gây hiểu lầm; bởi vì, streptomycin không có tác dụng mạnh trên *Staphylococcus aureus*. Tất nhiên, ở đây, ta vẫn có thể nói là: thuốc A với dịch chiết tỷ lệ 1:2 có tác dụng mạnh hơn streptomycin nồng độ 25 µg/ml trên vi khuẩn *Staphylococcus aureus*. Nhưng dùng streptomycin làm kháng sinh chuẩn tham chiếu trên *Staphylococcus aureus* là không hợp lý.

III. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN BẰNG KỸ THUẬT DÙNG KHOANH GIẤY TRÊN MÔI TRƯỜNG ĐẶC

Nguyên tắc của phương pháp là xác định khả năng của thuốc được tẩm vào khoanh giấy, khuếch tán vào lớp thạch gây ức chế sự phát triển của vi khuẩn ở xung quanh khoanh giấy tẩm thuốc. Vùng ức chế càng lớn thì tác dụng của thuốc càng mạnh.

Ví dụ: Nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của cao thuốc B chiết từ một dược liệu mà hàm lượng cao là 10% (100 g dược liệu được 10 g cao). Sau khi thử định tính thăm dò trên 10 loại vi khuẩn, thấy thuốc không có tác dụng trên 7 loại, và có tác dụng trên 3 loại là *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Klebsiella pneumoniae*. Như vậy, ta chọn kháng sinh để tham chiếu khi nghiên cứu tác dụng trên *Staphylococcus aureus* hoặc *Bacillus subtilis* là ampicilin, còn khi nghiên cứu tác dụng trên *Klebsiella pneumoniae* thì phải dùng kháng sinh tham chiếu là streptomycin.

Bước tiếp theo là ta phải xác định xem mức độ tác dụng (nghiên cứu có tính chất định lượng) của cao B trên 3 loại vi khuẩn này. Ở đây có nhiều cách đánh giá:

- Đánh giá định lượng sơ bộ: Cách này, ở Việt Nam ta vẫn dùng. Cụ thể là, pha cao B thành dung dịch có một nồng độ nhất định, tẩm khoanh giấy lọc vào dung dịch thuốc, rồi đặt lên mặt thạch. Ủ ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ 37°C trong 24 giờ. Sau đó lấy ra, đọc kết quả. Nếu vòng vô khuẩn càng lớn thì thuốc có tác dụng càng mạnh.
- Đánh giá định lượng sơ bộ có so sánh với kháng sinh chuẩn để tham chiếu. Cách tiến hành cũng như trên, nhưng ngoài thử với dung dịch thuốc B, lại thử với một dung dịch thuốc kháng sinh để tham chiếu. Kết quả, ta có thể so sánh tác dụng của thuốc nghiên cứu với kháng sinh dùng để tham chiếu.
- Đánh giá định lượng.

3.1. Phương pháp đánh giá định lượng về tác dụng kháng khuẩn

Có nhiều phương pháp đánh giá định lượng. Sau đây, xin trình bày một trong các phương pháp đánh giá định lượng đơn giản nhất.

Ví dụ: Đánh giá định lượng tác dụng kháng khuẩn của cao B so với ampicilin trên *Staphylococcus aureus* dùng kỹ thuật khoanh giấy trên môi trường đặc.

3.1.1. Phương tiện dụng cụ

- Các hộp Petri
- Que cấy bạch kim
- Đèn cồn để khử trùng que cấy
- Tủ ấm 37°C
- Tủ sấy để tiệt trùng
- Cốc đựng môi trường
- Ống hút, ống đong, ống nghiệm
- Bút viết trên kính
- Tấm kính để đặt khoanh giấy tẩm thuốc rồi làm khô
- Các khoanh giấy lọc chuẩn (thường dùng giấy Whatman số 1) có đường kính 6, 7, 8 hoặc 9 mm
- Dung dịch NaCl 0,9%
- Thước đo vòng vô khuẩn. Có thể dùng thước đo thường. Nhưng hiện nay, nhiều nơi (ví dụ Viện Dược liệu) có máy đo vòng vô khuẩn và đếm khuẩn lạc tự động Protozone, thì việc đo rất dễ dàng.

3.1.2. Bước chuẩn bị

- Chuẩn bị mẫu thử (xem phần 1.3.2). Cụ thể ở đây là pha cao B để được 1 ml dung dịch trong ống nghiệm có nồng độ thích hợp, sao cho đường kính vòng vô khuẩn sau thí nghiệm không lớn hơn hoặc không nhỏ hơn đường kính vòng vô khuẩn của tất cả các dung dịch kháng sinh chuẩn tham chiếu, ở đây là ampicilin. Ví dụ nồng độ dung dịch cao B là 25 mg/ml.
- Chuẩn bị các dung dịch kháng sinh chuẩn: Kháng sinh chuẩn để tham chiếu là ampicilin. Pha với NaCl 0,9% thành 4 dung dịch có nồng độ khác nhau là 16; 8; 4 và 2 µg/ml trong 4 ống nghiệm, mỗi ống 1 ml.
- Chuẩn bị canh khuẩn gốc *Staphylococcus aureus* có 100 triệu tế bào vi khuẩn trong 1 ml (10^8 cfu/ml) (xem phần 1.4).
- Chuẩn bị môi trường thạch nền (xem phần 1.4).
- Chuẩn bị môi trường thạch dinh dưỡng (xem phần 1.4.3). Ở đây, ta thử trên *Staphylococcus aureus*, nên dùng môi trường thạch dinh dưỡng thường.
- Chuẩn bị môi trường thạch dinh dưỡng có vi khuẩn: Lấy môi trường thạch dinh dưỡng. Đun nóng chảy môi trường. Để môi trường nguội dần đến nhiệt độ thích hợp thì cho canh khuẩn gốc vào. Khuấy đều thành môi trường đồng nhất. Nếu là vi khuẩn thực, cho canh khuẩn vào khi môi trường thạch còn nóng ở nhiệt độ 40 – 50°C; còn nếu là nha bào vi khuẩn, thì cho canh khuẩn vào lúc môi trường còn nóng ở 60 – 65°C. Tỷ lệ giữa thể tích canh khuẩn và thể tích môi trường thạch phụ thuộc vào việc ta muốn có tỷ lệ bao nhiêu vi khuẩn trong 1 ml môi trường thạch và tỷ lệ vi khuẩn trong canh khuẩn gốc. Trong trường hợp của ta, vì ta muốn có tỷ lệ một triệu tế bào vi khuẩn trong 1 ml môi trường thạch (10^6 cfu/ml), và tỷ lệ số tế bào vi khuẩn trong canh khuẩn gốc là 100 triệu trong 1 ml; nên ta cần cho 1 ml canh khuẩn vào 99 ml môi trường thạch dinh dưỡng. Tỷ lệ số tế bào vi khuẩn trong 1 ml môi trường thạch có ảnh hưởng đến hình thái của vòng vô khuẩn; do đó, nên dùng một tỷ lệ thích hợp để thu được các vòng vô khuẩn rõ nét nhất. Có trường hợp chỉ cần dùng tỷ lệ là 100 000 cfu/ml, nhưng cũng có trường hợp phải dùng đến 3,5 triệu cfu/ml môi trường thạch.
- Chuẩn bị các khoanh giấy tẩm thuốc: Ta đã có 5 ống nghiệm, mỗi ống có 1 ml. Lấy thêm một ống nghiệm thứ sáu đựng 1 ml nước cất, ta có 6 ống:

- Ống 1 đựng dung dịch cao B nồng độ 25 mg/ml
- Ống 2 đựng dung dịch ampicilin 16 $\mu\text{g/ml}$
- Ống 3 đựng dung dịch ampicilin 8 $\mu\text{g/ml}$
- Ống 4 đựng dung dịch ampicilin 4 $\mu\text{g/ml}$
- Ống 5 đựng dung dịch ampicilin 2 $\mu\text{g/ml}$
- Ống 6 đựng nước cất.

Sấy khô các khoanh giấy trong tủ sấy ở 105°C trong 1 giờ. Để nguội. Cho vào mỗi ống nghiệm 6 khoanh giấy thấm dầm trong dung dịch. Lấy các khoanh giấy ra. Các khoanh giấy ở mỗi ống nghiệm được gấp ra, đặt riêng rẽ trên một phiến kính có đánh dấu 1, 2, 3, 4, 5 và 6, ứng với các số ở các ống nghiệm, rồi cho vào tủ ẩm ở 37°C trong 15 phút để cho khô.

3.1.3. Tiến hành

Dùng 6 hộp Petri, đường kính 90 mm (hoặc đường kính lớn hơn). Đun nóng chảy môi trường thạch nền. Dùng ống hút, hút thạch nền, rồi láng đều lên đĩa Petri đã được đặt trên một mặt phẳng nằm ngang, để tạo thành lớp thạch nền phẳng dày khoảng 1,5 mm. Với loại đĩa Petri đường kính 90 mm, thể tích thạch nền cần khoảng 8 – 10 ml. Để 10 – 20 phút ở nhiệt độ phòng cho thạch nền đặc lại (có thể làm từ ngày hôm trước). Dùng ống hút, hút môi trường thạch có vi khuẩn khi còn nóng chảy, láng đều lên trên lớp thạch nền, sao cho được một lớp thạch có vi khuẩn dày khoảng 1 mm. Với đĩa Petri đường kính 90 mm, thể tích môi trường thạch có vi khuẩn cần 6 ml.

Mặt ngoài ở đáy mỗi đĩa Petri ghi các số 1, 2, 3, 4, 5 và 6 thành vòng tròn cách đều nhau và cách mép đĩa Petri khoảng 10 mm. Trên mặt thạch của mỗi đĩa Petri, đặt các khoanh giấy ở phiến kính số 1 vào vị trí số 1 của cả 6 đĩa Petri; các khoanh giấy ở phiến kính số 2 vào vị trí số 2 của cả 6 đĩa Petri và cứ thế cho đến hết. Cần chú ý, phải đặt các khoanh giấy, sao cho mép các khoanh giấy phải cách nhau ít nhất 15 mm, và cách mép đĩa Petri khoảng 10 mm.

Đậy nắp đĩa Petri lại. Cho tất cả 6 hộp Petri vào tủ lạnh ở 4°C trong 1 giờ để thuốc khuếch tán. Sau đó, cho vào tủ ẩm 37°C cho vi khuẩn phát triển trong 24 giờ.

3.1.4. Đọc và tính kết quả

- Xung quanh các khoanh giấy ở vị trí 6 (tẩm nước cất), vi khuẩn phải mọc, và không được có vòng vô khuẩn. Nếu có vòng vô khuẩn là sai, phải làm lại. Khoanh giấy tẩm nước cất là để kiểm tra phương pháp thử.
- Đo đường kính vòng vô khuẩn của từng dung dịch thử. Khi thử tác dụng

kháng khuẩn dùng kỹ thuật khoanh giấy trên môi trường đặc, các trị số đường kính vòng vô khuẩn của cùng một nồng độ dung dịch chất thử thường khá gần nhau. Vì vậy, người ta thường tính theo số trung bình, cộng trừ độ lệch chuẩn $M \pm SD$ (tất nhiên cũng có thể tính theo số trung bình, cộng trừ sai số chuẩn $M \pm SE$).

Ví dụ, sau khi đo đường kính vòng vô khuẩn của từng dung dịch thử, rồi tính đường kính vòng vô khuẩn trung bình D ($n = 6$) theo $M \pm SD$, ta được trị số như sau:

- D của ống 1 dung dịch cao B nồng độ 25 mg/ml:	15,2 ± 1,7 mm
- D của ống 2 dung dịch ampicilin 16 µg/ml:	26,4 ± 2,1 mm
- D của ống 3 dung dịch ampicilin 8 µg/ml:	23,9 ± 1,8 mm
- D của ống 4 dung dịch ampicilin 4 µg/ml:	17,6 ± 2,2 mm
- D của ống 5 dung dịch ampicilin 2 µg/ml:	14,6 ± 1,6 mm

Ta thấy ống 1 có D nằm giữa ống 4 và ống 5. Từ ống 4 lên ống 5, nồng độ tăng 2 µg/ml tương đương với tăng D là 3 mm. Như vậy, từ ống 5 lên ống 1, D tăng là 0,6 mm, tương đương với nồng độ tăng là $(2 \times 0,6) : 3 = 0,4$ µg/ml. Do đó, ống 1 có nồng độ cao B là 25 mg/ml có tác dụng kháng khuẩn tương đương với nồng độ ampicilin là $2 + 0,4 = 2,4$ µg/ml, và 1 mg ampicilin tương đương với 10,4 g cao B.

3.1.5. Kết luận

Đã nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của cao B trên *Staphylococcus aureus*, dùng kỹ thuật khoanh giấy trên môi trường thạch. Kết quả cho thấy, cao B có tác dụng kháng khuẩn vừa phải, với nồng độ dịch thử là 25 mg/ml, đường kính vòng vô khuẩn đạt 15,2 ± 1,7 mm; trong khi ampicilin nồng độ 16; 8; 4 và 2 µg/ml có đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 26,4 ± 2,1; 23,9 ± 1,8; 17,6 ± 2,2 và 14,6 ± 1,6 mm. Tính ra, 1 mg ampicilin có tác dụng ức chế vi khuẩn tương đương với 10,4 g cao B (cũng là tương đương với 104 g dược liệu của B). Ngược lại, cũng có thể tính được là 1 g cao B tương đương với 96 µg ampicilin.

3.1.6. Ghi chú

- Khi tính toán, ta chỉ dựa vào 2 nồng độ ampicilin cho đường kính vòng vô khuẩn gần sát (một lớn hơn, một nhỏ hơn) vòng vô khuẩn của thuốc nghiên cứu.
- Nếu đường kính vòng vô khuẩn của thuốc nghiên cứu lớn hơn hoặc nhỏ hơn tất cả đường kính vòng vô khuẩn của các dung dịch kháng sinh chuẩn, thì phải làm lại, bằng cách thay đổi nồng độ dung dịch của chất nghiên cứu, hoặc thay đổi các nồng độ của dung dịch kháng sinh chuẩn tham chiếu.

- Nếu muốn thử thêm một mẫu thuốc C nữa (hoặc thêm một nồng độ khác của cao B), ta có thể đặt thêm một khoanh giấy tẩm dung dịch của C. Như vậy, mỗi đĩa Petri có 7 khoanh giấy, một khoanh có thể đặt vào giữa đĩa Petri, hoặc có thể phải dùng một đĩa Petri có đường kính lớn hơn.
- Trong Dược điển Việt Nam 3 cũng có ghi phương pháp "Xác định hoạt lực thuốc kháng sinh bằng phương pháp thử vi sinh vật". Ta cũng có thể áp dụng phương pháp này. Tuy nhiên, phương pháp trong Dược điển 3, chủ yếu là để đánh giá hoạt lực của một kháng sinh so sánh với một kháng sinh chuẩn. Ví dụ, xác định xem một ampicilin đang lưu hành trên thị trường có đạt tiêu chuẩn so với ampicilin chuẩn không.

3.1.7. Triển khai tiếp

Từ "Phương pháp đánh giá định lượng tác dụng kháng khuẩn của cao B so với ampicilin trên *Staphylococcus aureus* dùng kỹ thuật khoanh giấy trên môi trường đặc" đã trình bày ở trên, ta triển khai tiếp:

- Phương pháp đánh giá định lượng tác dụng kháng khuẩn của cao B so với ampicilin (hoặc một kháng sinh khác thích hợp) trên *Bacillus subtilis* dùng kỹ thuật khoanh giấy trong môi trường đặc. Cách thức tiến hành cũng như mục 3.1, nhưng thay môi trường thạch có vi khuẩn *S. aureus* bằng môi trường thạch có vi khuẩn *B. subtilis*. Còn kháng sinh chuẩn để tham chiếu có thể dùng ampicilin hoặc kháng sinh khác thích hợp.
- Phương pháp đánh giá định lượng tác dụng kháng khuẩn của cao B so với streptomycin (hoặc một kháng sinh khác thích hợp) trên *Klebsiella pneumoniae* dùng kỹ thuật khoanh giấy trong môi trường đặc. Cách thức tiến hành cũng như mục 3.1, nhưng thay môi trường thạch có vi khuẩn *S. aureus* bằng một trường thạch có vi khuẩn *K. pneumoniae*. Còn kháng sinh chuẩn để tham chiếu có thể dùng streptomycin hoặc kháng sinh khác thích hợp.

3.2. Phương pháp đánh giá định lượng sơ bộ có so sánh

Đây là phương pháp xác định đường kính vòng vô khuẩn của thuốc nghiên cứu so với kháng sinh chuẩn để tham chiếu. Cách này ở ta và nhiều nước khác trên thế giới vẫn hay dùng. Ví dụ, nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của cao B so với ampicilin trên *S. aureus* dùng kỹ thuật khoanh giấy trong môi trường đặc.

3.2.1. Phương tiện dụng cụ

Như mục 3.1.1.

3.2.2. Bước chuẩn bị

- Chuẩn bị mẫu thử: Vấn đề là phải phán đoán dùng nồng độ cao B cho thích hợp để tạo ra được đường kính vòng vô khuẩn chấp nhận được. Có thể thử với 1 nồng độ, nhưng trong ví dụ này, ta dùng 2 nồng độ của cao B khác nhau là 25 mg/ml và 50 mg/ml.
- Chuẩn bị dung dịch kháng sinh chuẩn: Ví dụ, ta dùng nồng độ ampicilin là 8 µg/ml. Ta dùng thêm một ống đựng nước cất nữa. Như vậy, ta có 4 ống, mỗi ống pha chế 1 ml dung dịch thử.
 - Ống 1, dung dịch cao B, nồng độ $C_1 = 25$ mg/ml
 - Ống 2, dung dịch cao B, nồng độ $C_2 = 50$ mg/ml
 - Ống 3, dung dịch kháng sinh, nồng độ $K = 8$ µg/ml
 - Ống 4 đựng 1 ml nước cất.
- Việc chuẩn bị hỗn dịch canh khuẩn gốc, chuẩn bị môi trường thạch nền, chuẩn bị môi trường thạch dinh dưỡng và chuẩn bị môi trường thạch dinh dưỡng có vi khuẩn được tiến hành như mục 3.1.2.
- Chuẩn bị các khoanh giấy tẩm thuốc.

Trước hết, sấy khô các khoanh giấy trong tủ sấy ở 105°C trong 1 giờ. Để nguội. Cho vào mỗi ống nghiệm trong 4 ống ở trên, 6 khoanh giấy thấm dầm trong dung dịch. Lấy các khoanh giấy ra. Các khoanh giấy ở mỗi ống nghiệm được gấp ra, đặt riêng rẽ trên một phiến kính có đánh dấu 1, 2, 3 và 4, ứng với các số ở các ống nghiệm, rồi cho vào tủ ẩm ở 37°C trong 15 phút để cho khô.

3.2.3. Tiến hành

- *Cách thứ nhất:* Dùng 6 đĩa Petri và tiến hành như mục 3.1.3. Nhưng khác ở chỗ, đáng lẽ mỗi đĩa Petri, đặt 6 khoanh giấy cho 6 dung dịch trong 6 ống thử, thì ở đây, mỗi đĩa Petri chỉ đặt 4 khoanh giấy cho 4 dung dịch ở 4 ống thử.
- *Cách thứ hai:* Mỗi đĩa Petri, đặt 7 khoanh giấy tẩm thuốc. Một khoanh có thể đặt vào giữa đĩa Petri, hoặc nếu khoảng cách giữa các khoanh giấy gần quá, thì phải dùng đĩa Petri có đường kính lớn hơn. Mỗi đĩa Petri đặt 2 khoanh giấy ở ống 1; 2 khoanh giấy ở ống 2; 2 khoanh giấy ở ống 3, xen kẽ nhau và một khoanh ở ống 4.

- *Cách thử ba*: Nếu phương pháp nghiên cứu đã ổn định, thì không cần thử với nước cất ở ống thứ 4 để kiểm tra phương pháp. Mỗi đĩa Petri đặt 6 khoanh giấy, mỗi dung dịch 1, 2 và 3 đặt 2 khoanh xen kẽ nhau.

3.2.4. Đọc và tính kết quả

Thực hiện như mục 3.1.4. Ví dụ, sau khi đo đường kính vòng vô khuẩn của từng dung dịch thử, rồi tính đường kính vòng vô khuẩn trung bình D ($n = 6$) theo $M \pm SD$, ta được các trị số như sau:

- | | |
|---|-------------------|
| - D của ống 1 dung dịch cao B nồng độ 25 mg/ml: | $15,2 \pm 1,7$ mm |
| - D của ống 2 dung dịch cao B nồng độ 50 mg/ml: | $17,1 \pm 2,1$ mm |
| - D của ống 3 dung dịch ampicilin 8 μ g/ml: | $23,9 \pm 1,8$ mm |

3.2.5. Kết luận

Đã nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của cao B có so sánh với ampicilin trên *Staphylococcus aureus*, dùng kỹ thuật khoanh giấy trên môi trường thạch. Kết quả cho thấy, cao B có tác dụng kháng khuẩn vừa phải, với nồng độ dịch thử là 25 mg/ml, đường kính vòng vô khuẩn đạt $15,2 \pm 1,7$ mm; còn ở nồng độ 50 mg/ml, đường kính vòng vô khuẩn là $17,1 \pm 2,1$ mm. Cả 2 nồng độ của cao B đều yếu hơn ampicilin nồng độ 8 μ g/ml (có đường kính vòng vô khuẩn $23,9 \pm 1,8$ mm).

3.3. Phương pháp đánh giá định lượng sơ bộ không có so sánh

Một số công trình nghiên cứu ở Việt Nam trước đây còn tiến hành theo cách chỉ xác định vòng vô khuẩn của thuốc nghiên cứu, không so sánh với kháng sinh nào. Ví dụ, nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của cao B trên *S. aureus* dùng kỹ thuật khoanh giấy trên môi trường đặc.

3.3.1. Phương tiện dụng cụ

Xem mục 3.1.1.

3.3.2. Bước chuẩn bị

- Chuẩn bị mẫu thử: Trong một số công trình, chỉ xác định tác dụng kháng khuẩn của một nồng độ chất thử. Nhưng ở đây, xin nêu cách nghiên cứu dùng 2 nồng độ chất thử. Ví dụ, thử tác dụng kháng khuẩn của cao B, với 2 nồng độ là 25 mg/ml và 50 mg/ml.
- Chuẩn bị dung dịch kháng khuẩn chuẩn: Không làm.
- Như vậy, ta có 3 ống, mỗi ống pha 1 ml dung dịch thử:

- Ống 1, dung dịch cao B, nồng độ $C_1 = 25 \text{ mg/ml}$
 - Ống 2, dung dịch cao B, nồng độ $C_2 = 50 \text{ mg/ml}$
 - Ống 3 đựng 1 ml nước cất.
- Việc chuẩn bị hỗn dịch canh khuẩn gốc, chuẩn bị môi trường thạch nền, chuẩn bị môi trường thạch dinh dưỡng và chuẩn bị môi trường thạch dinh dưỡng có vi khuẩn được tiến hành như mục 3.1.2.
- Chuẩn bị các khoan giấy tẩm thuốc:
- Trước hết, sấy khô các khoan giấy trong tủ sấy ở 105°C trong 1 giờ. Để nguội. Cho vào mỗi ống nghiệm trong 3 ống ở trên, 6 khoan giấy thấm đẫm trong dung dịch. Lấy các khoan giấy ra. Các khoan giấy ở mỗi ống nghiệm được gấp ra, đặt riêng rẽ trên một phiến kính có đánh dấu 1, 2 và 3, ứng với các số ở các ống nghiệm, rồi cho vào tủ ẩm ở 37°C trong 15 phút để cho khô.

3.3.3. Tiến hành

- *Cách thứ nhất:* Dùng 2 đĩa Petri, mỗi đĩa đặt 7 khoan giấy tẩm thuốc. Khoan thứ 7 có thể đặt vào giữa đĩa Petri, hoặc nếu khoảng cách giữa các khoan giấy gần quá, thì phải dùng đĩa Petri có đường kính lớn hơn. Mỗi đĩa Petri đặt 3 khoan giấy ở ống 1, 3 khoan giấy ở ống 2 xen kẽ nhau và một khoan ở ống 3.
 - *Cách thứ hai:* Nếu phương pháp nghiên cứu đã ổn định, thì không cần thử với nước cất ở ống thứ 3 để kiểm tra phương pháp. Mỗi đĩa Petri đặt 6 khoan giấy, mỗi dung dịch 1 và 2 đặt 3 khoan xen kẽ nhau. Như vậy, chỉ cần 2 đĩa Petri.
 - *Cách thứ ba:* Nếu dùng 3 đĩa Petri, thì mỗi đĩa đặt 2 khoan giấy ở dung dịch 1, 2 khoan giấy ở dung dịch 2, và 1 khoan giấy ở dung dịch 3.
- Cách thức tiến hành cũng như mục 3.1.3.

3.3.4. Đọc và tính kết quả

Thực hiện như mục 3.1.4. Ví dụ, sau khi đo đường kính vòng vô khuẩn của từng dung dịch thử, rồi tính đường kính vòng vô khuẩn trung bình D ($n = 6$) theo $M \pm SD$, ta được các trị số như sau:

- D của ống 1, dung dịch cao B nồng độ 25 mg/ml : $15,2 \pm 1,7 \text{ mm}$
- D của ống 2, dung dịch cao B nồng độ 50 mg/ml : $17,1 \pm 2,1 \text{ mm}$.

3.3.5. Kết luận

Đã nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của cao B trên *Staphylococcus aureus*, dùng kỹ thuật khoanh giấy trên môi trường thạch. Kết quả cho thấy, cao B có tác dụng kháng khuẩn vừa phải, với nồng độ dịch thử là 25 mg/ml, đường kính vòng vô khuẩn đạt $15,2 \pm 1,7$ mm; còn ở nồng độ 50 mg/ml, đường kính vòng vô khuẩn là $17,1 \pm 2,1$ mm.

3.4. Phương pháp đánh giá tác dụng kháng khuẩn của các dạng chiết khác nhau từ một dược liệu

Ta có thể nghiên cứu xem dạng thuốc nào, phân đoạn chiết nào hoặc hợp chất chiết nào của một dược liệu A có tác dụng kháng khuẩn mạnh hơn, để từ đó cho ta phương hướng nên dùng dạng chiết nào để chế ra thuốc. Ví dụ, ta có dược liệu A. Từ A, ta đã chiết được các dạng chiết sau:

- Dạng chiết với nước bằng cách sắc, được cao lỏng 1:1 (xem mục 1.3.1).
- Dạng chiết với cồn để được cao lỏng 1:1 (xem mục 1.3.1).
- Dạng cao khô (1 g cao tương đương 12 g dược liệu khô), tức là hàm lượng cao chiết được từ dược liệu A là 8,3%.
- Phân đoạn chiết flavonoid tổng số, hàm lượng flavonoid tổng số chiết được là 2,4%.
- Một flavonoid tinh khiết F, hàm lượng F trong dược liệu A là 0,8%.

3.4.1. Phương tiện dụng cụ

Xem mục 3.1.1.

3.4.2. Bước chuẩn bị

Như mục 3.1.2. chỉ khác ở phần chuẩn bị mẫu thử.

- Chuẩn bị mẫu thử: Giả thiết, ta đã biết dạng chiết nước (cao lỏng) với tỷ lệ 1:2 có tác dụng ức chế vi khuẩn *S. aureus*. Tỷ lệ 1:2 tính theo dược liệu khô là 0,5 g/ml. Để dễ đánh giá các dạng chiết với nhau, ta nên dùng nồng độ của các dạng chiết khác nhau, tính theo dược liệu khô đều là 0,5 g/ml. Mỗi dung dịch thử cần pha chế 1 ml đựng trong ống nghiệm. Cụ thể là:
 - Ống 1, dịch chiết nước, dùng tỷ lệ cao lỏng 1:2.
 - Ống 2, dịch chiết cồn, dùng tỷ lệ cao lỏng 1:2.
 - Ống 3, cao khô, dùng nồng độ 42 mg/ml.
 - Ống 4, flavonoid tổng số, dùng nồng độ 12 mg/ml.

- Ống 5, hợp chất F, dùng nồng độ 4 mg/ml.
- Ống 6, dùng nước cất để kiểm tra phương pháp.
- Chuẩn bị dung dịch kháng sinh chuẩn: Không làm.
- Việc chuẩn bị hỗn dịch canh khuẩn gốc, chuẩn bị môi trường thạch nền, chuẩn bị môi trường thạch dinh dưỡng và chuẩn bị môi trường thạch dinh dưỡng có vi khuẩn được tiến hành như mục 3.1.2.
- Chuẩn bị các khoanh giấy tẩm thuốc.

Tiến hành như mục 3.1.2. Trước hết, sấy khô các khoanh giấy trong tủ sấy ở 105°C trong 1 giờ. Để nguội. Cho vào mỗi ống nghiệm trong 6 ống ở trên, 6 khoanh giấy thấm đẫm trong dung dịch. Lấy các khoanh giấy ra. Các khoanh giấy ở mỗi ống nghiệm được gấp ra, đặt riêng rẽ trên một phiến kính có đánh dấu 1, 2, 3, 4, 5 và 6, ứng với các số ở các ống nghiệm, rồi cho vào tủ ẩm ở 37°C trong 15 phút để cho khô.

3.4.3. Tiến hành

Cách thức tiến hành cũng như mục 3.1.3.

3.4.4. Đọc và tính kết quả

Thực hiện như mục 3.1.4. Ví dụ, sau khi đo đường kính vòng vô khuẩn của từng dung dịch thử, rồi tính đường kính vòng vô khuẩn trung bình D ($n = 6$) theo $M \pm SD$, ta được các trị số như sau:

- D của ống 1, dịch chiết nước, dùng tỷ lệ 1:2 là: $15,6 \pm 2,2$ mm
- D của ống 2, dịch chiết cồn, dùng tỷ lệ 1:2 là: $17,8 \pm 2,1$ mm
- D của ống 3, cao khô với nồng độ 42 mg/ml là: $15,3 \pm 1,6$ mm
- D của ống 4, flavonoid tổng số, 12 mg/ml là: $18,4 \pm 1,8$ mm
- D của ống 5, chất F dùng nồng độ 4 mg/ml là: $15,1 \pm 1,4$ mm

Do ta đã thử với cùng một nồng độ tính theo dược liệu khô là 0,5 g/ml, ta thấy, dạng chiết flavonoid tổng số có tác dụng mạnh nhất, sau đó, đến dạng dịch chiết cồn, còn các dạng dịch chiết nước, cao khô và chất F có tác dụng thấp xấp xỉ nhau.

3.4.5. Bàn luận và kết luận

Đã nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của một số dạng chiết từ dược liệu A trên *Staphylococcus aureus*, dùng kỹ thuật khoanh giấy trên môi trường thạch. Kết quả cho thấy:

- Phân đoạn flavonoid tổng số có tác dụng mạnh nhất, mạnh hơn chất F (cũng là một flavonoid); điều đó chứng tỏ, trong hỗn hợp flavonoid tổng số, ngoài chất F, còn một số flavonoid khác, cũng có tác dụng kháng khuẩn.
- Phân đoạn flavonoid tổng số có tác dụng mạnh hơn cao khô, dịch chiết nước và dịch chiết cồn: có lẽ trong cao khô, dịch chiết nước và dịch chiết cồn có một số tạp chất, ảnh hưởng đến tác dụng kháng khuẩn của flavonoid, là do các tạp chất này làm giảm tác dụng kháng khuẩn của flavonoid.
- Dịch chiết cồn có tác dụng mạnh hơn dịch chiết nước, có lẽ khi chiết cồn, flavonoid tách ra được nhiều hơn, còn lại trong bã ít hơn so với khi chiết nước.
- Dịch chiết nước có tác dụng kháng khuẩn mạnh hơn cao khô, có lẽ cao khô này cũng được chiết bằng cách sắc với nước, và trong quá trình làm thành cao khô, đã có một số flavonoid có tác dụng kháng khuẩn bị hư hao hoặc bị biến chất.

Từ kết quả thu được, ta thấy, nếu chế tạo thuốc từ dược liệu A với mục đích làm thuốc kháng khuẩn tác động trên *S. aureus* thì nên chiết ra dưới dạng flavonoid tổng số.

IV. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN BẰNG KỸ THUẬT DÙNG ỐNG TRỤ TRÊN MÔI TRƯỜNG ĐẶC

Cũng như kỹ thuật dùng khoan giấy (xem mục 3), nguyên tắc của phương pháp là xác định khả năng của thuốc, cho vào trong ống trụ, khuếch tán vào lớp thạch, gây ức chế sự phát triển của vi khuẩn ở xung quanh ống trụ đựng thuốc. Vùng ức chế càng lớn thì tác dụng của thuốc càng mạnh.

Về cách thức nghiên cứu, cũng như phương pháp dùng khoan giấy, có thể có nhiều phương pháp nghiên cứu.

- Phương pháp đánh giá định lượng về tác dụng kháng khuẩn (giống như mục 3.1).
- Phương pháp đánh giá định lượng sơ bộ có so sánh (giống như mục 3.2).
- Phương pháp đánh giá định lượng sơ bộ không có so sánh (giống như mục 3.3).
- Phương pháp đánh giá tác dụng kháng khuẩn của các chất chiết khác nhau từ một dược liệu (giống như mục 3.4).

Sự khác nhau chỉ là ở chỗ, ở đây, ta đã thay thế khoanh giấy tẩm thuốc (ở mục 3) bằng ống trụ đựng dung dịch thuốc. Cách tiến hành như sau:

- Về "Phương tiện dụng cụ", cũng giống như các mục 3.1.1, 3.2.1, 3.3.1 hoặc 3.4.1, nhưng thay các khoanh giấy bằng các ống trụ rỗng 2 đầu, bằng thép không gỉ, bằng thủy tinh hoặc bằng sứ, có đường kính ngoài là 8 mm; đường kính trong là 6 mm và chiều cao là 9 - 10 mm.
- Về "Bước chuẩn bị", cũng như các mục 3.1.2, 3.2.2, 3.3.2 và 3.4.2, nhưng không có bước "Chuẩn bị các khoanh giấy tẩm thuốc", mà chỉ chuẩn bị các dung dịch thử trong các ống nghiệm và ống nước cất.
- Về "Tiến hành", cũng như các mục 3.1.3, 3.2.3, 3.3.3 và 3.4.3, nhưng thay cho việc đặt các khoanh giấy tẩm thuốc trên mặt thạch, ta làm như sau:

Đặt các ống trụ lên mặt thạch, ở các vị trí như khi đặt các khoanh giấy. Nhỏ thuốc nghiên cứu vào trong ống trụ: ống trụ ở vị trí số 1, nhỏ dung dịch 1; ống trụ ở vị trí số 2, nhỏ dung dịch 2... cho đến hết.

Đậy nắp đĩa Petri lại. Thông thường, không cần phải cho các hộp Petri vào tủ lạnh ở 4°C trong 1 giờ, mà cho ngay vào tủ ấm 37°C để cho vi khuẩn phát triển trong 24 giờ.

- Về "Đọc kết quả", cũng giống như các mục 3.1.4, 3.2.4, 3.3.4 và 3.4.4.
- Về "Kết luận", cũng giống như các mục 3.1.5, 3.2.5, 3.3.5 và 3.4.5.

V. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN DÙNG KỸ THUẬT HỆ NỒNG ĐỘ TRONG MÔI TRƯỜNG LỎNG

Nguyên tắc của phương pháp này là dùng hàng loạt ống nghiệm chứa môi trường lỏng, có chất dinh dưỡng thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn định nghiên cứu. Thêm những nồng độ khác nhau của thuốc nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn vào các ống. Xác định nồng độ thấp nhất của thuốc ức chế được sự phát triển của vi khuẩn. Nồng độ này được gọi là nồng độ tối thiểu ức chế (MIC: Minimal inhibitory concentration). Phương pháp này còn được gọi là kỹ thuật hòa loãng 2 lần liên tiếp (Two-fold serial dilution) hoặc phương pháp hệ nồng độ.

Ví dụ, xác định nồng độ tối thiểu ức chế vi khuẩn (MIC) của hợp chất tinh khiết H, chiết được từ dược liệu A, với hàm lượng 0,2% trên 10 loại vi khuẩn như ở mục 2 gồm:

5 vi khuẩn Gram dương

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus faecalis*

5 vi khuẩn Gram âm

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Klebsiella pneumoniae*

- | | |
|----------------------------------|---------------------------------|
| - <i>Bacillus subtilis</i> | - <i>Escherichia coli</i> |
| - <i>Enterococcus faecium</i> | - <i>Proteus mirabilis</i> |
| - <i>Clostridium perfringens</i> | - <i>Salmonella typhimurium</i> |

Để tiến hành có bài bản, trước hết, ta cũng nên "Định tính" để thăm dò xem H có tác dụng trên vi khuẩn nào trong số 10 vi khuẩn trên, như ở mục 2. Sau khi xác định được, ví dụ, H không có tác dụng trên 7 loại vi khuẩn, mà chỉ có tác dụng trên 3 loại là *S. aureus*, *B. subtilis* và *K. pneumoniae*. Như thế, ta chỉ còn cần nghiên cứu tác dụng của H trên 3 loại vi khuẩn, dùng kỹ thuật hệ nồng độ trong môi trường lỏng.

Dưới đây, xin nêu phương pháp xác định MIC của H trên *S. aureus*; còn cách xác định MIC của H trên *B. subtilis* và trên *K. pneumoniae* cũng được tiến hành theo cách tương tự.

5.1. Phương tiện dụng cụ

- Ống nghiệm có đường kính 10 mm và dài 100 mm
- Ống hút chia độ, ống đong chia độ
- Bình đựng các môi trường lỏng
- Tủ ấm 37°C để ủ cho vi khuẩn phát triển
- Tủ sấy để tiệt trùng
- Dung dịch NaCl 0,9%
- Dung dịch NaOH 1N
- Dung dịch HCl 1N

5.2. Bước chuẩn bị

- Chuẩn bị mẫu thử: Vì chất thử ở đây là hợp chất tinh khiết, nên ta pha dung dịch gốc là 10 mg/ml (xem mục 1.3.3).
- Chuẩn bị canh khuẩn gốc (xem mục 1.5).
- Chuẩn bị môi trường lỏng dinh dưỡng M (xem mục 1.4).
- Chuẩn bị môi trường lỏng dinh dưỡng có vi khuẩn M_v : Ngay trước khi thí nghiệm mới pha môi trường M_v . Cho canh khuẩn gốc vào môi trường lỏng dinh dưỡng M, sao cho 1 ml môi trường lỏng dinh dưỡng M_v chứa 500 000 tế bào vi khuẩn. Ví dụ, nếu ta có canh khuẩn gốc 100 triệu tế bào vi khuẩn trong 1 ml, lấy 250 μ l canh khuẩn gốc (có 25 triệu tế bào vi khuẩn), cho vào bình đã có 49 ml môi trường lỏng M. Khuấy đều.

5.3. Tiến hành

Chuẩn bị hàng loạt ống nghiệm. Ở ống 1, cho vào 1,8 ml, còn từ ống 2 trở đi, mỗi ống 1 ml môi trường lỏng dinh dưỡng M. Thêm vào ống 1 là 0,2 ml dung dịch mẫu thử (10 mg/ml). Lắc đều, ta sẽ được môi trường lỏng có nồng độ chất H là 1 mg/ml. Lấy 1 ml từ ống 1 cho sang ống 2. Lắc đều, ta sẽ được môi trường lỏng có nồng độ chất H là 500 µg/ml. Cứ tiếp tục làm như thế cho đến ống thứ 6 thì thôi chẳng hạn. Lúc này, ống 6 có 2 ml. Hút lấy 1 ml bỏ đi. Như vậy, ta được 6 ống, mỗi ống có 1 ml:

- ống 1, nồng độ chất H là 1000 µg/ml
- ống 2, nồng độ chất H là 500 µg/ml
- ống 3, nồng độ chất H là 250 µg/ml
- ống 4, nồng độ chất H là 125 µg/ml
- ống 5, nồng độ chất H là 62,5 µg/ml
- ống 6, nồng độ chất H là 31,25 µg/ml
- ống 7, có 1 ml môi trường lỏng M, không có thuốc.

Thêm vào các ống từ 1 đến 7, mỗi ống 1 ml môi trường có vi khuẩn M_v (có 500 000 tế bào vi khuẩn trong 1 ml). Lắc đều. Như vậy, lúc này, 1 ml dịch môi trường ở mỗi ống đều có 250 000 tế bào vi khuẩn. Cho tất cả các ống vào tủ ấm 37°C và ủ trong 24 giờ. Cứ 2 - 3 giờ lại lắc một lần, trừ buổi tối.

5.4. Đọc kết quả

- Sau khi ủ được 24 giờ, lấy các ống nghiệm ra và đọc kết quả. Ống có nồng độ thuốc thấp nhất mà vi khuẩn không phát triển được thì đó là MIC của chất H. Nhìn chung, có thể nhìn bằng mắt thường cũng có thể nhận định được. Tuy nhiên, để có thể phát hiện rõ hơn sự phát triển của vi khuẩn, ta nhỏ vào mỗi ống 1 giọt chỉ thị màu TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride). Lắc đều, rồi quan sát. Ví dụ, ở các ống số 6 và 7, vi khuẩn phát triển được, còn từ ống số 5 trở lên vi khuẩn không phát triển được, thì MIC của chất H trên *S. aureus* là 62,5 µg/ml.

5.5. Kết luận

Đã nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của chất H, được chiết từ dược liệu A, dùng kỹ thuật hệ nồng độ trong môi trường lỏng, thấy MIC của H trên *S. aureus* là 62,5 µg/ml.

5.6. Ghi chú

- Ống 7 là ống để kiểm tra, vi khuẩn phải phát triển được. Nếu vi khuẩn không phát triển được trong ống 7, thì kết quả nghiên cứu không có giá trị.
- Nếu ống 6 vi khuẩn cũng không phát triển được (tất nhiên ở ống 7 vi khuẩn phải phát triển được), thì chứng tỏ thuốc H có tác dụng mạnh, phải làm lại thí nghiệm với nồng độ của H thấp hơn.
- Để cho kết quả tin cậy hơn, người ta thường tiến hành 3 loạt thí nghiệm như trên cùng một lúc. Nếu cả 3 kết quả đều như nhau, thì mức độ tin cậy cao. Nếu kết quả khác nhau ở 2 nồng độ kế tiếp, thì lấy trị số trung bình của 3 MIC. Còn nếu kết quả khác nhau nhiều thì phải làm lại thí nghiệm.
- Cũng theo cách thức như trên, ta tiến hành với các vi khuẩn *B. subtilis* và *K. pneumoniae*.
- Để đánh giá tốt hơn, ta có thể so sánh với một kháng sinh chuẩn để tham chiếu. Cách chọn kháng sinh tham chiếu xem mục 2.5. Ví dụ, khi thử trên *S. aureus*, ta chọn ampicilin chẳng hạn. Phải tiến hành xác định MIC với kháng sinh tham chiếu ampicilin này trong cùng những điều kiện như tiến hành với mẫu thuốc H. Sau khi xác định được MIC của ampicilin, ví dụ 2 µg/ml, ta thấy ngay tác dụng của 62,5 µg chất H tương đương với 2 µg ampicilin. Từ đó tính ra được 1 mg chất H tương đương với 32 µg ampicilin; hoặc ngược lại, 1 mg ampicilin bằng 31,25 mg chất H.

VI. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN DÙNG KỸ THUẬT VI ĐỊNH LƯỢNG TRONG VI MÔI TRƯỜNG LỎNG (MICROBROTH MICROTITRE TECHNIQUE)

Kỹ thuật này, về nguyên tắc, chủ yếu cũng như kỹ thuật hòa loãng 2 lần liên tiếp, nhưng phải có dàn máy ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: Thử nghiệm miễn dịch gắn enzym), nên hiện đại hơn, nhạy hơn, nhanh hơn, tự động, tiết kiệm và có tính định lượng cao hơn, so với kỹ thuật hệ nồng độ thông thường ở những điểm sau:

- Kỹ thuật thông thường chỉ dùng một hoặc vài ba dãy thí nghiệm, trong khi ở đây dùng 8 dãy thí nghiệm.
- Kỹ thuật thông thường chỉ dùng 6 - 8 độ pha loãng khác nhau của chất thử, còn ở đây, có thể dùng đến 11 độ pha loãng.

- Kỹ thuật thông thường đọc kết quả bằng mắt thường (có thể cho thêm chỉ thị TTC), nhưng ở đây, được xác định bằng cách đo mật độ quang học ở bước sóng 492 nm của dàn máy ELISA.

Ta trở lại ví dụ trên, xác định MIC của chất S trên *A. aureus*.

6.1. Phương tiện dụng cụ

Như mục 5.1, nhưng phải có dàn máy ELISA. Trong dàn máy ELISA đã có một số dụng cụ, nên không cần phải có một số thứ như các ống nghiệm dùng cho hệ pha loãng, vì ở đây, đã có khay 96 giếng; có máy ủ, nên không cần phải có tủ ấm...

6.2. Bước chuẩn bị

- Chuẩn bị mẫu thử: Như trong mục 5.2 để được dung dịch gốc của H là 10 mg/ml (Nếu phán đoán thuốc có tác dụng yếu, thì pha dung dịch gốc 20 mg/ml).
- Chuẩn bị canh khuẩn gốc như trong mục 5.2 (xem cả mục 1.5).
- Chuẩn bị môi trường lỏng dinh dưỡng M, như trong mục 5.2 (xem thêm mục 1.4). Cần khoảng 40 ml.
- Chuẩn bị môi trường lỏng có vi khuẩn M_v như trong mục 5.2, nhưng thể tích môi trường M_v chỉ cần khoảng 4 ml. Mỗi ml môi trường M_v có 500 000 tế bào vi khuẩn (5×10^5 c.f.u). Tùy trường hợp, có khi phải dùng đến 1 triệu tế bào vi khuẩn trong 1 ml hoặc hơn.

6.3. Tiến hành

Lấy khay 96 giếng (12 x 8) ở dàn máy ELISA, ta thấy có 8 dãy và 12 hàng. Trước hết, ở 8 giếng của hàng 1, lấy micropipet 8 răng, hút lấy ở mỗi răng 270 μ l môi trường lỏng M cho vào mỗi giếng. Cũng dùng micropipet 8 răng, nhưng chỉ hút mỗi răng 150 μ l môi trường M, cho vào tất cả 88 giếng còn lại (8 dãy x 11 hàng). Sau đó, lấy micropipet 8 răng, hút mỗi răng 30 μ l dung dịch mẫu thử gốc của H (ví dụ, 10 mg/ml) và cho vào mỗi trong 8 giếng của hàng 1 đã có sẵn 270 μ l môi trường M. Trộn đều, bằng cách lấy micropipet hút vào, rồi lại đẩy ra vài lần. Như vậy, nồng độ của H trong các giếng của hàng 1 là 1 mg/ml.

Lấy micropipet 8 răng, hút lấy 150 μ l ở mỗi giếng của hàng 1 chuyển sang hàng 2. Trộn đều như trên. Như vậy, nồng độ chất H trong 8 giếng của hàng 2 là 500 μ g/ml. Tiếp tục làm như vậy cho đến hàng 11. Trộn đều. Dùng micropipet

8 răng, hút ở mỗi giếng của hàng 11 là 150 μ l, rồi bỏ đi. Như vậy, ta có 8 dãy và 12 hàng giếng, mỗi giếng đều có 150 μ l.

- | | |
|--|-----------------|
| - Hàng 1, nồng độ của H là | 1000 μ g/ml |
| - Hàng 2, nồng độ của H là | 500 μ g/ml |
| - Hàng 3, nồng độ của H là | 250 μ g/ml |
| - Hàng 4, nồng độ của H là | 125 μ g/ml |
| - Hàng 5, nồng độ của H là | 63 μ g/ml |
| - Hàng 6, nồng độ của H là | 32 μ g/ml |
| - Hàng 7, nồng độ của H là | 16 μ g/ml |
| - Hàng 8, nồng độ của H là | 8 μ g/ml |
| - Hàng 9, nồng độ của H là | 4 μ g/ml |
| - Hàng 10, nồng độ của H là | 2 μ g/ml |
| - Hàng 11, nồng độ của H là | 1 μ g/ml |
| - Hàng 12, là các giếng làm chứng, không có thuốc H. | |

Thêm vào tất cả 96 giếng, mỗi giếng 20 μ l môi trường dinh dưỡng có vi khuẩn M_v (10^5 cfu trong 1 ml). Cho khay ELISA vào "Máy ủ-lắc", Model: IEMS Incubator, Hãng: Thermo-Lab-Systems, Phần Lan. Trước hết, cài đặt nhiệt độ ủ ở 37°C, thời gian ủ là 24 giờ, cứ mỗi giờ lắc 30 giây. Sau khi đã cài đặt xong, ấn nút "START" để bắt đầu.

6.4. Đọc kết quả

Đọc trên máy đọc ELISA tự động, Model: Multiskan Ascent, Hãng Thermo-Lab-Systems, Phần Lan, dựa vào mật độ quang học ở 492 nm, sẽ xác định được MIC của H. Ví dụ, xác định được MIC của H trên *S. aureus* là 43 μ g/ml, là MIC trung bình của 8 dãy.

6.5. Kết luận

Đã nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của chất H được chiết từ dược liệu A dùng kỹ thuật vi định lượng trong vi môi trường lỏng dùng máy ELISA của hãng Thermo-Lab-Systems, Phần Lan, thấy MIC của H trên *S. aureus* là 43 μ g/ml.

6.6. Ghi chú

- Các giếng ở hàng 12 không có chất H là các giếng để kiểm tra, vi khuẩn phải phát triển được. Nếu vi khuẩn không phát triển được trong các giếng ở dãy 12, thì kết quả nghiên cứu không có giá trị.

- Nền so sánh với một kháng sinh chuẩn để tham chiếu. Cách chọn kháng sinh tham chiếu xem mục 2.5. Ví dụ, khi thử trên *S. aureus*, ta chọn ampicilin chẳng hạn. Ta tiến hành song song một khay ELISA để thử với ampicilin. "Máy ủ lắc" IEMS Incubator của hãng Thermo-Lab-Systems có thể ủ lắc 3 khay đồng thời. Nếu pha để nồng độ ampicilin ở hàng 1 là 500 $\mu\text{g/ml}$, ta sẽ có nồng độ ampicilin ở các hàng 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 và 11 lần lượt là 250; 125; 63; 32; 16; 8; 4; 2; 1; và 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Các giếng ở hàng 12 không có thuốc H mà cũng không có ampicilin là để kiểm tra phương pháp. Rồi tiến hành như mục 6.3. Giả thiết, xác định được MIC của chất H là 62,5 $\mu\text{g/ml}$ và của ampicilin là 4 $\mu\text{g/ml}$. Ta tính ra được 1 mg chất H có tác dụng tương đương 64 μg ampicilin; hoặc ngược lại, 1 mg ampicilin tương đương 15,6 mg chất H.

VII. PHƯƠNG PHÁP SINH TỰ KÝ (BIOAUTOGRAPHY)

Khi đã xác định được dịch chiết toàn phần của một dược liệu A có tác dụng kháng khuẩn trên một loại vi khuẩn V nào đó. Nếu muốn xác định xem thành phần nào trong dược liệu A đó có tác dụng, thì có thể phân lập ra một số dạng chiết khác nhau, rồi đem thử với vi khuẩn V đó, như mục 3.4, ta sẽ biết được thành phần nào không có tác dụng, thành phần nào có tác dụng và mức độ tác dụng ra sao. Nhưng để thăm dò nhanh hơn, ta có thể dùng phương pháp sinh tự ký.

7.1. Phương tiện dụng cụ

- Tấm kính 10 x 25 cm có tráng sẵn lớp mỏng silicagel. Nếu không, phải có tấm kính và silicagel để tự tráng.
- Tủ sấy
- Tủ ẩm
- Đèn tử ngoại
- Hệ sắc ký
- Micropipet, ống hút
- Bút viết trên kính.

7.2. Bước chuẩn bị

- Chuẩn bị tấm kính có lớp mỏng silicagel.
- Chuẩn bị hệ dung môi để sắc ký. Ví dụ, hệ dung môi toluen: acetone: ethylacetat: acid formic (5:2:2:1).

- Chuẩn bị canh khuẩn gốc, chuẩn bị môi trường thạch dinh dưỡng M, và chuẩn bị môi trường thạch dinh dưỡng có vi khuẩn M, như mục 3.1.2. Môi trường thạch dinh dưỡng có vi khuẩn M, ở đây, nên pha chế để 1 ml môi trường có 500 000 đến 3,5 triệu tế bào vi khuẩn (cfu) tùy theo trường hợp.

7.3. Tiến hành

Dùng tấm kính 10 x 25 cm có tráng sẵn lớp mỏng silicagel. Hoạt hóa tấm kính ở tủ sấy 125°C trong 30 phút hoặc ở 105°C trong 1 giờ. Chấm dịch chiết của A trên tấm kính, rồi sắc ký trên hệ dung môi đã chuẩn bị. Sau khi sắc ký xong, để bay hết dung môi ở nhiệt độ trong phòng. Nếu không đuổi hết dung môi, có thể gây ra hiện tượng dương tính giả sau này.

Trên bản sắc ký, sẽ được các vết chất ở các vị trí khác nhau, tùy theo tính chất của các chất có trong dịch chiết. Để phát hiện các chất rõ hơn, soi bản mỏng dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm hoặc 366 nm. Đánh dấu các vết trên bản mỏng. Thường đánh số vết ở mặt sau lớp mỏng ở mép tấm kính chiếu tương ứng với các vết.

Dùng ống hút, hút môi trường thạch có vi khuẩn M, và láng đều trên mặt lớp mỏng silicagel một lớp mỏng dưới 1 mm. Ủ tấm kính ở 37°C trong 18 - 24 giờ để vi khuẩn phát triển.

7.4. Đọc kết quả

Sau khi ủ được 18 - 24 giờ, lấy tấm kính ra, đọc kết quả. Vùng vết chất nào trên bản mỏng, vi khuẩn không mọc được, thì chất đó có tác dụng kháng khuẩn. Để phát hiện vi khuẩn mọc được dễ hơn, dùng chỉ thị màu TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride). Vùng có màu đỏ là vùng có vi khuẩn phát triển. Vùng vết chất nào đã đánh dấu trên tấm kính mà không bắt màu, thì chất đó có tác dụng kháng khuẩn.

7.5. Kết luận

Từ kết quả thu được, ta rút ra kết luận chất nào có tác dụng, chất nào không có tác dụng.

7.6. Ghi chú

Nếu ta đã có hướng, ví dụ, vết thứ 3 là một chất Q nào đó (ví dụ, chất Quercitrin chẳng hạn), ta có thể chứng minh vết thứ 3 đó có phải đúng là quercitrin hay không bằng phương pháp sinh tự ký. Ta chấm sắc ký chất Q đó ở vị trí ngang hàng với vị trí dịch chiết của A, thì R_f sau sắc ký của chất Q phải bằng R_f của vết thứ 3, và nếu vết thứ 3 có tác dụng kháng khuẩn, thì chất Q cũng phải có tác dụng kháng khuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anderson TG. (1961), An evaluation of antimicrobial susceptibility testing, NXB Plenum Press New York.
2. Bauer AW., Kirby G. (1966), Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, 493-497.
3. CYTED (1995), Bioautografia, trong *Manual de tecnicas de investigacion*, NXB Marzo, 63-70.
4. CYTED (1995), Ensayo de actividad antimicrobiana, trong *Manual de tecnicas de investigacion*, NXB Marzo, 63-70.
5. Dhar ML., Dhar MM., Dhavan BN., Mehrotra BN (1968), Screening of indian plants for biological activity, Part 1, *Indian J. Exp. Biol.*, 6, 232-247.
6. Dược điển Việt Nam 3, (2002), 193-201.
7. Khan ZK. (1997), In vitro and in vivo screening techniques for antibacterial and antifungal activity, trong *International workshop on medicinal plants, their bioactivity screening and evaluation*, 2-5/12/1997, Xuất bản: Centre for science and technology of Non-Aligned and other developing countries và UNIDO (United Nations Industrial Development Organization), 271-286.
8. Mitscher LA., Leu RP., Bathala MS., Wu WN., Beal JL. (1971), Antibiotic agents from higher plants, *Lloydia*, 35 (2), 157-166.
9. Norris JR., Ribbons DW., (1972), Tests using solid media, trong *Methods in microbiology*, NXB Academic Press New York and London, 215-224.
10. Norris JR., Ribbons DW. (1972), Tests in liquid media, trong *Methods in microbiology*, NXB Academic Press New York and London, 224-233.
11. Peterson CA., Edginton LV. (1969), Quantitative estimation of fungicide using a bioautograph technique, *J. Agr. Food Chem.*, 17, 898-902.
12. Rios GL., Recio MC., Villar A, (1988), Screening methods for natural products with antimicrobial activity, *J. Ethnopharmacol.*, 23 (2-3), 127-149.
13. Srivastava OP. (1984), The use of pharmacological techniques for evaluation of natural products, UNESCO workshop 1982, NXB Lucknow Publishing house, 72-77.
14. Vincent JG, Vincent HW. (1944), Filter paper modification of the Oxford cup penicillium determination, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 55, 162-167.

CHƯƠNG 21

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU
TÁC DỤNG KHÁNG VI NẤM***PGS.TSKH. Đỗ Trung Đàm***I. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG VI NẤM *IN VITRO***

Nguyên tắc thử nghiệm, những yếu tố ảnh hưởng và các phương pháp, kỹ thuật nghiên cứu tác dụng kháng vi nấm *in vitro* cũng tương tự như nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn *in vitro*. Vì vậy, khi nghiên cứu tác dụng kháng vi nấm *in vitro*, ta có thể áp dụng như nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn *in vitro*. Tuy nhiên, có một số điểm khác, ta cần thực hiện, nếu không, sẽ không thu được kết quả tốt.

1.1. Về tính tan của chất thử nghiệm

Giống như mục 1.2 của chương "Nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn *in vitro*". Tuy nhiên, trong môi trường nuôi cấy vi nấm, pH tốt nhất cho sự phát triển của nấm là 5,5-6,0 chứ không phải ở pH trung tính như vi khuẩn. Vì thế, khi hòa tan chất thử trong nước hoặc nước muối sinh lý, nếu chất thử khó tan, trước hết, ta acid hóa đến pH 5,5-6,0 bằng acid HCl N. Trong đa số trường hợp, chất thử sẽ tan trong môi trường pH acid này. Chỉ khi acid hóa mà chất thử vẫn không tan, thì mới cần đến các dung môi đặc biệt như DMSO, DMF hoặc PEG.

1.2. Chuẩn bị mẫu thử

Tiến hành giống như mục 1.3 của chương "Nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn *in vitro*". Cũng như trên, nếu chất thử khó tan trong nước, thì trước hết, ta phải acid hóa. Nếu vẫn không tan thì mới dùng đến các dung môi đặc biệt.

1.3. Môi trường

Môi trường nuôi cấy vi nấm khác với môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Có nhiều loại môi trường nuôi cấy vi nấm. Việc lựa chọn môi trường nào là tùy thuộc vào loại nấm thử và bản chất của chất thử. Có những trường hợp đòi hỏi môi trường rất phức tạp. Sau đây là môi trường thông dụng nhất, dùng cho đa số các loại nấm.

Môi trường lỏng Sabouraud

- Glucose	40 g
- Casein pancreatic	5 g
- Pepton	5 g
- Nước vừa đủ	1000 ml

Dun đến sôi, vừa để hòa tan, vừa để diệt trùng. Dùng NaOH N hoặc HCl N để điều chỉnh pH, sao cho pH sau diệt trùng là $5,6 \pm 0,2$.

Môi trường thạch Sabouraud

Thành phần cũng như trên, nhưng thêm thạch 15 g. Dun đến sôi, vừa để hòa tan, vừa để diệt trùng. Dùng NaOH N hoặc HCl N để điều chỉnh pH, sao cho sau diệt trùng pH là $5,6 \pm 0,2$.

1.4. Chuẩn bị chủng vi nấm để thử

Từ ống chủng gốc, cấy vi nấm trên mặt thạch dinh dưỡng. Để ủ ở nhiệt độ 28°C cho nấm phát triển. Đối với nấm là bào tử chồi (blastospore), thường phải ủ 48 giờ; còn đối với sợi nấm (mycelial fungi), loại bào tử dính (conidiospore) thì phải ủ 4-5 ngày. Lấy các bào tử trên mặt thạch, nghiền trong nước muối sinh lý cho đồng nhất, rồi cho vào ống nghiệm đo độ đục. Thêm nước muối sinh lý để được hỗn dịch bào tử nấm, mà mỗi ml có một lượng nhất định c.f.u (colony forming unit = đơn vị tạo khuẩn lạc) dựa vào đo độ đục so với một ống mẫu (ví dụ 500 000 cfu). Hỗn dịch nấm đã được chuẩn hóa số lượng cfu trong 1 ml gọi là canh nấm gốc.

Các vi nấm cần thử, tùy theo yêu cầu của chất thử và điều kiện thử. Theo một tài liệu của Ấn Độ, người ta dùng 5 loại vi nấm sau:

- *Candida albicans*
- *Cryptococcus neoformans*
- *Aspergillus fumigatus*
- *Trichophyton mentagrophytes*

- *Epidermophyton floccosum*

Sau đây là một số loại vi nấm thường được dùng trong thử nghiệm

- *Aspergillus fumigatus*

- *Aspergillus niger*

- *Blastomyces dermatitidis*

- *Candida albicans*

- *Candida lunata*

- *Candida stellatoidea*

- *Coccidioides immitis*

- *Cryptococcus neoformans*

- *Epidermophyton floccosum*

- *Fusarium oxysporum*

- *Histoplasma capsulatum*

- *Malassezia furfur*

- *Microsporum audouinii*

- *Microsporum canis*

- *Microsporum cookei*

- *Microsporum gypseum*

- *Paracoccidioides brasiliensis*

- *Pityrosporum orbiculare*

- *Saccharomyces cerevisiae*

- *Sporothrix schenckii*

- *Trichophyton gallinae*

- *Trichophyton menginii*

- *Trichophyton mentagrophytes*

- *Trichophyton rubrum*

- *Trichophyton schoenleinii*

- *Trichophyton tonsurans*

- *Trichophyton verrucosum*

- *Trichothecium roseum*

1.5. Nhiệt độ ủ và thời gian ủ

Phải đảm bảo nhiệt độ ủ theo đúng yêu cầu của từng loại nấm. Trong đa số trường hợp, thường ủ ở nhiệt độ $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Về thời gian ủ, nếu là bào tử chồi thì ủ trong 24-48 giờ, còn sợi nấm thì thời gian ủ là 72-96 giờ.

II. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG VI NẤM *IN VIVO*

Sau khi nghiên cứu, đã xác định thấy một chất nào đó (dịch chiết, cao, phân đoạn chiết hoặc hợp chất tinh khiết) có tác dụng kháng vi nấm *in vitro*, cần nghiên cứu *in vivo* trước khi dùng cho người. Thử *in vivo*, vừa để xác định tác dụng kháng vi nấm trên động vật thí nghiệm, vừa xác định độc tính khi ta thử trên con vật với các kiểu dạng nhiễm vi nấm khác nhau. Các động vật thử thường dùng những loại động vật sau:

- Chuột nhắt trắng 18 – 20 g, 4 – 6 tuần tuổi.
- Chuột lang 300 – 350 g.
- Thỏ 2,0 – 2,5 kg
- Khỉ rhesus 3 – 5 kg.

Động vật được nhốt trong chuồng vô trùng, đúng quy cách, và nuôi bằng thức ăn vô trùng và nước uống vô trùng để không đưa thêm các tạp nấm khác vào.

Sau đây là một số mô hình thử tác dụng kháng vi nấm (bảng dưới). Tùy theo chủng vi nấm gây ra các bệnh vi nấm gì mà ta dùng động vật thí nghiệm cho phù hợp.

Những mô hình thử tác dụng kháng vi nấm

Mô hình bệnh vi nấm	Chủng nấm thử	Động vật thử
Nhiễm vi nấm trên da		
Bệnh nấm da Candida	CA	Chuột lang
Bệnh nấm da Trichophyton	TM	Chuột lang
Bệnh nấm da Epidermophyton	EF	Chuột lang
Bệnh nấm da Microsporum	MC	Chuột lang
Nhiễm vi nấm toàn thân		
Bệnh nhiễm Candida	CA	Chuột nhắt
Bệnh nhiễm Aspergillus	AF	Chuột nhắt
Bệnh nhiễm Histoplasma	HC	Chuột nhắt

(tiếp theo)

Mô hình bệnh vi nấm	Chủng nấm thử	Động vật thử
Nhiễm vi nấm màng não		
Bệnh nhiễm Cryptococcus	CN	Chuột nhắt
	CN	Khỉ Rhesus
Nhiễm vi nấm âm hộ, âm đạo		
Bệnh nhiễm Candida	CA	Chuột nhắt
Nhiễm đa vi nấm		
Bệnh nhiễm 3 nấm	CA, CN, TM	Chuột nhắt
Nhiễm vi nấm phổi-phế quản		
Bệnh nhiễm Cryptococcus	CN	Chuột nhắt
Bệnh nhiễm Aspergillus	AF	Chuột nhắt
Bệnh nhiễm Aspergillus	AF	Khỉ Rhesus
Nhiễm vi nấm giác mạc		
Bệnh nhiễm nấm giác mạc	15 loại nấm	Thỏ

Ghi chú:*AF: Aspergillus fumigatus**CA: Candida albicans**CN: Cryptococcus neoformans**EF: Epidermophyton floccosum**HC: Histoplasma capsulatum**MC: Microsporum canis**TM: Trichophyton mentagrophytes*

Chuột nhắt: ở đây là chuột nhắt trắng

Cách xác định số đơn vị hình thành khuẩn lạc (cfu) trong mô

Trong một số trường hợp, phải xác định số cfu trong mô (ví dụ mô thận, mô phổi, mô não, da...) để xem các mô này có bị nhiễm vi nấm không và mức độ nhiễm ra sao, ta phải xác định số cfu trong mô. Cách làm như sau:

Giết con vật thí nghiệm, bóc tách lấy mô cần xác định số cfu (ví dụ thận, phổi, não...). Cân lấy 1 gam mô, hoặc nếu mô nặng dưới 1 gam, thì cân cả mô (như thận chuột nhắt trắng). Thêm nước, nghiền nát thật kỹ bằng máy nghiền đồng thể. Dong

thể tích dịch đồng thể. Lấy 1 ml dịch đồng thể, láng lên trên bề mặt thạch của hộp Petri đã có sẵn môi trường thạch Sabouraud. Để ở nhiệt độ trong phòng cho bay hơi, rồi cho vào tủ ấm 28°C trong 3-5 ngày tùy theo loại nấm. Lấy ra, đọc kết quả. Đếm số khuẩn lạc mọc (tức là số cfu), từ đó, tính ra số cfu trong 1 gam mô.

Có thể xác định số cfu trên một diện tích da nhiễm vi nấm nào đó. Lấy một miếng gạc nhỏ, phết trên mặt da nhiễm vi nấm, rồi cho vào nước trong một ống nghiệm. Khuấy miếng gạc để cho vi nấm từ gạc ra dung dịch. Tiến hành 3 lần như vậy. Đe miếng gạc lên thành ống nghiệm để nước vắt hết ra. Đo thể tích dịch. Lấy 1 ml dịch, láng lên trên bề mặt thạch của hộp Petri rồi làm như trên, ta sẽ có số lượng cfu trên mặt thạch, rồi từ đó tính ra số cfu trên diện tích da nhiễm nấm.

III. MÔ HÌNH GÂY NHIỄM VI NẤM DA THỰC NGHIỆM Ở CHUỘT LANG

Gây nhiễm vi nấm da thực nghiệm ở chuột lang có thể dùng *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* hoặc *Microsporum canis*. Nhưng ở đây, xin nêu mô hình gây nhiễm vi nấm da bằng *Trichophyton mentagrophytes*. Muốn gây nhiễm nấm da bằng *E.floccosum* hoặc *M.canis*, ta cũng tiến hành tương tự.

3.1. Phương tiện dụng cụ

- Chủng nấm *Trichophyton mentagrophytes*
- Chuột lang 300-350 gam
- Ống nghiệm to đường kính 15 mm, dài 180 mm
- Hộp Petri
- Ống hút
- Môi trường thạch Sabouraud
- Cát trắng vô trùng
- Mật ong vô trùng
- Cối chày sứ
- Tủ ấm
- Tủ sấy
- Que bạch kim để cấy nấm
- Đèn cồn để tiệt trùng que bạch kim
- Dao cạo lông ở lưng chuột lang

- Dao mổ
- Cào 3 răng nhỏ để cào cho rách da
- Cân
- Băng
- Thuốc nghiên cứu
- Thuốc tham chiếu
- Que bôi thuốc
- Que bôi bột nhão có nấm

3.2. Chuẩn bị

- Chuẩn bị môi trường thạch Sabouraud, xem mục 3 của chương "Nghiên cứu tác dụng chống vi nấm *in vitro*".
- Chuẩn bị nấm *Trichophyton mentagrophytes*: Dùng 8 ống nghiệm to. Đun nóng môi trường thạch Sabouraud cho nóng chảy ra. Dùng ống hút, hút 5 ml môi trường rồi cho vào mỗi ống nghiệm đã để ở vị trí nghiêng để làm ống thạch nghiêng. Để nguội trong phòng cho thạch đặc lại. Cấy chủng nấm gốc trên mặt thạch nghiêng, rồi ủ trong tủ ấm ở 28°C trong 7 ngày. Các khuẩn lạc nấm trên mặt thạch được dùng để chế ra bột nhão nấm.

3.3. Gây mô hình

- Chế bột nhão nấm: Sau khi ủ ở 28°C được 7 ngày, đến ngày thí nghiệm, phân lập, tách lấy nấm trên mặt thạch của cả 8 ống thạch nghiêng cho vào cối sứ. Thêm 5 gam cát trắng vô trùng và 2,5 ml mật ong vô trùng. Nghiền kỹ cho thành bột nhão đồng đều, ta được bột nhão nấm.
- Lấy chuột lang cân nặng 300 – 350 gam, cạo sạch lông ở lưng. Đánh dấu 4 vòng tròn đường kính 14 mm. Dùng cào 3 răng, cào cho rách lớp da ở 4 vòng tròn đã đánh dấu ở trên. Bôi bột nhão nấm lên trên các vòng tròn đã đánh dấu, rồi băng kín lại.
- Đến ngày thứ 3, tháo băng ra. Sự phát triển của vi nấm thấy rõ sau 4 – 6 ngày.
- Mức độ nhiễm vi nấm được đánh giá bằng mắt thường bằng cách cho điểm từ 1 đến 4. Xác định số cfu của mỗi diện tích da như đã trình bày ở trên.

3.4. Thử thuốc

- Khi đã chỉnh lý mô hình có kết quả (tức là da có bị nhiễm vi nấm), thì có thể thử thuốc. Thường dùng dạng thuốc bôi trên da.
- Để thử thuốc, thường dùng 3 lô, một lô chứng, một lô dùng thuốc tham chiếu đã biết là có tác dụng chống vi nấm và một lô dùng thuốc nghiên cứu. Số chuột cần dùng sao cho số lần lặp lại $n = 8 - 10$.
- Trên mỗi con chuột lang, có 4 vòng tròn dùng cho 3 lô, nên một lô có thể thử trên 2 vòng tròn.
- Cách tiến hành như phần gây mô hình. Nhưng sau khi tháo băng ra vào ngày thứ 3, thì bắt đầu bôi thuốc. Lô chứng bôi tá dược không có thuốc. Ngày bôi 2 lần, sáng và chiều, liên trong 14 ngày.

3.5. Đánh giá kết quả

- Đánh giá kết quả vào 2 thời điểm: lúc 7 ngày và lúc 14 ngày kể từ khi dùng thuốc dựa vào các thông số sau:
 - Độ nhiễm vi nấm được đánh giá theo điểm từ 1 đến 4
 - Sự đóng vảy
 - Sự mọc lông
- Riêng thời điểm sau 14 ngày, còn xác định thêm thông số là số cfu trung bình trên một diện tích.

IV. MÔ HÌNH GÂY NHIỄM NẤM GIÁC MẠC Ở THỎ

Rất nhiều loại nấm có thể gây nhiễm nấm giác mạc ở thỏ. Các tác giả Ấn Độ đã gây được nhiễm nấm ở giác mạc thỏ bằng 15 loại nấm khác nhau. Sau đây, xin nêu mô hình gây nhiễm nấm ở giác mạc thỏ bằng *C.albicans*. Đối với nhiều loại nấm khác cũng có thể gây được nhiễm nấm ở giác mạc thỏ theo cách tương tự.

4.1. Phương tiện dụng cụ

- Chủng nấm *Candida albicans*
- Thỏ 2,0 – 2,5 kg
- Ống nhỏ giọt
- Ống hút
- Môi trường thạch Sabouraud
- Hộp Petri

- Cối chày sứ
- Tủ ẩm
- Tủ sấy
- Que bạch kim để cấy nấm
- Đèn cồn để tiệt trùng que bạch kim
- Dao mổ
- Cân
- Thuốc nghiên cứu
- Thuốc tham chiếu đã biết là có tác dụng chống nấm
- Dung dịch xylocain 4%
- Dung dịch hydrocortison 2,5%
- Bơm kim tiêm
- Kính lúp

4.2. Chuẩn bị

- Chuẩn bị môi trường thạch Sabouraud, xem mục 1.3 của chương "Nghiên cứu tác dụng chống vi nấm *in vitro*".
- Chuẩn bị canh nấm gốc *Candida albicans*: Từ ống chủng gốc *C.albicans*, cấy nấm trên mặt thạch Sabouraud (dùng thạch nghiêng trong ống nghiệm hoặc hộp Petri). Để ủ ở nhiệt độ 28°C trong 48-72 giờ cho nấm phát triển. Lấy các bào tử trên mặt thạch, cho vào cối sứ, nghiền trong nước muối sinh lý cho đồng nhất, rồi cho vào ống đo độ đục. Thêm nước muối sinh lý để được hỗn dịch bào tử nấm mà mỗi ml có 500 000 cfu dựa vào độ đục so với một ống mẫu. Dịch này gọi là canh nấm gốc.

4.3. Gây mô hình

- Nhỏ hydrocortison 2,5% vào cả 2 mắt thỏ, mỗi mắt 1 giọt, một lần từ ngày hôm trước và một lần vào ngày gây nhiễm vi nấm. Mục đích là gây ức chế miễn dịch để thỏ dễ bị vi nhiễm nấm hơn.
- Vào ngày gây nhiễm nấm, sau khi nhỏ hydrocortison được 1 giờ, gây tê mắt thỏ bằng cách nhỏ vào mỗi mắt thỏ 1 giọt dung dịch xylocain 4%.
- Sau khi mắt thỏ đã tê, tiêm 0,1 ml canh nấm gốc vào giác mạc của cả 2 mắt thỏ. Giác mạc thỏ sẽ bị nhiễm vi nấm sau 48 – 72 giờ và tiếp tục phát triển sau đó.

- Mức độ nhiễm vi nấm được đánh giá bằng mắt thường và bằng kính lúp vào ngày thứ tư, bằng cách cho điểm từ 1 đến 4.

4.4. Thử thuốc

- Khi đã chỉnh lý mô hình có kết quả (tức là giác mạc có bị nhiễm nấm), thì có thể thử thuốc. Thường dùng dạng thuốc nước nhỏ mắt.
- Để thử thuốc, thường dùng 20 thỏ: 10 thỏ, mỗi thỏ dành 1 mắt để đối chứng và 1 mắt để thử thuốc tham chiếu; còn 10 thỏ, mỗi thỏ dành 1 mắt để đối chứng và 1 mắt để dùng thuốc nghiên cứu.
- Cách tiến hành lúc đầu như phần gây mô hình. Thuốc được nhỏ từ ngày thứ 3 sau khi gây nhiễm vi nấm, ngày nhỏ 2 lần, sáng và chiều, liên tục trong 14 ngày.

4.5. Đánh giá kết quả

Đánh giá kết quả bằng mắt thường và bằng kính lúp vào 2 thời điểm: lúc 7 ngày và lúc 14 ngày kể từ khi dùng thuốc dựa vào số mắt khỏi nấm, và dựa vào mức độ còn nhiễm vi nấm theo thang điểm từ 1 đến 4.

V. MÔ HÌNH GÂY NHIỄM VI NẤM Ở ÂM HỘ, ÂM ĐẠO CHUỘT NHẮT TRẮNG

Nhiễm vi nấm ở âm hộ âm đạo thường là do *Candida albicans*. Vì vậy, để gây mô hình nhiễm vi nấm ở âm hộ âm đạo nên dùng nấm *C.albicans* ở chuột nhắt trắng.

5.1. Phương tiện dụng cụ

- Chủng nấm *Candida albicans*
- Chuột nhắt trắng cái 18-20 gam
- Ống nhỏ giọt
- Ống hút
- Môi trường thạch Sabouraud
- Hộp Petri
- Cối chày sứ
- Tủ ấm

- Tủ sấy
- Que bạch kim để cấy nấm
- Đèn cồn để tiệt trùng que bạch kim
- Dao mổ
- Cân
- Thuốc nghiên cứu
- Thuốc tham chiếu đã biết là có tác dụng chống nấm
- Estradiol
- Dung dịch NaCl 0,9% (nước muối sinh lý)
- Tween 80
- Kính lúp

5.2. Chuẩn bị

- Chuẩn bị môi trường thạch Sabouraud, xem mục 1.3 của chương "Nghiên cứu tác dụng chống vi nấm *in vitro*."
- Chuẩn bị dung dịch estradiol 500 µg/ml: Trước hết, hòa estradiol vào một lượng nhỏ Tween 80 cho tan hết. Thêm dần dần nước muối sinh lý vào, vừa thêm vừa trộn đều, cho đến khi đạt tỷ lệ 500 µg/ml.
- Chuẩn bị canh nấm gốc *Candida albicans*: Tiến hành như mục 2.2, nhưng ở đây cần dùng tỷ lệ nấm cao hơn là 2.10^7 (20 triệu) cfu/ml, thay cho 500 000 cfu/ml.

5.3. Gây mô hình

- Dùng chuột nhắt trắng cái 18-20 gam. Nhỏ 1 giọt estradiol vào trong âm đạo, một lần vào 2 ngày và một lần vào 1 ngày trước ngày gây nhiễm nấm. Mục đích là để niêm mạc âm đạo phát triển và bong ra để dễ bị nhiễm nấm hơn.
- Vào ngày gây nhiễm vi nấm, nhỏ 1 giọt hỗn dịch canh nấm gốc có tỷ lệ 2.10^7 cfu/ml vào trong âm đạo. Như vậy, âm hộ, âm đạo chuột nhắt trắng sẽ bị nhiễm nấm sau 3-4 ngày và tiếp tục phát triển sau đó.
- Đến ngày thứ 4, đánh giá mức độ nhiễm nấm bằng mắt thường và bằng kính lúp bằng cách cho điểm từ 1 đến 4. Đồng thời xác định nấm trong âm đạo.
- Cách xác định nấm trong âm đạo: Nhỏ 1 giọt nước muối sinh lý vào âm đạo. Lấy que bông, phết lên niêm mạc âm đạo để lấy nấm, rồi cho bông

vào 1 ml nước muối sinh lý trong ống nghiệm để nấm từ bông ra nước muối sinh lý. Lấp lại một lần nữa. Láng nước muối sinh lý lên mặt thạch Sabouraud. Cho vào tủ ẩm 28°C để ủ trong 4 ngày, rồi lấy ra đếm số khuẩn lạc nấm.

5.4. Thử thuốc

- Khi đã chỉnh lý mô hình có kết quả (tức là thấy âm đạo có bị nhiễm vi nấm), thì có thể thử thuốc. Thuốc thường được dùng dạng thuốc nước nhỏ vào âm đạo.
- Để thử thuốc, dùng 3 lô, mỗi lô 10-20 con: 1 lô chứng nhỏ dung môi pha thuốc; 1 lô thử thuốc tham chiếu; còn 1 lô để thử thuốc nghiên cứu.
- Cách tiến hành lúc đầu như phần gây mô hình. Thuốc được nhỏ từ ngày thứ 3 sau khi gây nhiễm nấm. Ngày nhỏ 2 lần, sáng và chiều, liên trong 14 ngày. Đến ngày 14, xác định vi nấm trong âm đạo theo kỹ thuật đã mô tả ở trên.

5.5. Đánh giá kết quả

Đánh giá kết quả bằng mắt thường và bằng kính lúp vào 2 thời điểm: lúc 7 ngày và lúc 14 ngày, kể từ khi dùng thuốc dựa vào các thông số sau:

- Số chuột không còn vi nấm ở âm đạo.
- Những chuột còn nhiễm vi nấm, đánh giá mức độ theo thang điểm từ 1 đến 4.
- Số cfu xác định được (chỉ ở thời điểm sau 14 ngày)

VI. MÔ HÌNH GÂY NHIỄM VI NẤM TOÀN THÂN Ở CHUỘT NHẮT TRẮNG

Để gây nhiễm vi nấm toàn thân, thường dùng nấm *Candida* hoặc nấm *Aspergillus* gây nhiễm cho chuột nhắt trắng. Dưới đây, trình bày kỹ thuật gây nhiễm vi nấm toàn thân bằng nấm *Aspergillus fumigatus* ở chuột nhắt trắng. Muốn gây nhiễm bằng nấm *Candida* cũng dùng theo cách tương tự.

6.1. Phương tiện dụng cụ

- Chủng nấm *Aspergillus fumigatus*
- Chuột nhắt trắng không phân biệt đực cái 18-20 gam
- Ống hút
- Môi trường thạch Sabouraud

- Cối chày sứ
- Tủ ẩm
- Tủ sấy
- Que bạch kim để cấy nấm
- Đèn cồn để tiệt trùng que bạch kim
- Hộp Petri
- Dao mổ
- Cân
- Thuốc nghiên cứu
- Thuốc tham chiếu đã biết là có tác dụng chống nấm
- Cyclophosphamid hoặc hydrocortison
- Dung dịch NaCl 0,9% (nước muối sinh lý)
- Bơm và kim tiêm
- Kính lúp

6.2. Chuẩn bị

- Chuẩn bị môi trường thạch Sabouraud, xem mục 1.3 của chương "Nghiên cứu tác dụng chống vi nấm *in vitro*".
- Chuẩn bị canh nấm gốc *Aspergillus fumigatus*: Tiến hành như mục 2.2. Chế canh nấm gốc có tỷ lệ nấm là 500 000 cfu/ml.

6.3. Gây mô hình

- Tiêm tĩnh mạch đuôi chuột nhất trắng mỗi con 0,2 ml canh nấm gốc. Muốn dễ bệnh nhiễm vi nấm phát triển dễ hơn, cần gây tổn thương hệ miễn dịch cho chuột bằng cách tiêm dưới da cyclophosphamid liều 5 mg/kg hoặc hydrocortison acetat liều 25 mg/kg, 2 lần, vào ngày 4 và ngày 2 trước khi gây nhiễm nấm.
- Quan sát tỷ lệ chuột bị nhiễm bệnh và tỷ lệ chuột chết trong vòng 20 ngày. Những chuột chết được coi như bị nhiễm bệnh mà chết. Đối với những chuột sống sót, xác định số cfu trong mô thận, như phần mở đầu đã đề cập.

6.4. Thử thuốc

- Khi đã chỉnh lý mô hình có kết quả (tức là thấy chuột bị nhiễm vi nấm toàn thân mà chết, hoặc xác định thấy có nấm ở mô thận), thì có thể thử thuốc. Thuốc thường được dùng dạng thuốc tiêm hoặc dạng thuốc uống.

- Để thử thuốc, dùng 3 lô, mỗi lô 20 con: 1 lô chứng dùng dung môi pha thuốc; 1 lô thử thuốc tham chiếu; còn 1 lô để thử thuốc nghiên cứu.
- Cách tiến hành lúc đầu như phần gây mô hình. Thuốc được dùng từ ngày đầu tiên gây nhiễm nấm, ngày dùng 1 lần, liên trong 20 ngày. Đến ngày 20, xác định nấm trong thận của những chuột sống sót theo kỹ thuật đã mô tả ở trên.

6.5. Đánh giá kết quả

Đánh giá, so sánh 3 lô dựa vào các thông số sau:

- Số chuột chết tính đến ngày thứ 20.
- Số chuột bị nhiễm nấm ở những con sống sót qua quan sát bằng mắt thường.
- Số cfu trong thận ở những chuột còn sống sót.

VII. MÔ HÌNH GÂY NHIỄM VI NẤM PHỔI Ở CHUỘT NHẮT TRẮNG

Để gây bệnh nhiễm vi nấm phổi thực nghiệm, thường dùng nấm *Cryptococcus neoformans* ở chuột nhắt trắng.

7.1. Phương tiện dụng cụ

- Chủng nấm *Cryptococcus neoformans*
- Chuột nhắt trắng không phân biệt đực cái 18-20 gam
- Ống nhỏ giọt
- Ống hút
- Micropipet
- Môi trường thạch Sabouraud
- Cối chà y sủ
- Tủ ấm
- Tủ sấy
- Que bạch kim để cấy nấm
- Hộp Petri
- Dao mổ
- Cân

- Thuốc nghiên cứu
- Thuốc tham chiếu đã biết là có tác dụng chống nấm
- Dung dịch NaCl 0,9% (nước muối sinh lý).

7.2. Chuẩn bị

- Chuẩn bị môi trường thạch Sabouraud, xem mục 1.3 của chương "Nghiên cứu tác dụng chống vi nấm *in vitro*".
- Chuẩn bị canh nấm gốc *Cryptococcus neoformans*: Tiến hành như mục 2.2, nhưng ở đây cần dùng tỷ lệ nấm cao hơn là 10^7 (10 triệu) cfu/ml, thay cho 500 000 cfu/ml.

7.3. Gây mô hình

- Dùng micropipet hút 25 μ l canh nấm gốc có tỷ lệ là 10 triệu cfu/ml, nhỏ sâu vào trong mũi chuột.
- Quan sát chuột. Thường bệnh nhiễm nấm phổi xuất hiện sau 7 ngày và tiếp tục phát triển.
- Đến ngày thứ 7, quan sát bằng cảm quan triệu chứng của bệnh nhiễm nấm phổi ở chuột. Đồng thời xác định nấm, số cfu trong mô phổi, như đã mô tả ở trên.

7.4. Thử thuốc

- Khi đã chỉnh lý mô hình có kết quả (tức là thấy chuột bị nhiễm nấm phổi), thì có thể thử thuốc. Thuốc thường được dùng dạng thuốc uống, thuốc tiêm hoặc nhỏ vào mũi.
- Để thử thuốc, dùng 3 lô, mỗi lô 20 con: 1 lô chứng dùng dung môi pha thuốc; 1 lô thử thuốc tham chiếu; còn 1 lô để thử thuốc nghiên cứu.
- Cách tiến hành lúc đầu như phần gây mô hình. Thuốc được dùng từ ngày đầu tiên gây nhiễm nấm, ngày dùng 2 lần, sáng và chiều, nếu là nhỏ mũi; còn nếu uống và tiêm thì dùng ngày 1 lần, liên trong 14 ngày. Đến ngày 14, ngoài quan sát bằng cảm quan, cần xác định nấm trong phổi theo kỹ thuật đã mô tả ở trên.

7.5. Đánh giá kết quả

Đánh giá kết quả bằng cảm quan vào 2 thời điểm: lúc 7 ngày và lúc 14 ngày kể từ khi dùng thuốc dựa vào các thông số sau:

- Số chuột chết.
- Số chuột còn sống có biểu hiện bệnh nấm phổi.

Đến ngày thứ 14, đánh giá thêm về số phổi còn nhiễm nấm và số cfu xác định được trong phổi.

VIII. MỘT SỐ MÔ HÌNH KHÁC

8.1. Mô hình gây nhiễm đa vi nấm để sàng lọc nhanh ở chuột nhắt trắng

Để sàng lọc nhanh, có thể gây nhiễm đa nấm trên cùng một con vật. Có thể gây tất cả các bệnh nhiễm vi nấm đã nêu ở trên. Nhưng thông thường, người ta gây nhiễm nấm da, gây nhiễm nấm giác mạc, gây nhiễm nấm âm đạo, gây nhiễm nấm phổi trên cùng một con vật, như chuột nhắt trắng chẳng hạn.

Cách gây bệnh cũng giống như khi gây bệnh một loại nấm đã trình bày ở trên, nhưng ở đây là gây nhiều bệnh nấm trên cùng một con vật.

Khi bệnh nhiễm vi nấm đã xuất hiện, có thể thử tác dụng của 1 thuốc trên các bệnh nhiễm nấm khác nhau để rút ra xem thuốc có tác dụng trên loại bệnh nấm nào và sơ bộ về mức độ tác dụng của thuốc, hoặc cũng có thể thử với nhiều loại thuốc khác nhau.

8.2. Mô hình gây nhiễm nấm phổi bằng *Histoplasma capsulatum* ở chuột nhắt trắng

Nấm *Histoplasma capsulatum* phân lập từ bệnh nhân được nuôi cấy trong môi trường, nhiệt độ và thời gian thích hợp.

Chuột nhắt trắng dùng loại có hệ miễn dịch bình thường (không có xử lý gì trước khi gây nhiễm vi nấm) và loại có hệ miễn dịch bị tổn thương, do tiêm dưới da cyclophosphamid liều 5 mg/kg.

Tiêm canh nấm vào trong khí quản chuột nhắt trắng để gây bệnh nhiễm nấm phổi. Nếu là chuột có hệ miễn dịch bình thường thì bệnh phát sinh vào ngày thứ bảy, tỷ lệ chết là 60–70% sau một thời gian 13–15 ngày. Nếu là chuột bị tổn thương hệ miễn dịch, thì bệnh phát sinh vào ngày 5–6, tỷ lệ chết là 80–100% trong vòng 10 ngày.

Thuốc nghiên cứu được dùng liên tục trong 14 ngày kể từ ngày gây nhiễm nấm. Thuốc có tác dụng kháng nấm *H.capsulatum* sẽ làm cho số chuột chết giảm đi. Những con chuột sau 14 ngày còn sống, được mổ, xét nghiệm phổi, gan, lách bằng mắt thường và kính lúp. Sau đó, xác định số cfu trong mô phổi, mô gan và mô lách.

Đánh giá kết quả vào ngày thứ 14 trên các thông số sau:

- Tỷ lệ chuột chết
- Trọng lượng gan (gan nhiễm nấm sẽ to hơn)
- Trọng lượng lách (lách nhiễm nấm sẽ to hơn)
- Số cfu trong phổi, gan, lách.

8.3. Mô hình gây nhiễm vi nấm phổi phế quản do *Aspergillus* ở khỉ rhesus

Dùng khỉ rhesus *Macaca mulatta*, đực, trưởng thành nặng 3 – 5 kg, nhốt riêng từng con trong 3 tuần, nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm chuẩn và duy trì chế độ ăn cân bằng có hoa quả theo mùa và nước vô trùng, để ăn uống thoải mái và tăng cường chăm sóc.

Gây tổn thương hệ miễn dịch bằng cách tiêm bắp hydrocortison acetat, liều 5 mg/kg/ngày.

Chế canh khuẩn gốc có tỷ lệ nấm cao trong 1 ml và tiêm vào trong khí quản mỗi khỉ 5×10^9 cfu để gây bệnh nhiễm nấm phổi phế quản.

Sau 2 tuần kể từ khi gây nhiễm nấm, khi xuất hiện các triệu chứng của bệnh nhiễm nấm phổi phế quản, được xác định nhờ các thông số sau:

- Triệu chứng lâm sàng được đánh giá qua cảm quan và khám lâm sàng.
- Lấy dịch tiết phế quản của khỉ, soi trực tiếp trên kính hiển vi để xác định có nấm hay không .
- Lấy dịch tiết phế quản để nuôi cấy, tìm xem có nấm không .
- Chụp X quang ngực khỉ.

Sau khi xác định được khỉ đã bị nhiễm nấm phổi phế quản, có thể thử thuốc, dùng đường uống hoặc tiêm, ngày 1 lần, trong 14 ngày. Đánh giá tác dụng của thuốc vào các thời điểm 7 ngày và 14 ngày kể từ khi dùng thuốc, cũng dựa vào các thông số trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anderson TG. (1961), An evaluation of antimicrobial susceptibility testing. Plenum Press New York.
2. Brancato FP., Golding NS. (1953), The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth, *Mycologia*, 45, 848-864.
3. CYTED (1995), Bioautografia, trong *Manual de tecnicas de investigacion*, Marzo, 73-74.
4. CYTED (1995), Actividad antimicotica, trong *Manual de tecnicas de investigacion*. Marzo, 71-73.
5. Dhar ML., Dhar MM., Dhavan BN., Mehrotra BN. (1968), Screening of indian plants for biological activity, Part 1, *Indian J.Exp. Biol.*, 6, 232-247.
6. Drouhet E., Dupont B., Improvisi L., Viviani MA., Tortorand AM. (1986), In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, The Netherlands, 31-37.
7. Khan ZK. (1997), In vitro and in vivo screening techniques for antibacterial and antifungal activity, trong *International workshop on medicinal plants, their bioactivity screening and evaluation*, 2-5/12/1997, Centre for science and technology of Non-Aligned and other developing countries and UNIDO (United Nations Industrial Development Organization), 271-286.
8. Norris JR, Ribbons DW. (1972), Tests using solid media, trong *Methods in microbiology*. Academic Press New York and London, 215-224.
9. Norris JR., Ribbons DW. (1972), Tests in liquid media, trong *Methods in microbiology*. Academic Press New York and London, 224-233.
10. Peterson CA., Edginton LV. (1969). Quantitative estimation of fungicide using a bioautograph technique, *J. Agr.Food Chem.*, 17, 898-902.
11. Rios GL., Recio MC., Villar A. (1988), Screening methods for natural products with antimicrobial activity, *J.Ethnopharmacol.*, 23 (2-3), 127-149.
12. Srivastava OP. (1984), The use of pharmacological techniques for evaluation of natural products, UNESCO worshop 1982, Lucknow Publishing house, 72-77.
13. Srivastava OP., Khan ZK., Wahab S. (1991), Handbook of applied mycology in humans, animals and insects, Vol.2, Marcel Dekker, New York, 499-512.

CHƯƠNG 22

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ
THUỐC CÓ TÁC DỤNG CHỐNG OXY HÓA*TS. Nguyễn Thị Thu Hương*

I. ĐẠI CƯƠNG VỀ GỐC TỰ DO

1.1. Khái niệm về stress oxy hóa [11, 13]

Oxy hóa không thể thiếu được với vi sinh vật ái khí. Con người có thể nhịn ăn khá lâu song không thể nhịn thở quá 5-10 phút. Khoảng vài thập niên gần đây, các thành tựu khoa học đã chứng tỏ rằng oxy vào cơ thể tham gia nhiều quá trình sinh hóa học. Trong các quá trình đó, oxy tạo ra những tiểu phân trung gian gọi là các gốc tự do.

Từ đầu những năm 70 I.W.Fridovich đã nhận thấy rằng khi nhận một điện tử đầu tiên, oxy tạo ra gốc superoxyd. Đây là gốc tự do quan trọng nhất của tế bào. Từ gốc superoxyd ($O_2^{\cdot -}$) nhiều gốc tự do và các phân tử khác của oxy có khả năng phản ứng cao được tạo ra như: $HO^{\cdot}$ (gốc hydroxyl), H_2O_2 , 1O_2 (oxy đơn bội), $LO^{\cdot}$ (gốc lipoxyd), $LOO^{\cdot}$ (gốc lipoperoxyd), $RO^{\cdot}$ (gốc alkoxyd), $LOOH$. Tên chung các gốc là các dạng oxy hoạt động.

Các nhà khoa học cũng phát hiện rằng sự sản sinh ra nhiều dạng oxy hoạt động cũng có thể được loại bỏ bằng các chất chống oxy hóa (antioxidant) tự nhiên trong cơ thể. Tiêu biểu là enzym superoxyd dismutase (SOD), glutathion (GSH), enzym glutathion peroxydase (GSH-Px), enzym catalase và phân tử nhỏ như: tocopherol, ascorbat.

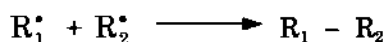
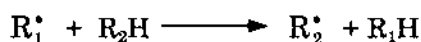
Trong cơ thể luôn tồn tại sự cân bằng giữa các dạng oxy hoạt động và các dạng chống oxy hóa. Đó là một trạng thái cơ bản của cân bằng nội môi (homeostasis). Do ảnh hưởng của nhiều yếu tố tác động từ bên ngoài hay bên trong cơ thể, làm cho

cân bằng này di chuyển theo hướng gia tăng các dạng oxy hoạt động. Trạng thái sinh lý này được gọi là stress oxy hóa. Hay nói một cách khác, stress oxy hóa là sự rối loạn cân bằng giữa các chất chống oxy hóa và oxy hóa theo hướng tạo ra nhiều các oxy hóa

1.2. Bản chất hóa học của gốc tự do [12]

- Các gốc có khả năng phản ứng cao.

Ví dụ:



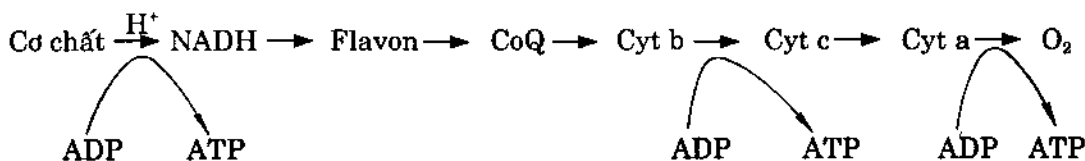
- Thời gian tồn tại ngắn: do khả năng phản ứng cao nên các gốc có thời gian tồn tại ngắn. Thời gian tồn tại này phụ thuộc bản chất các gốc và điều kiện của hệ mà nó tồn tại.
- Trong cơ thể, những gốc của oxy rất không bền. Đó là các gốc $O_2^\bullet$ – (gốc superoxyd); $^\bullet OH$ (gốc hydroxyl); $RO^\bullet$ (gốc alkoxyd); $LO^\bullet$ (gốc lipoxyd) $LOO^\bullet$ (gốc lipoperoxyd). Các gốc bền là các gốc có cấu trúc semiquinon như gốc của vitamin E (tocopheryl), vitamin C (ascorbyl).

1.3. Sự hình thành các gốc tự do của oxy trong cơ thể [10]

Trong tế bào, gốc tự do được sinh ra do các phản ứng chuyển nhượng điện tử. Những phản ứng này có thể được thực hiện bởi enzym hoặc không enzym, thông qua sự oxy hóa khử của các ion kim loại chuyển tiếp.

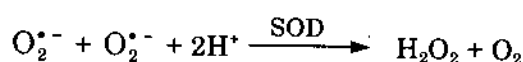
1.3.1. Sự hình thành gốc tự do trong trao đổi bình thường

Trong sinh học, nguồn quan trọng sinh ra gốc tự do là sự cung cấp điện tử ở chuỗi hô hấp tế bào trong ty lạp thể cho oxy. Trong ty lạp thể có một hệ thống enzym và các chất trung gian làm nhiệm vụ vận chuyển hydro và điện tử từ cơ chất tới oxy. Những hợp chất này tạo ra một loại các phản ứng dây chuyền nối tiếp nhau gọi là chuỗi hô hấp tế bào

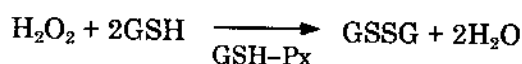


Quá trình oxy nhận điện tử ở chuỗi hô hấp tế bào thực tế phải xảy ra qua nhiều giai đoạn. Mỗi giai đoạn oxy chỉ nhận được một điện tử. Oxy nhận điện tử đầu tiên tạo ra gốc superoxyd ($O_2^{\bullet -}$). Oxy nhận điện tử chủ yếu ở màng ty lạp thể. Khoảng 80% lượng $O_2^{\bullet -}$ hình thành chuyển vào trong ty lạp thể, còn 20% thoát ra bào tương. $O_2^{\bullet -}$ có các chức năng như sau: là nguồn sinh ra H_2O_2 ; cùng với NO_2 và các chất phóng thải từ tế bào thành trong tham gia chi phối trạng thái tĩnh hay hoạt động của tiểu cầu, quyết định sự bám dính hay kết tụ của tiểu cầu vào thành mạch.

Các gốc $O_2^{\bullet -}$ hình thành nhanh chóng được enzym SOD chuyển thành H_2O_2 theo cơ chế tự oxy hóa khử:



H_2O_2 là tác nhân oxy hóa và dễ dàng bị phân huỷ theo phản ứng:



GSH: glutathion; GSH-Px: enzym glutathion peroxydase

Như vậy, ở cơ thể bình thường, oxy qua các chuyển hóa trong cơ thể tạo ra $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 để thực hiện các chức năng sinh lý. Chúng chỉ tồn tại với một nồng độ vô cùng thấp, dễ dàng bị loại bỏ và không độc hại cho cơ thể.

1.3.2. Sự hình thành gốc tự do ngẫu nhiên

Rất có thể do chuyển động nhiệt hoàn toàn ngẫu nhiên mà các gốc $O_2^{\bullet -}$ và H_2O_2 va đập với nhau, không có men đặc hiệu xúc tác tạo ra một số phản ứng phụ sau:

1.3.2.1. Sự hình thành gốc tự do không có enzym SOD xúc tác

Các gốc $O_2^{\bullet -}$ có khả năng phản ứng với nhau trong điều kiện không có enzym SOD xúc tác theo phản ứng sau:



Oxy đơn bội (1O_2) có tính oxy hóa rất mạnh. Nó có thể phản ứng với bất kỳ một chất hữu cơ nào khi nó gặp tạo ra các peroxyd.

1.3.2.2. Phản ứng Harber-Weiss

Các gốc $O_2^{\bullet -}$ va đập với H_2O_2 :



Phản ứng này xảy ra chậm, nhưng có mặt Fe^{2+} , Cu^{2+} xúc tác thì tốc độ phản ứng xảy ra rất nhanh (phản ứng Fenton). Hai tiểu phân $\text{O}_2^{\bullet -}$ và H_2O_2 không độc, có thể tạo ra $^1\text{O}_2$, $^{\bullet}\text{OH}$ là những phân tử và gốc có khả năng phản ứng rất cao, dễ dàng phản ứng với các chất hữu cơ tạo ra các peroxyd và từ đó tạo ra nhiều sản phẩm độc hại cho tế bào.

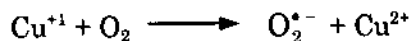
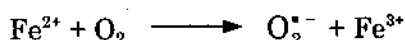
1.3.2.3. Sự hình thành gốc tự do từ các ion kim loại chuyển tiếp

Ion kim loại chuyển tiếp (Fe^{2+} , Cu^{2+}) dễ dàng phân tách H_2O_2 thành gốc $^{\bullet}\text{OH}$.



Bình thường phản ứng này trong sinh học ít xảy ra, vì H_2O_2 ở nồng độ thấp còn Fe^{2+} , Cu^{2+} thường bị khóa ở dạng phức, ít ở trạng thái tự do.

Các ion kim loại chuyển tiếp có thể phản ứng với oxy tạo ra gốc $\text{O}_2^{\bullet -}$. Phản ứng này đặc biệt quan trọng vì nó khơi mào cho các phản ứng gốc tự do xảy ra.



Như vậy, từ 4 tiểu phân $\text{O}_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , O_2 và kim loại chuyển tiếp cùng hợp biến sinh ra gốc $^{\bullet}\text{OH}$ và $^1\text{O}_2$ những tác nhân có khả năng phản ứng mạnh. Gốc $^{\bullet}\text{OH}$ phản ứng mạnh với hầu hết các phân tử sinh học ở tốc độ khuếch tán, có khả năng gây tổn thương lớn trong phạm vi bán kính nhỏ mà nó sinh ra.

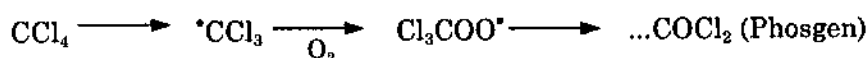
1.4. Ảnh hưởng của các yếu tố ngoại sinh đến sự hình thành gốc tự do [10]

1.4.1. Ảnh hưởng của các xenobiotic

Đây là các chất hóa học, cơ thể không tổng hợp sẵn ra được, ví dụ như các thuốc trừ sâu, diệt cỏ, các hợp chất nitro hữu cơ, các phẩm nhuộm. Khi xâm nhập vào cơ thể, các hóa chất này có giai đoạn trung gian tạo ra các gốc tự do.

1.4.2. Ảnh hưởng của các tác nhân viêm và hoại tử gan

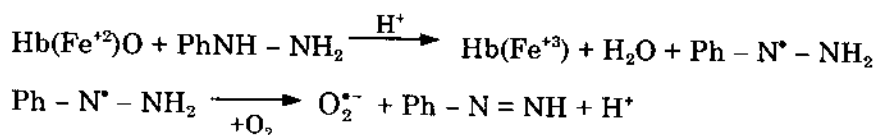
Các hợp chất halogen hữu cơ, điển hình là CCl_4 là chất gây viêm hoại tử gan. Khi vào gan được chuyển hóa như sau:



Chính các dạng gốc trung gian này làm tăng quá trình peroxy hóa lipid. Quá trình peroxy hóa lipid mãnh liệt sẽ gây phá vỡ màng tế bào, gây viêm và có khả năng gây hoại tử gan.

1.4.3. Ảnh hưởng của tác nhân tiêu máu và bầm huyết

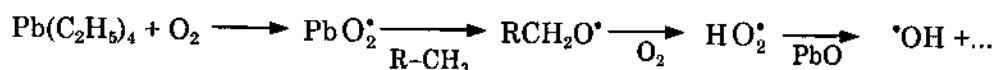
Diễn hình là các diazonaphtol, diphenylhydrazin..., các chất này phản ứng với oxyhemoglobin tạo ra methemoglobin và gốc phenylhydrazin. Gốc này nhường điện tử cho oxy tạo ra $O_2^{\cdot-}$



1.4.4. Ảnh hưởng của điều kiện sống

1.4.4.1. Ảnh hưởng của sự ô nhiễm môi trường

Khí thải của các động cơ dùng xăng, dầu có nhiều chất độc như: CO, NO, carbua hydro tetraethyl chì. Những chất này phân huỷ tạo gốc tự do như sau:

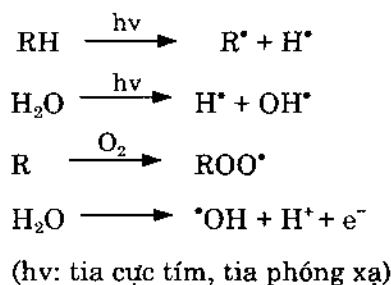


1.4.4.2. Ảnh hưởng của stress

Cơ thể hoạt động một cách bình thường là do cân bằng nội môi đã được thiết lập. Nếu có một yếu tố nào phá vỡ cân bằng nội môi thì được gọi là tác động của stress. Khi cơ thể bị các stress như sự di chuyển và thay đổi môi trường sống, sự thay đổi nhiệt độ quá nóng hay quá lạnh, môi trường quá ồn hay bị ô nhiễm, áp lực và sự căng thẳng - lo lắng trong công việc, v.v., thì hàm lượng gốc tự do của oxy thường cao hơn 1,5 đến 2 lần so với đối chứng. Thông qua các dây thần kinh hướng tâm và vùng dưới đồi, cơ thể có những đáp ứng với các stress. Sự giải phóng ra adrenalin và noradrenalin, khi cơ thể bị stress tác động sẽ dẫn tới khả năng chuyển hóa tương tác với oxy tạo ra các gốc $O_2^{\cdot-}$. Đồng thời nhiều acid béo chưa no được giải phóng ra từ các lipid. Những yếu tố đó (gốc $O_2^{\cdot-}$ tăng, acid béo chưa no tăng...) thúc đẩy quá trình peroxy hóa tăng khi bị stress.

1.4.4.3. Ảnh hưởng của khu vực địa lý

Các bức xạ mặt trời, bức xạ nền ở một miền nào đó có phát ra những tia ảnh hưởng tới sự hình thành các gốc tự do của oxy theo cơ chế như sau:



Tóm lại, do ảnh hưởng của các điều kiện sống như bị ô nhiễm quá nhiều, nhiều stress... thì gốc tự do gia tăng. Nếu sự gia tăng quá mức và kéo dài sẽ dẫn đến tình trạng mất cân bằng giữa các dạng oxy hoạt động và các chất chống oxy hóa. Lượng các dạng oxy hoạt động tăng sẽ gây ra nhiều phản ứng bất lợi, tổn thương cho cơ thể và là nguyên nhân của nhiều bệnh tật.

1.5. Sự phòng vệ của cơ thể chống lại gốc tự do [10]

1.5.1. Hệ thống phòng vệ các gốc tự do trong cơ thể

Do việc sinh ra các gốc tự do trong tế bào là không thể tránh khỏi, nên việc bảo vệ chống lại những tác hại của gốc tự do là tất yếu. Đó là sự phòng vệ của các chất chống oxy hóa nội sinh trong cơ thể với hai phương cách tác động sau:

Phòng ngừa sinh ra các gốc

Khả năng phòng ngừa sinh ra các gốc bao gồm hiệu lực vận chuyển điện tử của oxy và sự khóa các ion kim loại chuyển tiếp vào dạng phức, đặc biệt với các protein như: transferin, lactoferin, feritin.

Phòng vệ loại bỏ các gốc đã sinh ra

Ở trong tế bào quan trọng nhất là enzym SOD và hệ thống glutathion. Ở tổ chức màng thì quan trọng nhất là các chất kiểu vitamin E, ubiquinon, β -caroten loại bỏ các gốc $\text{LOO}^\bullet$, $\text{LO}^\bullet$ theo phản ứng mỗi phân tử vitamin E này loại bỏ hai gốc $\text{LOO}^\bullet$. Ở pha nước có vai trò của vitamin C và một số chất như acid uric.

Việc sửa chữa loại bỏ các phân tử sinh học đã bị tổn thương trước khi chúng tích tụ lại hoặc trước khi chúng đủ mức gây ra những biến đổi chuyển hóa và định hướng đến sự sống của tế bào.

Ví dụ: các protein đã bị oxy hóa sẽ bị proteinase phân huỷ; các lipid màng sẽ bị các lipase phân huỷ, acyl transferase tác động.

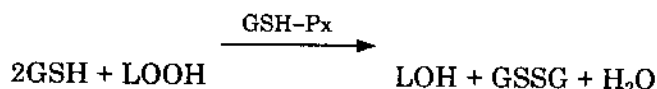
1.5.2. Hệ thống enzym chống oxy hóa ở gan

Gan là cơ quan có nhiều enzym trong đó những enzym đóng vai trò quan trọng

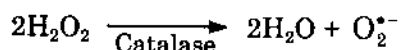
trong nhiều việc chống oxy hóa là: các chất chống peroxyd, enzym SOD, phân hủy các gốc tự do khác, những ion khóa kim loại chuyển tiếp..., trong đó các chất chống peroxyd chiếm thành phần chủ yếu ở gan.

1.5.2.1. Các chất chống peroxyd

Đó là các chất glutathion (GSH), enzym glutathion peroxydase (GSH-Px) xúc tác phân hủy các peroxyd với hằng số tốc độ phản ứng $k = 10^8$ mol/giây theo phản ứng sau:

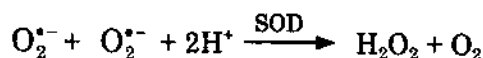


Như vậy, hàm lượng GSH, hoạt độ enzym GSH-Px liên quan đến việc phân hủy các peroxyd. Khẩu phần ăn đủ protein và hàm lượng selen liên quan chặt chẽ với GSH và hoạt tính enzym GSH-Px. Nếu hàm lượng selen không đủ thì GSH giảm, hoạt độ enzym GSH-Px thấp. Ngoài ra, peroxysom còn có catalase phân hủy H_2O_2 nồng độ cao theo phản ứng sau:



1.5.2.2. Enzym superoxyd dismutase (SOD)

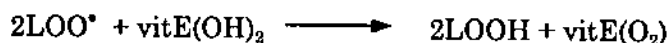
Enzym này có khả năng phân hủy đặc hiệu các gốc $\text{O}_2^{\bullet -}$ với hằng số tốc độ rất lớn ($k = 10^9$ mol/giây).



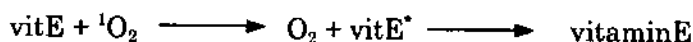
Bản chất enzym này là một protein có hai đồng phân là MnSOD (có trong ty lạp thể) còn có CuZnSOD có ở bào tương. Cả hai đều xúc tác phân hủy gốc $\text{O}_2^{\bullet -}$.

1.5.2.3. Phân hủy các gốc tự do khác

- Vitamin E (α -tocopherol) là chất chống oxy hóa quan trọng ở các tổ chức màng. Mỗi phân tử vitamin E có khả năng loại bỏ bớt hai gốc $\text{LOO}^{\bullet}$ theo phản ứng sau:



Ngoài phản ứng trực tiếp với gốc tự do vitamin E có khả năng loại bỏ oxy đơn bội theo phản ứng sau:



$\text{vitE}^{\bullet}$: dạng oxy hóa (dạng kích thích).

- Trong tế bào có nhiều chất có cấu trúc tương tự vitamin E như ubiquinon (coenzym Q_{10} ..) cũng có tính chất này.
- Các gốc kiểu semiquinon là những gốc bền, có nồng độ khá lớn ($10^{-8}M$) so với các gốc tự do của oxy là những gốc không bền. Vì thế những gốc này có thể phản ứng với nhau tạo ra các sản phẩm không phải là gốc.
- Vitamin C: là những chất có khả năng loại bỏ các gốc tự do ở pha nước của tế bào. Ngoài ra vitamin C còn có khả năng tái tạo vitamin E dạng oxy hóa trở về dạng khử.
- Những chất như acid uric huyết tương, GSH ở dịch tế bào cũng có tính chất loại bỏ các gốc tự do.
- Phân tử β -caroten cũng có tính chất chống oxy hóa theo cơ chế nhận năng lượng kích thích của oxy đơn bội, biến oxy đơn bội thành oxy thường và bản thân β -caroten trở thành dạng kích thích, sau đó có thể trở về trạng thái bình thường hoàn toàn bằng hiện tượng vật lý là năng lượng kích thích truyền cho các liên kết nội tạng dưới dạng nhiệt.

1.5.2.4. Những protein khóa ion kim loại chuyển tiếp

Ion sắt hoặc đồng ở trạng thái tự do dễ dàng xúc tác sinh ra gốc tự do. Việc phức hóa các ion này, không để cho tồn tại ở trạng thái tự do sẽ làm mất khả năng xúc tác gốc. Trong cơ thể có nhiều protein có chức năng này. Khóa sắt transferrin, ferritin, lactoferrin. Khóa đồng có ceruloplasmin. Cơ thể khỏe mạnh chỉ cần 30% lượng các protein đã đủ khóa tất cả sắt và đồng ở dạng phức, không có ion sắt, đồng tự do trong cơ thể.

II. CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TÁC DỤNG CHỐNG OXY HÓA (ANTIOXIDANT ACTIVITY)

2.1. Phương pháp xác định hàm lượng MDA [3, 4, 5, 6, 9]

Có nhiều phương pháp được dùng trong nghiên cứu quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào. Các phương pháp này dựa trên:

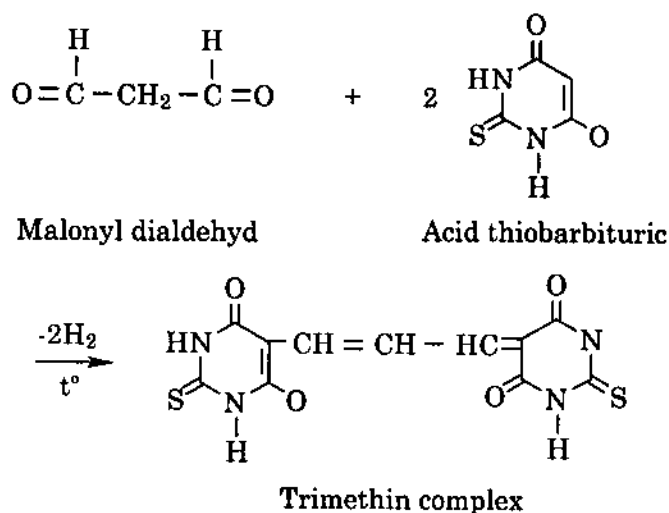
- (a). Sự xác định các sản phẩm của quá trình peroxy hóa lipid.
- (b). Sự nhận biết các gốc tự do trong chuỗi phản ứng như đo phát quang sinh học đánh giá các gốc $LOO^{\bullet}$ hình thành, đo lượng các dien liên hợp hình thành.
- (c) Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của mô.

Hai nhóm (a), (b) đơn giản và dễ thực hiện hơn so với (c), đặc biệt là phương pháp xác định sản phẩm sinh ra trong quá trình peroxy hóa lipid: malonyl dialdehyd (MDA), là sản phẩm cuối cùng của quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào, do đó được áp dụng rộng rãi trong thực tế.

Phương pháp sử dụng acid thiobarbituric thường được áp dụng để xác định hàm lượng MDA trong tổ chức tế bào, từ đó đánh giá khả năng chống oxy hóa *in vitro* hoặc *in vivo* của chất nghiên cứu thể hiện qua việc làm giảm hàm lượng MDA.

2.1.1. Nguyên tắc

MDA được sinh ra trong quá trình peroxy hóa lipid, khi cho phản ứng với acid thiobarbituric, một phân tử MDA phản ứng với hai phân tử acid thiobarbituric tạo phức màu hồng hấp thụ cực đại ở bước sóng 532 nm. Phản ứng thực hiện ở môi trường pH 2-3, ở nhiệt độ 90-100°C trong vòng 10-15 phút. Phương trình phản ứng như sau:



Do cường độ màu của phức suy ra lượng MDA có trong mẫu.

2.1.2. Thực nghiệm

2.1.2.1. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*

• Tiến hành:

Tách não chuột và nghiền đồng thể trong dung dịch đệm phosphat (pH = 7,4) theo tỉ lệ 1:10 ở nhiệt độ 0-5°C. Lấy 1 ml dịch đồng thể, thêm vào 0,2 ml các nồng độ mẫu thử + 0,8 ml đệm phosphat và ủ ở 37°C trong 15 phút (tự oxy hóa) hoặc ủ ở 37°C trong 5 phút với hệ Fenton (FeSO₄ 0,1 mM : H₂O₂ 15 mM theo tỉ lệ 1:1). Kết

thức phản ứng bằng 1 ml acid tricloacetic 10%, ly tâm lấy dịch trong cho phản ứng với 1 ml acid thiobarbituric 0,8% ở 100°C trong 15 phút và đo màu ở $\lambda = 532$ nm.

• **Tính toán kết quả:**

Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) được tính theo công thức:

$$\text{HTCO (\%)} = [C_{\text{MDA Chứng}} - C_{\text{MDA Thử}}] / C_{\text{MDA Chứng}} \times 100$$

C: nồng độ MDA (nM/ml) được tính theo phương trình hồi quy tuyến tính của chất chuẩn MDA.

2.1.2.2. Xác định hàm lượng MDA trong tổ chức gan hay não

• **Xác định hàm lượng MDA trong não:**

Tách não chuột và nghiền đồng thể trong dung dịch đệm phosphat theo tỉ lệ 1:10 ở nhiệt độ 0–5°C. Lấy 1 ml dịch đồng thể + 1 ml đệm phosphat và ủ ở 37°C trong 15 phút. Sau đó, thêm vào 1 ml acid tricloacetic 10%, ly tâm lấy dịch trong cho phản ứng với 1 ml acid thiobarbituric 0,8% ở 100°C trong 15 phút và đo màu ở $\lambda = 532$ nm.

• **Xác định hàm lượng MDA trong gan:**

Tách gan chuột và nghiền đồng thể trong dung dịch KCl 1,15% theo tỉ lệ 1:10 ở nhiệt độ 0–5°C. Lấy 2 ml dịch đồng thể + 1 ml đệm Tris 25 mM và ủ ở 37°C trong 60 phút. Sau đó, thêm vào 1 ml acid tricloacetic 10%, ly tâm lấy dịch trong cho phản ứng với 1 ml acid thiobarbituric 0,8% ở 100°C trong 15 phút và đo màu ở $\lambda = 532$ nm.

• **Tính toán kết quả:**

- Hàm lượng MDA (nM/ml) được tính theo phương trình hồi quy tuyến tính của chất chuẩn MDA.
- Hàm lượng MDA (nM/g tổ chức) được tính theo công thức sau:

$$X \text{ nM/g tổ chức} = \frac{C \times V_1 \times V_2 \times 1000}{V_1 \times V_2 \times m}$$

trong đó:

X: hàm lượng MDA (nM/g tổ chức);

C: hàm lượng MDA (nM/ml) được tính dựa trên phương trình đường chuẩn;

V_1 : tổng thể tích của hỗn hợp phản ứng (ml);

V_2 : tổng thể tích của dịch đồng thể (ml);

v_1 : thể tích dịch sau ly tâm sử dụng trong phản ứng màu với thuốc thử (ml);

v_2 : thể tích dịch đồng thể trong hỗn hợp phản ứng (ml);

m : khối lượng tổ chức sử dụng (mg).

2.1.2.3. Thiết lập đường chuẩn MDA

- MDA chuẩn 1 ml (ở các nồng độ từ 304,5 đến 6090 nM/ml).
- TCA 10% 1 ml
- TBA 0,8% 1 ml

Hiện màu ở 100°C 15 phút. Đo quang ở $\lambda = 532$ nm.

2.2. Các phương pháp đánh giá hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*

2.2.1. Phương pháp sử dụng DPPH [1]

2.2.1.1. Nguyên tắc

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) là chất tạo ra gốc tự do được dùng để thực hiện phản ứng mang tính chất sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của các chất nghiên cứu. Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua việc làm giảm màu của DPPH, được xác định bằng cách đo quang ở bước sóng $\lambda = 517$ nm.

2.2.1.2. Tiến hành

- Pha dung dịch DPPH có nồng độ 1 mM trong methanol (MeOH). Dung dịch này không bền với ánh sáng, chỉ pha trước khi dùng.
- Dung dịch thử: Lấy mẫu pha trong MeOH theo bảng 1:

Bảng 1: Hỗn hợp phản ứng

Ống	Dung dịch thử (ml)	MeOH (ml)	Dung dịch DPPH (ml)
Trắng	0	4	0
Chứng	0	3,5	0,5
Thử	0,5	3	0,5

Lắc đều các ống trong 15 giây, để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và đo quang ở bước sóng $\lambda = 517$ nm.

Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) được tính theo công thức:

$$\text{HTCO (\%)} = [\text{OD}_{\text{Chứng}} - \text{OD}_{\text{Thử}}] / [\text{OD}_{\text{Chứng}} - \text{OD}_{\text{Trắng}}] \times 100$$

OD: mật độ quang

2.2.2. Phương pháp đánh giá khả năng kết hợp với ion sắt II (Iron chelating activity) [7]

2.2.2.1. Nguyên tắc

Ion sắt hoặc đồng ở trạng thái tự do dễ dàng xúc tác sinh ra gốc tự do. Đánh giá khả năng phòng ngừa sinh ra các gốc tự do của chất nghiên cứu thể hiện qua sự khóa các ion kim loại chuyển tiếp vào dạng phức, không để cho tồn tại ở trạng thái tự do, sẽ làm mất khả năng xúc tác gốc. Hoạt tính chống oxy hóa được thể hiện qua việc ngăn chặn sự tạo thành phức chất có màu giữa ion sắt II với 2,2'-bipyridyl (thuốc thử ferrozine, đặc hiệu với ion sắt II).

2.2.2.2. Tiến hành

- Pha các dung dịch $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mM, Ferrozine 300 μM , NaCl 0,15 M trong nước cất.
- Pha hỗn hợp phản ứng theo bảng 2:

Bảng 2: Hỗn hợp phản ứng

Ống	FeSO_4 100 mM (ml)	Ferrozine 300 μM (ml)	Mẫu thử (ml)	NaCl 0,15 M (ml)
Trắng	0,3	0	0,3	2,4
Chứng	0,3	0,3	0	2,4
Thử	0,3	0,3	0,3	2,1

Lắc đều các ống trong 15 giây, để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và đo quang ở bước sóng $\lambda = 562$ nm. EDTA được sử dụng như chất đối chiếu dương tính (positive control).

Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) được tính theo công thức:

$$\text{HTCO (\%)} = [(\text{OD}_{\text{Chứng}} - \text{OD}_{\text{Thử}}) / \text{OD}_{\text{Chứng}} - \text{OD}_{\text{Trắng}}] \times 100$$

OD: mật độ quang

2.2.3. Phương pháp đánh giá khả năng đánh bắt gốc superoxyd $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Superoxide scavenging) [8]

2.2.3.1. Nguyên tắc

Đánh giá khả năng phòng vệ loại bỏ các gốc tự do đã sinh ra của chất nghiên cứu qua việc ngăn chặn sự tạo thành gốc superoxyd $\text{O}_2^{\cdot -}$. Gốc superoxyd được tạo

thành trong phản ứng giữa xanthin và xanthin oxydase sẽ được định lượng bằng phương pháp khử sử dụng nitroblue tetrazolium (NBT) cho phức chất có màu tím được đo quang ở bước sóng $\lambda = 550$ nm. Hoạt tính chống oxy hóa của mẫu thử được thể hiện qua việc làm giảm sự hình thành phức màu tím.

2.2.3.2. Tiến hành

Sử dụng đĩa 96 ô (200 μ l/ô), trong mỗi ô mẫu thử thêm vào theo trình tự như sau:

- 50 μ l dung dịch xanthin 4 mM
- 50 μ l thuốc thử NBT 225 μ M
- 50 μ l đệm phosphat (pH 7,8 có thêm EDTA 1 mM)
- 10 μ l mẫu thử ở các nồng độ khác nhau.
- 40 μ l xanthin oxydase hoạt độ 1 đơn vị/mg

Để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 3 phút và đo quang ở bước sóng $\lambda = 550$ nm. Tiến hành thực hiện song song với ô chứng (thay 10 μ l mẫu thử bằng 10 μ l đệm phosphat) và ô trắng (không có thuốc thử NBT, thay bằng 50 μ l đệm phosphat).

Enzym superoxyd dismutase (SOD) được sử dụng như chất đối chiếu dương tính (positive control).

Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) được tính theo công thức:

$$\text{HTCO (\%)} = [\text{OD}_{\text{Chứng}} - \text{OD}_{\text{Thử}}] / [\text{OD}_{\text{Chứng}} - \text{OD}_{\text{Trắng}}] \times 100$$

OD: mật độ quang.

2.2.4. Phương pháp đánh giá khả năng đánh bắt peroxyhydro H_2O_2 (Hydrogen peroxide scavenging activity) [2]

2.2.4.1. Nguyên tắc

Hai tiểu phân $\text{O}_2^{\cdot -}$ và H_2O_2 sinh ra từ các chuyển hóa trong cơ thể với nồng độ vô cùng thấp, dễ dàng bị loại bỏ và không độc hại cho cơ thể nhưng nếu hiện diện ở nồng độ cao (do stress oxy hóa) chúng có thể tạo ra $^1\text{O}_2$, $^{\cdot}\text{OH}$ là những phân tử và gốc có khả năng phản ứng rất cao, dễ dàng phản ứng với các chất hữu cơ tạo ra các peroxyd và từ đó tạo ra nhiều sản phẩm độc hại cho tế bào. Hoạt tính chống oxy hóa và mẫu thử được thể hiện qua việc làm giảm lượng H_2O_2 đưa đến làm giảm phản ứng màu giữa H_2O_2 và đỏ phenol (màu của đỏ phenol sẽ chuyển sang màu tím sau phản ứng với H_2O_2 trong sự hiện diện của enzym peroxydase từ cải gia vị (horseradish)).

2.2.4.2. Tiến hành

Tiến hành hỗn hợp phản ứng ở các ống thử theo trình tự như sau:

- 20 μ l mẫu thử ở các nồng độ khác nhau.
- 20 μ l H_2O_2 10 mM.
- 1,8 ml đệm phosphat (pH 7 có thêm NaCl 28 mM và dextrose 5,5 mM).

Lắc đều các ống và để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.

- 0,2 ml dung dịch đỏ phenol 0,1% pha trong NaOH 1M.
- 20 μ l enzym horseradish peroxidase hoạt độ 5 mg/ml.

Lắc đều các ống và để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.

- 20 μ l NaOH 1N để ngừng phản ứng.

Đo quang ở bước sóng $\lambda = 610$ nm. Tiến hành thực hiện song song với ô chứng (thay 20 μ l (mẫu thử bằng 20 μ l đệm phosphat) và ô trắng (không có thuốc thử đỏ phenol, thay bằng 0,2 ml đệm phosphat).

Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) được tính theo công thức:

$$HTCO (\%) [(OD_{\text{Chứng}} - OD_{\text{Thử}}) / OD_{\text{Chứng}} - OD_{\text{Trắng}}] \times 100$$

OD: mật độ quang.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Amarowicz R., Pegg. R. P., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., Weil J. A. (2004). *Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the canadian prairies*, Food Chemistry, 84, 551-562.
2. Hisashi Hosoe, Toshihiko Kaise, Kenji Ohmori (2002). *Effects on the reactive oxygen species of Erdosteine and its metabolite in vitro*, Arzneim. - Forsch / Drug Res., 52, 435-440.
3. Trần Văn Hiến, Tạ Thị Phòng, Trần Lê Dung, Nguyễn Thị Minh Thu, Trần Công Khánh, (1999). *Thử thuốc độc tính cấp diễn và tác dụng bảo vệ tế bào gan của cây Xuân Hoa*. Tạp chí Dược học, số 9, trang 15-17.
4. Nguyen Thi Thu Huong, Kino Matsumoto, Ryoji Kasai, Kazuo Yamasaki, Hiroshi Watanabe, (1998). *In vitro antioxidant activity of Vietnamese ginseng saponin and its components*. Biol. Pharm. Bull. 21, 278-298.

5. Nguyễn Thị Thu Hương & Hoàng Thị Mận (2003): Tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của đinh lăng *Polyscias fruticosa* Harms. Araliaceae. Tạp chí Dược liệu, tập 8(5), trang 142-146.
6. Kaori Yobimoto, Kinzo Matsumoto, Nguyen Thi Thu Huong, Ryoji Kasai, Kazuo Yamasaki, Hiroshi Watanabe, (2000). *Suppressive effects of Vietnamese ginseng saponin and its major component majonoside - R2 on psychological stress - induced enhancement of lipid peroxidation in the mouse brain*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 66, 661-665.
7. Lapenna, D, Ciofani, G. Festi, D. Neri, M. Pierdomenico, SD. Giamberardino, MA. Cuccurullo, F., (2002), *Antioxidant properties of ursodeoxycholic acid*. Biochem Pharmacol., 64, 1661-1667.
8. Lee, SM, Na, MK, An, RB, Min, BS, Lee, HK (2003). *Antioxidant activity of two phloroglucinol derivatives from Dryopteris crassirhizoma*. Biol Pharm Bull., 26, 1354-1356.
9. Matsumoto, K. Yobimoto, K. Huong, NT. Abdel-Fattah, M. Van, HT. Watanabe, H., (1999b). *Psychological stress-induced enhancement of brain lipid peroxidation via nitric oxide systems and its modulation by anxiolytic and anxiogenic drugs in mice*. Brain Res., 839, 74-84.
10. Nguyễn Quang Thường, *Gốc tự do của oxy trong Y và Dược* - Trường Đại học Dược Hà Nội, Bộ môn Hóa lý vô cơ (Tủ sách sau đại học).
11. Nguyễn Quang Thường, (1999). *Stress oxy hóa*. Tạp chí Dược học số 9, trang 21-22.
12. Packer. L., (1999). *Oxidants Antioxidants-Part A*. In: John, NA, Melvin, IS eds. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press.
13. Sies, H., (1986). *Biochemistry of oxidative stress*. Angewandte Chem., 25: 1058-1071.

CHƯƠNG 23

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU MỘT SỐ
TÁC DỤNG DƯỢC LÝ KHÁC

GS. Đoàn Thị Nhu

I. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG TĂNG LỰC

1.1. Phương pháp chuột bơi để nghiên cứu tác dụng tăng lực
(*Brekhman, 1951*)

Đây là phương pháp đầu tiên được xây dựng để xác định bán định lượng hoạt tính sinh học của nhân sâm và các thuốc có tác dụng tương tự. Phương pháp thuận tiện và đơn giản, cho phép xác định tính ổn định của sức lực của cơ ở động vật. Phối hợp với một số phương pháp khác, nó có thể được dùng để đánh giá định lượng các thuốc có tác dụng làm tăng sức chịu đựng không đặc hiệu của cơ thể.

Dùng chuột nhắt trắng đực (18 – 22 g), chuột mang ở đuôi một tải trọng bằng 1g / 20g thể trọng (thường dùng một miếng chì kẹp vào đuôi). Cho chuột bơi trong một bể kính chứa nước ở nhiệt độ 23 – 30°C. Trong thí nghiệm, dùng hai nhóm chuột, một nhóm thử thuốc và một nhóm đối chứng, mỗi nhóm chuột bơi trong một bể kính riêng. Thường mỗi nhóm gồm 10 con. Khi bắt đầu thí nghiệm, mỗi tay nắm đuôi của chuột ở mỗi nhóm và thả chuột vào bể kính cho bơi cùng một lúc. Khi đã hoàn toàn mệt, chuột chìm xuống đáy bể và không có thể tự mình ngoi lên được nữa, lúc đó nhanh chóng vớt chuột lên, ghi thời gian chuột bơi, lau khô chuột và sưởi ấm, và cho chuột ở nhóm thử thuốc uống bằng kim cong đầu tù thuốc thử nghiệm pha trong 0,10 – 0,15 ml chất dẫn, và cho chuột ở nhóm đối chứng uống chất dẫn với cùng thể tích.

Sau một giờ, lại cho chuột bơi một lần nữa. Đánh giá tác dụng kích thích tăng lực bằng cách tính tỷ lệ phần trăm của thời gian bơi lần thứ hai so với thời gian bơi lần thứ nhất.

Turova, (1954) và một số tác giả khác đã áp dụng phương pháp chuột cống trắng bơi để nghiên cứu tác dụng kích thích tăng lực của nhân sâm. Dùng chuột cống trắng nhỏ cân nặng 40-50g thay cho chuột nhắt trắng, và tiến hành thí nghiệm như đã mô tả ở trên.

1.2. Phương pháp nghiên cứu tác dụng tăng thích nghi, tăng khả năng chịu lạnh ở chuột cống non và chuột cống già (Wang, 2000)

Dùng hai nhóm chuột cống trắng, một nhóm chuột non (3 – 6 tháng) và một nhóm chuột già (26 – 28 tháng). Chuột được nuôi riêng biệt từng con ở 20°C và chu kỳ chiếu sáng 12 giờ sáng/12 giờ tối. Hạn định thức ăn cho chuột theo khẩu phần, khoảng 20 g/ngày) trong suốt thời gian thí nghiệm để duy trì thể trọng ở khoảng 400 g để giảm thiểu sự thay đổi trong kết quả do sự khác nhau về kích thước cơ thể. Để thức ăn với lượng không hạn chế buổi chiều trước thử nghiệm để đảm bảo đạt kết quả tối đa. Nước luôn có sẵn.

Thực hiện sự phơi nhiễm lạnh cấp tính đối với chuột. Bỏ chuột ra khỏi chuồng nuôi giữ, đặt trong một buồng chuyển hóa bằng kim khí và phơi nhiễm chuột ở -10°C dưới tác dụng của He-O₂ (21% oxy và 79% heli) trong 2 giờ. Hỗn hợp heli-oxy (1,5 lít/phút) được dùng để làm dễ dàng sự mất nhiệt và gây sự sản sinh nhiệt tối đa. Sự tiêu thụ oxy và sự sản sinh carbon dioxyd được ghi và hợp nhất liên tục bởi một hệ thống thu nhận dữ liệu điện toán hóa trực tuyến. Sự sản sinh nhiệt được tính dựa trên sự tiêu thụ oxy và thương số hô hấp. Sự sản sinh nhiệt hợp nhất cho mỗi thời kỳ 15 phút được dùng làm tỷ suất sản sinh nhiệt. Tổng số của 7 thời kỳ 15 phút liên tiếp (phút 16 đến 120) là tổng lượng sản sinh nhiệt. Tỷ suất sản sinh nhiệt cao nhất ở mỗi thời kỳ trong 7 thời kỳ này được dùng làm tỷ suất sản sinh nhiệt tối đa. Nhiệt độ ở kết tràng của chuột được đo trước và sau sự phơi nhiễm lạnh và được dùng làm chỉ số về khả năng chịu lạnh. Để phòng ngừa sự quen và có thể sự thích nghi khí hậu, các lần phơi nhiễm lạnh kế tiếp cho chuột phải cách nhau ít nhất 7 ngày. Cho chuột ở nhóm thứ nhất thuốc thử nghiệm và chuột ở nhóm thứ hai dung dịch muối đẳng trương, với thiết kế thí nghiệm tự đối chứng. Thuốc được cho uống hoặc tiêm trong màng bụng 60 phút (uống) hoặc 30 phút (tiêm trong màng bụng) trước khi phơi nhiễm lạnh.

II. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CHỐNG TĂNG SẢN TUYẾN TIỀN LIỆT LẠNH TÍNH

Tăng sản tuyến tiền liệt lạnh tính là một bệnh thường gặp ở nam giới cao tuổi, gây bởi sự tăng sinh không ác tính của cả các thành phần biểu mô và chất đệm của

tuyến tiền liệt. Sự to lên của mô tuyến tiền liệt có thể dẫn đến gây tắc niệu đạo và khó tiểu tiện. Sự trở ngại trong việc tiểu tiện có thể gây bí tiểu tiện và nguy cơ nhiễm khuẩn đường tiết niệu. Tích dịch niệu quản, ứ nước thận và suy thận có thể tiếp theo sau. Hiện nay, người ta cho rằng sự lão hóa và các androgen là các yếu tố cần thiết cho sự phát triển tăng sản tuyến tiền liệt lành tính, và những thay đổi phụ thuộc vào tuổi tác trong sự ổn định nội mô về nội tiết có thể có tầm quan trọng trong sự phát triển của bệnh này.

Thử nghiệm tác dụng trên mô hình tăng sản tuyến tiền liệt gây thực nghiệm ở chuột nhắt trắng (Lichius và cộng sự, 1999)

Dùng chuột nhắt trắng đực lớn (50 - 70 ngày tuổi) và chuột nhắt trắng cái có thai. Giết chuột cái có thai ở ngày thứ 16 của thời kỳ thai nghén. Tách lấy các bào thai, và tiến hành vi phẫu tích dưới kính hiển vi phẫu tích lập thể để thu lấy các xoang niệu - sinh dục với mô nối liền từ các bào thai. Chuột nhắt trắng đực lớn được dùng làm vật chủ đối với các xoang niệu - sinh dục thu được. Xoang niệu sinh dục của bào thai được cấy vào trong một thùy của tuyến tiền liệt bụng. Thùy đối bên của mỗi tuyến tiền liệt chỉ bị đâm vào bằng một kẹp nhỏ và được dùng làm đối chứng được phẫu thuật giả. Để các mảnh cấy tăng trưởng và phát triển trong 28 ngày. Trong thời gian này, cho chuột ở nhóm điều trị uống thuốc thử nghiệm và cho chuột ở nhóm đối chứng uống chất dẫn, bằng ống thông. Sau 28 ngày, giết chuột, tách lấy các tuyến tiền liệt bụng với các thùy phẫu thuật giả và thùy cấy xoang niệu - sinh dục, và xác định trọng lượng ướt mỗi thùy của tuyến tiền liệt chuột nhắt trắng. Mỗi nhóm chuột điều trị gồm ít nhất 7 con.

III. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CHỐNG BỆNH ALZHEIMER

Bệnh Alzheimer được đặc trưng bởi các thay đổi thoái hóa ở não kèm theo bởi sự mất trí nhớ, đặc biệt đối với các sự kiện mới xảy ra. Các dữ liệu thực nghiệm và lâm sàng cho thấy sự học tập và trí nhớ kết hợp chặt chẽ với tình trạng chức năng của hệ cholinergic trung ương.

Thử nghiệm tác dụng trên mô hình bệnh Alzheimer thực nghiệm ở chuột cống trắng (Bhattacharya và cộng sự, 1995)

Dùng chuột cống đực lớn Wistar, (180 - 200 g). Chuột được nhốt trong chuồng bằng polypropylen ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm tương đối 45 - 55% và trong chu kỳ chiếu sáng 12 giờ sáng và 12 giờ tối. Chuột được cho ăn và uống nước tùy ý. Thực hiện các thí nghiệm trong các điều kiện này giữa 9 giờ và 14 giờ.

- Gây sự suy giảm nhận thức

Gây suy giảm nhận thức ở chuột bằng các phương pháp sau:

a. Tiêm trong não thất colchicin

Đặt canun vào não thất phải bên ở chuột cống trắng được gây mê bằng pentobarbiton natri (40 mg/kg tiêm trong màng bụng), với việc dùng các tọa độ có vị trí xác định trong không gian 0,6 mm sau thóp trước 1,8 mm phải bên và 2,7 mm dưới bề mặt vỏ não. Colchicin (5 µg/chuột) hòa tan trong 5 µl dịch não - tủy nhân tạo, tính bằng mM: NaCl 147, KCl 2,9, MgCl₂ 1,6, CaCl₂ 1,7 và dextrose 2,2), được tiêm chậm vào não thất phải bên được đặt canun bằng một bơm tiêm Hamilton 10 µl.

b. Gây tổn thương nucleus basalis magnocellularis bằng acid ibotenic

Gây tổn thương một bên của *nucleus basalis magnocellularis* bằng cách tiêm acid ibotenic (10 µg/chuột), hòa tan trong 5 µl dịch não tủy nhân tạo, ở chuột cống trắng được gây mê bằng pentobarbiton natri (40 mg/kg tiêm trong màng bụng), với việc dùng các tọa độ có vị trí xác định trong không gian 1,0 mm sau thóp trước, 2,6 mm phải bên và 7,9 mm dưới bề mặt vỏ não.

Chuột ở nhóm đối chứng cũng được thực hiện phương pháp phẫu thuật như trên nhưng được nhận thể tích tương đương dịch não - tủy nhân tạo thay vì các độc tố thần kinh, colchicin và acid ibotenic.

- Thử nghiệm về hành vi

Thiết bị dùng là một cái hộp con thoi có 2 ngăn giống nhau, ngăn cách bởi một cái rào. Trong khi huấn luyện, mỗi chuột được đặt trong một ngăn và sau 5 giây, một cái còi, đặt ở trên trần của hộp con thoi, được làm kêu lên (2,8 kHz, 70 dB) (kích thích có điều kiện) trong 3 giây, tiếp theo sau bởi sốc điện (1,5 mA, 2 giây) (kích thích không điều kiện) qua sàn bằng lưới sắt của hộp. Nếu chuột đi qua ngăn an toàn không có điện khi gây kích thích có điều kiện, một đáp ứng né tránh được ghi; nếu không thì áp dụng kích thích không điều kiện. Mỗi chuột được áp dụng 20 thử nghiệm trong 5 ngày, với một khoảng cách giữa các thử nghiệm là 30 giây, trước khi gây tổn thương, cho đến khi nó đạt tiêu chuẩn có đáp ứng né tránh tích cực 100%. Loại bỏ khỏi nghiên cứu các chuột không đạt tiêu chuẩn này. Sự duy trì đáp ứng né tránh tích cực đạt được, trong các nhóm điều trị khác nhau, được đánh giá vào các ngày 7, 14 và 21, sau khi gây tổn thương bằng colchicin hoặc acid ibotenic, bằng cách ghi số lượng thử nghiệm cần thiết để đạt tiêu chuẩn đáp ứng né tránh tích cực 100%.

. Nghiên cứu hóa sinh

Giết chuột ở nhóm colchicin ở những khoảng cách thời gian được xác định trước và phẫu tích lấy vỏ não trán và hải mã. Các mô được đồng thể hóa trong 10 thể tích (trọng lượng/thể tích) dung dịch đệm Tris - HCl băng (pH 7,6) và chia thành các ước số để đánh giá các mức của acetylcholin bằng kỹ thuật đo huỳnh quang và hoạt độ của cholin acetyltransferase bằng phương pháp bức xạ kế. Độ tổ thần kinh colchicin, tiêm trong não thất, làm giảm rõ rệt nồng độ của acetylcholin ở vỏ não trán và hải mã và làm giảm hoạt độ của cholin acetyltransferase, so với nhóm đối chứng được tiêm dịch não tủy nhân tạo. Thuốc thử nghiệm, nếu có tác dụng tốt, sẽ có tác dụng đảo ngược các tác dụng độc hại của colchicin trên các thông số hóa sinh này.

- Điều trị với thuốc thử nghiệm

Thuốc thử nghiệm dưới dạng dung dịch hoặc dịch treo trong carboxymethylcellulose 0,3% trong nước cất được cho uống trong thể tích 0,5 ml/100 g, ngày một lần, với liều lượng thích hợp, bắt đầu từ ngày 1 ngay trước khi phẫu thuật để tiêm acid ibotenic hoặc colchicin và tiếp tục cho uống đến ngày 21. Động vật đối chứng được cho uống thể tích tương đương chất dẫn, trong cùng thời gian.

IV. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG ỨC CHẾ SỰ DUNG NẠP VÀ ỨC CHẾ TRIỆU CHỨNG CAI NGHIỆN MORPHIN

Tác dụng giảm đau của morphin rất đặc biệt. Nhưng việc điều trị nhiều lần với morphin gây sự phụ thuộc của cơ thể (sự nghiện), đặc trưng bởi các triệu chứng cai nghiện và sự dung nạp thuốc. Do đó có sự nghiên cứu liên tục để tìm ra các thuốc có tác dụng ức chế phát triển sự dung nạp morphin và sự phụ thuộc của cơ thể, cùng với tác dụng đối kháng với sự giảm đau gây bởi morphin.

4.1. Đánh giá tác dụng ức chế sự dung nạp và các triệu chứng cai nghiện morphin trên chuột nhắt trắng (Kim, 1990).

Trong tất cả các thí nghiệm, dùng chuột nhắt trắng đực cân nặng 20 - 23 g, mỗi nhóm gồm 10 - 15 con. Thuốc thử nghiệm, morphin hydroclorid và naloxon hydroclorid được hòa trong dung dịch muối đẳng trương, và apomorphin hydroclorid được hòa tan trong nước muối đẳng trương chứa acid ascorbic 0,1%, ngay trước thử nghiệm, và các thuốc này được cho chuột nhắt uống hoặc tiêm trong màng bụng theo chỉ dẫn.

4.1.1. Đánh giá tác dụng đối kháng với hoạt tính giảm đau của morphin và tác dụng ức chế sự phát triển của dung nạp giảm đau

Trong thử nghiệm về sự đối kháng với morphin, đánh giá tác dụng giảm đau của morphin 5 mg/kg (tiêm dưới da) ở 0, 30, 60 và 90 phút bằng hai phương pháp, rút đuôi do kích thích nhiệt và kẹp đuôi 3 giờ sau khi cho chuột uống thuốc thử nghiệm.

Để thử nghiệm sự dung nạp morphin, chuột được cho morphin 10 mg/kg mỗi ngày một lần trong thời gian 6 ngày, và cho chuột uống thuốc thử nghiệm 30 phút trước khi tiêm morphin hàng ngày. Mức độ của tác dụng ức chế sự phát triển dung nạp morphin của thuốc thử nghiệm dùng uống được chứng tỏ bằng sự tăng của đáp ứng giảm đau với morphin 5 mg/kg (tiêm dưới da) và được đánh giá ở 0, 30, 60, và 90 phút bằng phương pháp rút đuôi do kích thích nhiệt 24 giờ sau lần tiêm morphin cuối cùng.

Thời gian tiềm tàng của sự rút đuôi đối với kích thích nhiệt được xác định trước và ở 0, 30, 60 và 90 phút sau khi tiêm morphin. Dùng trị số 10 giây là điểm kết thúc để tránh hư hại đuôi chuột, trong khi trị số 6 giây được dùng làm điểm kết thúc cho thử nghiệm kẹp đuôi. Tính đáp ứng giảm đau đối với mỗi chuột bằng công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ phần trăm giảm đau (\%)} = \frac{T_t - T_o}{T_c - T_o} \times 100$$

trong đó T_o là trị số đường cơ bản hoặc thời gian phản ứng trước khi tiêm morphin, T_t là thời gian phản ứng ở t phút sau khi tiêm morphin và T_c là thời gian kết thúc. Các thời gian tiềm tàng ở đường cơ bản của sự rút đuôi do kích thích nhiệt trong các nhóm khác nhau là khoảng $2 \pm 0,2$ giây trong khi thời gian tiềm tàng ở đường cơ bản đối với sự kẹp đuôi là khoảng $1 \pm 0,1$ giây. Tác dụng được tính toán là diện tích dưới đường cong (A.U.C) đạt được bằng cách vẽ đồ thị tỷ lệ % giảm đau là tung độ và các khoảng cách thời gian (phút) là hoành độ, và được biểu thị là tỷ lệ phần trăm so với tác dụng đạt được ở động vật đối chứng chỉ được điều trị với morphin 5 mg/kg.

4.1.2. Đánh giá tác dụng ức chế hội chứng cai nghiện gây bởi naloxon

Dùng các nhóm chuột nhất trắng đã được nhận morphin và thuốc thử nghiệm như đã được mô tả trong thử nghiệm về phát triển sự dung nạp morphin. Tác dụng ức chế hội chứng cai nghiện gây bởi naloxon ở chuột nhất trắng phụ thuộc (nghiện) morphin được đánh giá bằng sự giảm các số điểm của hội chứng cai nghiện gây bởi

naloxon 1 mg/kg (tiêm trong màng bụng) trong 30 phút ở ngày thứ bảy, 24 giờ sau lần tiêm morphin cuối cùng. Đánh giá định lượng hội chứng cai nghiện bằng cách đặt chuột trong một bình hình trụ tròn trong mờ có đường kính 35 cm và chiều cao 70 cm và cho điểm hội chứng cai nghiện gây bởi naloxon như sau: nhảy và tiêu chảy, 2 điểm; sa mi mắt, đại tiện, run, hội chứng quặn đau, chồm lên, và chải lông, 1 điểm cho mỗi triệu chứng.

4.1.3. Đo hàm lượng glutathion ở gan chuột nhắt trắng

Các nhóm chuột nhắt trắng đã được nhận morphin và thuốc thử nghiệm như đã được mô tả trong thử nghiệm về phát triển sự dung nạp morphin bị giết vào ngày thứ bảy. Tách lấy gan ngay. Xác định nồng độ glutathion trong gan bằng phương pháp Ellman (1959) như sau: Gan uớt được đồng thể hóa trong 4 thể tích dung dịch đệm natri phosphat 0,5 M, pH 7,4. Để đánh giá glutathion khử, gan đồng thể hóa, 0,5 ml được khử protein bằng cách cho thêm 0,5 ml dung dịch acid trichloroacetic 4% chứa 1 mM Na-EDTA và được ly tâm ở 3000 x g trong 5 phút ở 4°C. Dịch nổi lên trên (0,5 ml) được cho thêm vào 4,5 ml của dung dịch 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) và được để yên trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Hợp dịch phản ứng được đo ở độ hấp thụ 412 nm so với mẫu trắng.

4.1.4. Đánh giá sự tăng nhạy cảm của thụ thể nhận dopamin gây bởi morphin

Xác định tác dụng của thuốc thử nghiệm làm thay đổi sự tăng nhạy cảm của thụ thể nhận dopamin bằng cách đo tác dụng của chất chủ vận của dopamin là apomorphin ở chuột nhắt trắng được điều trị với thuốc thử nghiệm (tiêm trong màng bụng) 30 phút trước khi tiêm morphin 10 mg/kg (tiêm trong màng bụng) hàng ngày trong 7 ngày. Đáp ứng hạ nhiệt với sự tiêm trong màng bụng apomorphin 2 mg/kg đã được xác định 24 giờ sau lần tiêm morphin cuối cùng. Xác định nhiệt độ cơ thể bằng một que thông trực tràng đưa vào 2,5 cm trong nhiệt kế đọc từ xa ở trực tràng. Thực hiện lần đo thứ nhất ngay trước khi tiêm thuốc thử nghiệm và đo lại ở 30, 60, 90 và 120 phút sau khi tiêm.

4.1.5. Đánh giá tác dụng ức chế sự dung nạp trên hoạt tính kích thích vận động của morphin

Đánh giá hoạt tính tăng vận động của morphin bằng việc nghiên cứu tác dụng của nó trên hoạt động vận động của chuột nhắt trắng. Hoạt tính được đo bằng các lồng hoạt động tròn. Mỗi lồng có đường kính 35 cm và chiều cao 20 cm và được trang bị 6 nguồn ánh sáng và 6 tế bào quang học đặt ngay trên mức sàn.

Để thử nghiệm tác dụng ức chế sự dung nạp morphin, tiêm morphin 10 mg/kg dưới da cho chuột nhất trắng ngày một lần trong 7 ngày và tiêm trong màng bụng thuốc thử nghiệm 4 giờ trước khi tiêm morphin hàng ngày, mỗi chuột nhất được đặt trong lồng hoạt động trong thời gian 5 phút trước khi ghi, tiếp sau đó là thời gian ghi hoạt động 30 phút.

Trong một nghiên cứu về tác dụng ức chế sự dung nạp và hội chứng cai nghiện morphin của một cao nhân sâm tiêu chuẩn hóa G115 (Kim, 1990) với các phương pháp thí nghiệm mô tả ở trên, cao G115 đã ức chế có ý nghĩa sự phát triển dung nạp và sự phụ thuộc của cơ thể (sự nghiện) gây bởi morphin, sự giảm mức glutathion trong gan gây bởi tiêm morphin nhiều lần, sự phát triển tăng nhạy cảm của thụ thể nhận dopamin gây bởi morphin, và sự dung nạp đảo ngược đối với tác dụng làm tăng nhanh vận động của morphin. Tuy nhiên, cao G115 không đối kháng với tác dụng giảm đau của morphin.

4.2. Đánh giá tác dụng làm giảm triệu chứng cai nghiện morphin trên hồi tràng có lập chuột lang (Capasso và cộng sự, 1997)

Dùng chuột lang đực cân nặng 200 đến 250 g. Chuột lang được nhốt trong các chuồng chung, với chế độ chiếu sáng tiêu chuẩn (chiếu sáng từ 7 giờ sáng đến 7 giờ tối), các điều kiện nhiệt độ ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), và ẩm độ phòng ($60\% \pm 10\%$) trong ít nhất một tuần trước các đợt thí nghiệm. Chuột được cho ăn và uống nước tùy ý.

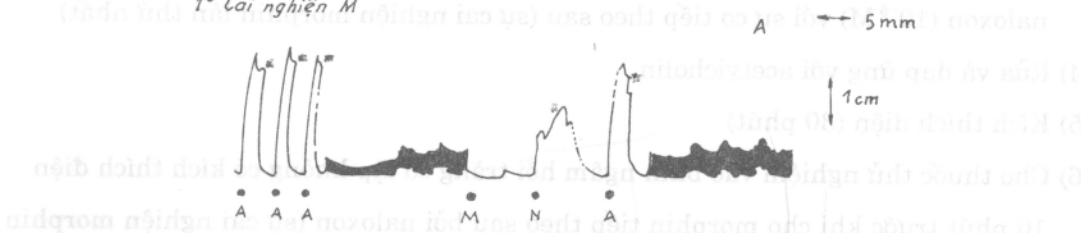
a. Phương pháp gây triệu chứng cai nghiện morphin trên hồi tràng có lập

Hồi tràng có lập chuột lang được để cân bằng trong 40 – 60 phút mà không rửa, và đáp ứng với acetylcholin được xác định 3 lần (10^{-6}M) sao cho các đáp ứng có thể được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm của đáp ứng tối đa với acetylcholin. Có thể đạt biểu hiện có thể lặp lại của sự phụ thuộc (sự nghiện) cấp tính morphin bằng cách thực hiện phương pháp thực nghiệm sau đây. Một hình vẽ điển hình của các đáp ứng co của hồi tràng với nhiều lần cho morphin và naloxon được trình bày ở dưới.

Sau 3 đáp ứng giống nhau với acetylcholin, tiêu bản hồi tràng được kích thích điện trong 10 - 20 phút (xung 0,5 mili-giây phát qua thành ruột, với tần số 10 giây ở điện áp trên tối đa, 25V). Trước khi cho morphin vào dịch ngâm, ngừng kích thích điện. Trong điều kiện này, sự tiếp xúc đầu tiên với morphin tiếp sau bởi sự phơi nhiễm với naloxon trong 4 phút gây co mạnh (khoảng 60% của đáp ứng tối đa với acetylcholin). Tuy nhiên, sau khi rửa, một đáp ứng khác với acetylcholin được thực hiện (để kiểm tra xem tính đáp ứng của hồi tràng có thay đổi sau sự co do hội chứng cai nghiện) (hình A) và sau thời gian nghỉ 30 phút dưới sự kích thích điện, một sự phơi nhiễm khác trong 4 phút của hồi tràng (không có kích thích điện) với morphin và naloxon gây một đáp ứng có thể lặp lại. Sau khi rửa, đáp ứng với acetylcholin (Hình B), và một thời gian nghỉ 30 phút khác dưới sự kích thích điện, hồi tràng lại đáp ứng với morphin và naloxon với cùng cường độ (hình C).

Trong các thí nghiệm, để tránh sự dung nạp có thể xảy ra do tiêm nhiều lần morphin, chỉ nên thử mỗi tiêu bản ruột cô lập với 3 lần cho morphin và naloxon. Naloxon tự nó không gây tác dụng nào trên các tiêu bản ruột cô lập mới hoặc đã được rửa sau sự tiếp xúc với morphin.

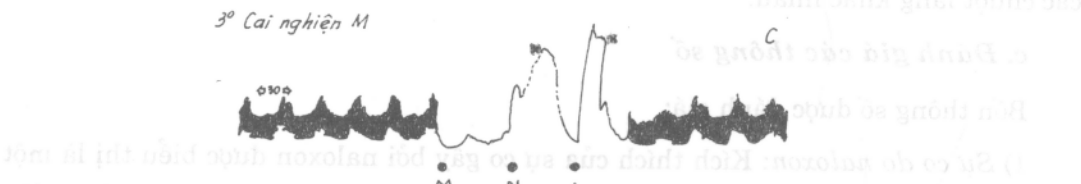
1° Cai nghiện M



2° Cai nghiện M



3° Cai nghiện M



Đường vẽ điển hình của triệu chứng cai nghiện morphin trên hồi tràng chuột lang.

Chú thích:

- 3 đáp ứng tương tự với acetylcholin (A), kích thích điện, cho morphin (M) vào dung dịch ngâm ruột, tiếp theo sau thời gian 4 phút tiếp xúc bởi naloxon (N), gây co hồi tràng (triệu chứng cai nghiện morphin đầu tiên). Sau khi rửa (■), thực hiện một đáp ứng A khác.
- Sau thời gian nghỉ 30 phút dưới sự kích thích điện, một sự phơi nhiễm trong 4 phút nữa của hồi tràng với morphin và naloxon gây một đáp ứng có thể lặp lại (sự cai nghiện morphin thứ hai).
- Sau thời gian nghỉ 30 phút khác dưới kích thích điện, hồi tràng lại đáp ứng với morphin và naloxon với cùng cường độ (sự cai nghiện morphin thứ ba).

b. Phương pháp thử nghiệm thuốc

Việc thử nghiệm tác dụng của thuốc làm giảm triệu chứng cai nghiện morphin được thực hiện theo trình tự sau:

- 1) 3 đáp ứng với acetylcholin
- 2) Kích thích điện (10 – 20 phút)
- 3) Tiêm morphin (10^{-6} M) trong khi không có kích thích điện (4 phút) và cho thêm naloxon (10^{-5} M) với sự co tiếp theo sau (sự cai nghiện morphin lần thứ nhất)
- 4) Rửa và đáp ứng với acetylcholin
- 5) Kích thích điện (30 phút)
- 6) Cho thuốc thử nghiệm vào bình ngâm hồi tràng cô lập không có kích thích điện 10 phút trước khi cho morphin tiếp theo sau bởi naloxon (sự cai nghiện morphin lần thứ hai)
- 7) Rửa và đáp ứng với acetylcholin
- 8) Kích thích điện (30 phút)
- 9) Sự cai nghiện morphin đối chứng cuối cùng (sự cai nghiện morphin lần thứ ba).

Mỗi thí nghiệm được thực hiện trên ít nhất 6 đến 8 tiêu bản hồi tràng cô lập từ các chuột lang khác nhau.

c. Đánh giá các thông số

Bốn thông số được đánh giá:

- 1) *Sự co do naloxon*: Kích thích của sự co gây bởi naloxon được biểu thị là một phân số của sự co tối đa đạt được với việc cho tiếp sau acetylcholin trên cùng tiêu bản hồi tràng theo công thức sau:

$$\frac{\text{Đáp ứng với naloxon}}{\text{Đáp ứng tối đa với acetylcholin}} \times 100 = \text{Tỷ lệ sự co}$$

- 2) *Các đáp ứng với acetylcholin trước và sau việc cho thuốc thử nghiệm*: Sự giảm hoặc tăng của các đáp ứng với acetylcholin trong giai đoạn sau khi cho thuốc thử nghiệm được biểu thị là tỷ lệ phần trăm của đáp ứng với acetylcholin trong giai đoạn trước khi cho thuốc.

- 3) *Sự co do kích thích điện trước và sau khi cho thuốc thử nghiệm*: Sự giảm hoặc tăng của sự co do kích thích điện trong giai đoạn sau khi cho thuốc được biểu thị là tỷ lệ phần trăm của sự co do kích thích điện trong giai đoạn trước khi cho thuốc thử.

- 4) *Sự co do naloxon trước và sau khi cho thuốc thử nghiệm*: Sự giảm hoặc tăng của sự co do naloxon trong giai đoạn sau khi cho thuốc thử nghiệm được biểu thị là tỷ lệ phần trăm của sự co do naloxon trong giai đoạn trước khi cho thuốc.

Trong thử nghiệm về tác dụng của các alcaloid isoquinolin của *Argemone mexicana* (gai cua) với phương pháp nêu trên, các alcaloid này, cho vào bình ngâm ruột 10 phút trước khi cho morphin, có khả năng làm giảm triệu chứng cai nghiện morphin. Sau khi rửa, cả đáp ứng với acetylcholin, sự co do kích thích điện và sự co do naloxon đều vẫn giảm. Tác dụng gây giảm triệu chứng cai nghiện này có thể có liên quan với hoạt tính kháng cholinergic của các chất này.

V. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ TÁC DỤNG HẠ SỐT

5.1. Thử nghiệm tác dụng hạ sốt trên mô hình gây sốt bằng men (*Teotino và cộng sự, 1963*)

Thử nghiệm trên chuột cống trắng. Gây sốt cho chuột bằng một mũi tiêm dưới da, (1 ml cho 100 g thể trọng) dịch treo men 12%. Mười giờ sau, cho chuột uống thuốc thử nghiệm qua ống thông dạ dày. Xác định thân nhiệt trung bình của nhóm chuột ở 90, 180, và 270 phút sau khi cho liều thuốc thử nghiệm. Tính sự khác nhau giữa thân nhiệt trung bình của nhóm đối chứng và thân nhiệt trung bình của nhóm thử thuốc. Đối với acid acetylsalicylic, sự khác nhau này là 1,3 độ với liều 300 mg/kg.

5.2. Thử nghiệm tác dụng hạ sốt trên mô hình gây sốt bằng vaccin thương hàn - cận thương hàn A/B (*mô tả bởi Godhwani S. và cộng sự, 1987*)

Thử nghiệm trên chuột cống trắng. Một nhóm chuột được dùng làm đối chứng và chỉ được nhận vaccin thương hàn - cận thương hàn A/B với liều 1 ml/kg tiêm dưới da. Một hoặc 2,3 nhóm chuột khác nhận một, hoặc 2, 3 liều thuốc thử nghiệm khác nhau bằng đường uống cùng với vaccin tiêm dưới da. Một nhóm chuột khác được cho uống natri salicylat 300 mg/kg làm thuốc chuẩn. Đo nhiệt độ trực tràng với một nhiệt kế 1 phút trước khi tiêm vaccin và cho uống thuốc thử nghiệm và sau đó mỗi giờ một lần trong 4 giờ. Trong thử nghiệm này, cùng động vật được dùng làm đối chứng cho chính nó.

VI. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DƯỢC LÝ TÁC DỤNG CHỐNG BÉO PHÌ (*Kobayashi Y. và cộng sự, 2001*)

6.1. Động vật và chế độ ăn

Dùng chuột nhắt trắng đực (9 tuần tuổi) hoặc chuột cống trắng đực (4 tuần tuổi). Nhiệt độ phòng được duy trì ở $22 \pm 2^\circ\text{C}$ với chu kỳ sáng tối 12 giờ (chiếu sáng từ 7 đến 19 giờ). Tất cả động vật được nhốt riêng từng con trong các

chuồng bằng chất dẻo (215 mm x 320 mm x 140 mm cho một chuột nhắt, hoặc 280 x 440 x 180 mm cho 1 chuột cống trắng) và được cho thức ăn và nước tùy thích trong thời gian thích nghi. Thức ăn tán bột được để trong dụng cụ chứa không gỉ đặt ở góc của mỗi chuồng.

Thành phần của thức ăn chứa thuốc thử nghiệm cho chuột nhắt trắng được trình bày ở bảng 1. Trong thí nghiệm trên chuột cống trắng, dùng thức ăn chứa nhiều mỡ (chứa 30% mỡ) để gây béo phì có hiệu quả hơn. Chuẩn bị thức ăn có nhiều mỡ đối chứng và thức ăn có nhiều mỡ chứa thuốc thử nghiệm theo thành phần ở bảng 2. Không dùng thức ăn chứa nhiều mỡ cho chuột nhắt trắng vì chuột này tránh ăn thức ăn chứa 30% mỡ.

Chế độ ăn cơ bản nêu trong bảng được Viện Dinh dưỡng Hoa Kỳ (AIN) khuyến dùng. Casein (Không chứa vitamin), natri cholat, và cholin clorid được mua của Wako Pure Chemicals Co., Ltd. (Osaka, Nhật Bản). Mỡ lợn, sucrose, và bột ngô được mua của Kishida chemicals Co.Ltd. (Osaka, Nhật Bản). Hỗn hợp chất khoáng (AIN-76) và hỗn hợp vitamin (AIN-76) được mua của CLEA Japan Inc. (Tokyo, Nhật Bản).

**Bảng 1. Thành phần các thức ăn thử nghiệm
tán bột cho chuột nhắt trắng**

	Chế độ ăn cơ bản % (trọng lượng/trọng lượng)	Chế độ ăn có thuốc thử nghiệm % (trg.lg/trg.lg)
Thuốc thử nghiệm	—	x
Casein	20	20
Mỡ lợn	10	10
Sucrose	10	10
Hỗn hợp chất khoáng*	4	4
Hỗn hợp vitamin*	1	1
Bột cellulose	2	2
Natri cholat	0,125	0,125
Cholin clorid	0,2	0,2
Bột ngô	52,675	52,675-x

* Chế độ ăn AIN-76; x = tỷ lệ % của thuốc thử nghiệm trộn lẫn trong thức ăn.

**Bảng 2. Thành phần các thức ăn thử nghiệm
tán bột cho chuột cống trắng**

	Chế độ ăn cơ bản % (trg.lg/trg.lg)	Chế độ ăn nhiều mỡ đối chứng % (trg/lg/trg.lg)	Chế độ ăn nhiều mỡ với thuốc thử nghiệm % (t.l/t.l)
Thuốc thử nghiệm	—	—	x
Casein	20	20	20
Mỡ lợn	5	15	15
Dầu ngô	5	15	15
Sucrose	30	30	30
Hỗn hợp chất khoáng*	4	4	4
Hỗn hợp vitamin	1	1	1
Bột cellulose	2	2	2
Cholin clorid	0,2	0,2	0,2
Bột ngô	32,80	12,80	12,80-x

Chú thích: * Chế độ ăn AIN-76; t.l/t.l. = trọng lượng/trọng lượng;

x = tỷ lệ % của thuốc thử nghiệm trộn lẫn trong thức ăn.

Sự tăng trọng lượng cơ thể và lượng thức ăn ăn vào được đo hàng ngày trong suốt thời gian thí nghiệm. Thức ăn rơi vãi được thu lại bằng các cái rây. Để chung thức ăn còn lại trong máng ăn và thức ăn rơi vãi trong chuồng, sấy trong tủ sấy ở 80°C trong 3 giờ và cân.

6.2. Thử nghiệm tác dụng trên mỡ nội tạng chuột nhắt trắng

Sau sự thích nghi với chế độ ăn cơ bản trong 7 ngày, các chuột nhắt trắng đực, 9 tuần tuổi được để nhịn ăn trong 24 giờ rồi được chia thành 2 nhóm, mỗi nhóm 6 con dựa trên trọng lượng cơ thể. Một nhóm được cho chế độ ăn cơ bản và nhóm kia được cho chế độ ăn với thuốc thử nghiệm. Cả 2 nhóm được cho ăn tùy thích. Sau khi được cho ăn trong 12 ngày, chuột được để nhịn ăn trong 1 ngày, được gây mê với pentobarbital 50 mg/kg, và bị giết. Cắt ngay lấy khối mỡ quanh thận và khối mỡ mào tinh hoàn của mỗi chuột và cân.

6.3. Thử nghiệm tác dụng trên trọng lượng và khối mỡ nội tạng của chuột cống trắng

Thí nghiệm sau đây được thực hiện với chế độ ăn chứa thuốc thử nghiệm được chuẩn bị như nêu ở trên. Đôi khi chuột thí nghiệm hơi tránh ăn thức ăn có trộn lẫn một loại thuốc thử nghiệm nào đó, trong trường hợp này, tiến hành việc cho ăn từng đôi chậm lại một thời gian thích hợp để lượng thức ăn thu nhận vào của chuột ở mỗi nhóm (nhóm chế độ ăn nhiều mỡ với thuốc thử nghiệm, và nhóm chế độ ăn nhiều mỡ đối chứng) bằng nhau.

Các chuột cống trắng đực 4 tuần tuổi được cho ăn lúc đầu với chế độ ăn cơ bản trong 7 ngày. Mười đôi chuột được chọn dựa trên lượng thức ăn thu nhận và tốc độ tăng trọng lượng cơ thể. Hai mươi chuột này được chia thành hai nhóm: nhóm chế độ ăn nhiều mỡ với thuốc thử nghiệm và nhóm chế độ ăn nhiều mỡ đối chứng. Một chuột ở nhóm thử thuốc được cho ăn tùy thích chế độ ăn nhiều mỡ với thuốc thử nghiệm. Chuột kia ở mỗi đôi được cho chế độ ăn nhiều mỡ đối chứng để cho ăn những lượng thức ăn bằng nhau cho mỗi chuột ở cùng đôi. Sau khi đã tiếp tục việc cho ăn từng đôi trong 21 ngày, chuột ở nhóm chế độ ăn nhiều mỡ đối chứng được để nhịn ăn trong 24 giờ, rồi được gây mê bằng pentobarbital 50 mg/kg và bị giết. Thí nghiệm với nhóm chế độ ăn nhiều mỡ với thuốc thử nghiệm được kết thúc cùng thời gian hoặc chậm hơn để có lượng thức ăn nhận vào bằng nhau với nhóm đối chứng. Lấy máu từ động mạch chủ bụng để tách huyết thanh. Cắt ngay khối mỡ quanh thận, khối mỡ mào tinh hoàn, và mô mỡ nâu gian xương bả vai của mỗi chuột và cân.

6.4. Phân tích hóa sinh huyết thanh và gan

Xác định các nồng độ của lipid, triglycerid, cholesterol, các acid béo tự do, glucose, insulin, transaminase GPT và GOT.

6.5. Thử nghiệm tác dụng trên nhiệt độ cơ thể

Do sự thay đổi nhiệt độ cơ thể ở động vật không gây mê vì sự sản sinh nhiệt bị ức chế dưới tác dụng của thuốc mê. Một cực dò nhiệt độ vô tuyến được cấy vào trong bụng của mỗi chuột nhất đực, (6 tuần tuổi) được gây mê với pentobarbital 50 mg/kg. Chuột được để hồi phục sau phẫu thuật trong thời gian 7-10 ngày trước thử nghiệm. Nhốt tất cả chuột riêng từng con trong các lồng bằng chất dẻo và cho thức ăn và nước uống tùy ý. Đo nhiệt độ ở giữa cơ thể lúc nghỉ giữa 9 đến 10 giờ trong phòng ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) mỗi ngày bằng một máy quét/đặt chương trình (scanning/programming) (DAS - 5001 Console System, Bio Medic Data Systems, Inc., NJ, U.S.A.).

Các thay đổi về nhiệt độ da đuôi được đo bằng một hệ phân tích hình ảnh nhiệt ký, Thermo-Viewer (JT 5200, JEOL Datum Ltd. Tokyo, Japan), trong 15 phút trước và 60 phút sau khi tiêm thuốc thử nghiệm ở khoảng cách 30 giây. Nhiệt độ của da đuôi không đồng đều. Do đó, nhiệt độ cao nhất ở một vùng cố định ở da đuôi được đo với phần mềm phân tích hình ảnh (TG - 5000 CNTA, JEOL Datum Ltd. Tokyo, Japan). Tất cả các lần đo được thực hiện trong thời gian 9-12 giờ. Các dung dịch thuốc thử nghiệm được pha trong ethanol/Tween 80/nước muối đẳng trương (1 : 1 : 8) và tiêm dưới da. Chuột ở nhóm đối chứng được tiêm chất dẫn.

Trong một công trình nghiên cứu về tác dụng chống béo phì của alcaloid evodiamin từ quả của cây ngô thù (*Evodia rutaecarpa*) bằng các phương pháp nêu trên, Kobayashi Y. và cộng sự (2001) đã chứng minh khi bổ sung evodiamin với tỷ lệ 0,03% vào chế độ ăn và cho chuột nhắt trắng ăn trong 12 ngày, trọng lượng khối mỡ quanh thận thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm đối chứng. Khối mỡ mào tinh hoàn cũng giảm trong nhóm chế độ ăn có thêm evodiamin. Khi bổ sung evodiamin với tỷ lệ 0,02% dưới dạng cao ethanol của quả ngô thù vào chế độ ăn nhiều mỡ và cho chuột cống trắng ăn trong 21 ngày, trọng lượng cơ thể, trọng lượng mỡ quanh thận, trọng lượng mỡ mào tinh hoàn, các mức acid béo tự do trong huyết thanh, lipid toàn phần trong gan, triglycerid trong gan và mức cholesterol trong gan đều giảm có ý nghĩa so với nhóm chế độ ăn đối chứng. Chuột nhắt trắng nhện ăn được tiêm dưới da 1-3 mg/kg evodiamin thể hiện sự giảm thân nhiệt 1-2°C. Những kết quả trên là những biểu hiện của tác dụng chống béo phì của evodiamin.

CHƯƠNG 24

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH TRƯỜNG DIỄN CỦA THUỐC

PGS.TSKH. Đỗ Trung Đàm

I. ĐẠI CƯƠNG VỀ NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH

1.1. Tầm quan trọng của nghiên cứu độc tính

1) Thuốc dùng phải an toàn, nếu không an toàn thì dù có tác dụng mạnh đến mấy cũng không được dùng.

2) Phải có quy chế "Thường quy đánh giá tính an toàn của thuốc". Tùy theo điều kiện của từng nước mà có quy định cụ thể. Mỗi nước thường có quy định khác nhau (xem bảng), nhưng khuynh hướng chung, ngày càng xích lại gần nhau.

3) Để làm tốt việc này, phải có nguồn kinh phí và phải có đội ngũ cán bộ có chất lượng.

4) Phải hiện đại hóa việc nghiên cứu độc tính, xây dựng phòng nghiên cứu theo tiêu chuẩn "Thực hành tốt phòng thí nghiệm" (Good laboratory practice).

1.2. Những nội dung nghiên cứu độc tính

1- Nghiên cứu độc tính cấp (Acute toxicity)

2- Nghiên cứu độc tính trường diễn (Long-term toxicity)

3- Nghiên cứu độc tính tại chỗ (Local toxicity)

4- Nghiên cứu độc tính chuyên biệt (Special toxicity)

+ Độc tính sinh biến chủng (đột biến) Mutagenicity toxicity)

+ Độc tính sinh ung thư (Carcinogenicity toxicity)

- + Độc tính trên sinh sản và phát triển (Reproductive and development toxicity)

**Cơ quan điều hành quy chế quốc gia đánh giá tính an toàn
của thuốc và tên quy chế ở một số nước**

Nước	Tên cơ quan điều hành	Tên quy chế
Australia	Cục Y tế (Australian Department of Health)	Guidelines for preparation and Presentation of Applications for Investigational Drugs and Drug Products
Canada	Ban Bảo vệ sức khỏe (Health Protection Board)	Preclinical Toxicology Guidelines
Pháp	Bộ Y tế công cộng và An toàn xã hội (Ministry of Public Health and Social Security)	Guidelines for the Analytical Pharmacological and Toxicological Testing of Pharmaceuticals
Nhật	Bộ Y tế và Phúc lợi xã hội (Ministry of health and Welfare)	Guidelines for Toxicity Studies of Drugs
Bắc Âu (nhiều nước)	Thường là Bộ Y tế và phúc lợi xã hội	Guidelines for registration of New Drugs
Anh	Cục Y tế và An toàn xã hội (Department of Health and Social Security)	Guidance Notes on Applications for Product Licences
Hoa Kỳ	Cơ quan Thực Dược phẩm (Food and Drug administration, FDA)	Guidelines issued by the PMA but prepared in conjunction with FDA
Việt Nam	Cục Quản lý Dược Việt Nam (có sự tham gia của Vụ Khoa học - Đào tạo và Vụ Y học Cổ truyền)	Quy chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực thuốc cổ truyền. Quyết định 371/BYT-QĐ, 12-3-1996. Quy chế cho phép sản xuất và lưu hành một loại thuốc. Quyết định 249/BYT-QĐ, 15-5-1989

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH TRƯỜNG DIỄN

(Long-term toxicity study)

2.1. Thời gian nghiên cứu

Trước đây, thường chia ra độc tính bán cấp, độc tính bán mạn tính và độc tính mạn tính. Hiện nay có khuynh hướng gọi chung là độc tính trường diễn và tùy theo thời gian dùng thuốc cho người dài ngắn mà quyết định phải nghiên cứu trong thời gian là bao nhiêu. Bảng sau là quy định thời gian nghiên cứu độc tính ở động vật tùy theo thời gian dùng thuốc cho người.

**Thời gian nghiên cứu độc tính ở động vật
theo thời gian dùng thuốc cho người**

Thời gian định dùng ở người	Thời gian nghiên cứu ở động vật					
	Bắc Âu (Thụy Điển)	Châu Âu	Anh	Canada	Hoa Kỳ	Việt Nam
Một đến nhiều lần trong ngày	2-4 tuần	2 tuần	2 tuần	-	2 tuần	Dùng hàng ngày, thời gian gấp 4 lần cho người
Dùng hàng ngày đến 7 ngày	-	4 tuần	4 tuần	4-6 tháng	-	
Dùng hàng ngày đến 30 ngày	ít nhất 3 tháng	3 tháng	5 tháng	18 tháng	1 tháng	
Dùng hàng ngày trên 30 ngày	ít nhất 6 tháng	6 tháng	6 tháng	-	3 tháng	

2.2. Một số quy định khác

2.2.1. Động vật nghiên cứu

a. Loài động vật

- Thỏ
- Chuột cống trắng
- Nhiều nước quy định dùng 2 loại: thỏ và chuột cống trắng.

b. Đực, cái: Tùy theo thí nghiệm, có khi do đợt mua

- Chỉ dùng đực
- Chỉ dùng cái
- Nửa đực, nửa cái

- Đục cái đều dùng

c. Số con vật thử

- Thỏ: Thường dùng mỗi lô 6 con, đục cái đều dùng, tốt nhất là 3 đục, 3 cái.
- Chuột cống trắng: Thường dùng mỗi lô 10 con, đục cái đều dùng, tốt nhất là 5 đục 5 cái. Có nước quy định 20 con: 10 đục, 10 cái. Nếu trong quá trình thí nghiệm, phải giết chuột xét nghiệm, thì phải tăng lên tùy yêu cầu.

2.2.2. Đường dùng thuốc

Thường dùng cho động vật đường dùng dự kiến dùng cho người. Ngoài ra, có thể dùng thêm một đường dùng khác.

2.2.3. Liều dùng

Phải dùng 3 liều

- Một liều có tác dụng nhưng không gây độc. Có thể lấy liều dùng cho người làm cơ sở, rồi dùng phép ngoại suy, tính ra liều ở con vật định thử độc tính.
- Một liều gây tác dụng độc rõ rệt để biết thuốc gây độc theo kiểu nào là chính, là phụ (gan, tim, phổi, dạ dày, ruột...)
- Một liều nằm giữa liều bình thường không gây độc và liều gây độc rõ để biết ở mức độ độc ít có những biểu hiện như thế nào.
- Ở ta, thường chỉ dùng một liều thấp để thuyết trình là thuốc của mình nghiên cứu không có độc.

2.2.4. Các thời điểm theo dõi

- Trước khi bắt đầu thí nghiệm.
- Trong khi dùng thuốc: 1 tuần, 2 tuần, 1 tháng, 2 tháng, 3 tháng...
- Ngay sau khi dùng thuốc.
- Sau khi ngừng thuốc một thời gian để theo dõi sự phục hồi (trừ những con đã chết và những con đã xét nghiệm mô học).
- Riêng xét nghiệm đại thể và vi thể các cơ quan, thì tiến hành lúc:
 - + Ngay khi thấy con vật chết.
 - + Con vật còn hấp hối, nhưng triển vọng sẽ chết.
 - + Sau khi kết thúc thí nghiệm

2.3. Các thông số theo dõi

2.3.1. Biểu hiện chung

Theo dõi và ghi chép các biểu hiện chung để đánh giá sự phát triển chung của cơ thể động vật thí nghiệm. Các thông số theo dõi gồm:

- Hành vi: tăng đi lại, giảm đi lại, nằm im, run rẩy, co giật.
- Lông (mượt, rụng đứng, rụng...) và các cơ quan: mắt, mũi,...
- Cân nặng: tuân theo dõi 1 lần.
- Mức ăn, mức uống.
- Tình hình ỉa, đái.

2.3.2. Các thông số huyết học (trước, trong và sau khi dùng thuốc)

Số lượng và chất lượng các tế bào máu phản ánh tình trạng của cơ quan tạo máu. Nếu thuốc tác động đến cơ quan tạo máu sẽ làm thay đổi số lượng và chất lượng các tế bào máu. Những thông số huyết học thường tiến hành khi nghiên cứu độc tính trường diễn gồm:

2.3.2.1. Hồng cầu

Hồng cầu, cơ quan có chức năng quan trọng nhất là vận chuyển oxy đến cho cơ thể và lấy CO_2 ra khỏi cơ thể. Ngoài ra, hồng cầu còn một số enzym thuộc hệ thống enzym tiêu glucid, catalase, anhydrase carbonic và một số enzym khác.

Hồng cầu là những tế bào không có nhân. Sau khi nhuộm Giemsa rồi nhìn qua kính hiển vi sẽ thấy hồng cầu hình tròn, màu hồng, ở giữa hơi nhạt.

Số lượng hồng cầu được biểu thị bằng triệu/ mm^3 . Tính theo đơn vị quốc tế mới là T/l tức là tera/lít. Tera ở đây là 10^{12} , cho nên đơn vị tính theo T/l cũng tương đương với đơn vị triệu/ mm^3 .

2.3.2.2. Hemoglobin (còn gọi là huyết sắc tố)

Hemoglobin trong hồng cầu có nhiệm vụ tiếp nhận oxy khi qua phổi và nhường lại oxy đó cho các tế bào khi qua các mao mạch. Định lượng hemoglobin để biết được khả năng vận chuyển oxy của hồng cầu. Có thể định lượng hemoglobin bằng phương pháp Van Slyke. Nhưng hiện nay, thường dùng phương pháp Drabkin, chuyển hemoglobin thành cyanhemoglobin và đọc trên quang kế. Đơn vị đo là g/dl tức là g/100 ml máu. Nhưng hiện nay, thường biểu thị bằng mM/l.

2.3.2.3. Tỷ lệ thể tích huyết cầu trong máu (Hematocrit)

Tỷ lệ thể tích huyết cầu trong máu cũng phản ánh được một phần tình trạng của hồng cầu (có thể biết cả tình trạng của bạch cầu và tiểu cầu nếu có bệnh lý)

Nếu ly tâm máu đã chống đông, ta sẽ được 2 phần, phần trên lỏng là huyết tương, phần dưới đặc là các huyết cầu. Trong phần này, ở trên cùng là một lớp trắng, mỏng, tập trung bạch cầu và tiểu cầu, dưới là lớp màu đỏ, dày, tập trung hồng cầu.

Để xác định dễ dàng hơn, người ta dùng ống hematocrit có khắc vạch sẵn. Sau khi ly tâm, chỉ cần đọc chiều cao của cột hồng cầu. Đó chính là tỷ lệ % giữa huyết cầu, chủ yếu là hồng cầu (vì bình thường, bạch cầu và tiểu cầu có rất ít so với hồng cầu) và máu toàn phần. Hematocrit được biểu thị bằng %, tức tỷ lệ % thể tích huyết cầu so với thể tích máu.

2.3.2.4. Thể tích trung bình của một hồng cầu

Sự thay đổi thể tích trung bình của một hồng cầu phản ánh được một phần tình trạng của hồng cầu. Khi đã biết hematocrit, ta biết được thể tích hồng cầu trong một đơn vị thể tích máu nào đó. Nếu ta lại biết số lượng hồng cầu cũng trong một đơn vị thể tích, lấy thể tích hồng cầu chia cho số lượng hồng cầu, sẽ thu được thể tích trung bình của một hồng cầu. Cần chú ý là phải quy ra cùng một đơn vị thể tích máu. Ví dụ, dùng đơn vị là 1 lít máu, ta phải tính xem thể tích hồng cầu trong 1 lít máu là bao nhiêu, rồi cũng tính số lượng hồng cầu trong 1 lít máu, rồi chia cho nhau (chia thể tích hồng cầu trong 1 lít máu cho số lượng hồng cầu trong 1 lít máu)

Đơn vị tính cho thể tích trung bình của 1 hồng cầu theo đơn vị quốc tế là fm^3 (ở đây là femto bằng 10^{-15}).

2.3.2.5. Tiểu cầu

Nhiệm vụ chính của tiểu cầu là tham gia vào cơ chế đông máu. Thuốc làm tăng hoặc giảm số lượng tiểu cầu có ảnh hưởng đến quá trình đông máu. Tiểu cầu ở dạng lưu động trong máu là những phần tử rất nhỏ, tròn hoặc bầu dục, đường kính 2-5 μm , thể tích 5-10 μm^3 . Với người bình thường, 1 mm^3 máu có 200 000 - 300 000 tiểu cầu. Đơn vị quốc tế mới dùng là G/l (giga/lít tức là 10^9 tiểu cầu/lít. Ví dụ xét nghiệm thấy 200 000 tiểu cầu trong 1 mm^3 máu, ta ghi số lượng tiểu cầu là 200 000/ mm^3 , hoặc $200 \times 10^3/\text{mm}^3$, hoặc 200 nghìn/ mm^3 , hoặc 200 G/l theo quy ước mới của quốc tế.

2.3.2.6. Bạch cầu

Chức năng chính của bạch cầu là thực bào và sản xuất gamma-globulin. Một số thuốc có thể ảnh hưởng đến số lượng và chất lượng của bạch cầu. Bạch cầu luôn thay đổi hình dạng, nhưng nói chung là những tế bào có nhân, hơi tròn, đường kính 12-14 μm (có thể 8-15 μm). Xem tươi trên kính hiển vi, bạch cầu không có màu sắc. Nhuộm sẽ thấy rõ nhân bất nhiều màu khác nhau.

Đơn vị tính số lượng bạch cầu là nghìn/ mm^3 . Số lượng bạch cầu ở người Việt Nam trưởng thành nam giới 7000/ mm^3 , hoặc 7 nghìn/ mm^3 . giới nữ, thấp hơn một chút, thường là 6,2 nghìn/ mm^3 . Đơn vị quốc tế mới, được tính theo G/l (giga/lít, giga = 10^9). Như vậy, 7 nghìn/ mm^3 chuyển sang đơn vị quốc tế mới là 7 G/l.

Bạch cầu có nhiều loại. Bảng tỷ số % các loại bạch cầu so với tổng số bạch cầu gọi là công thức bạch cầu.

Bạch cầu chia làm hai loại lớn là bạch cầu hạt và bạch cầu không hạt, dựa vào trong bào tương có các hạt bắt màu sau khi nhuộm hay không. Bạch cầu hạt (granulocyte), còn gọi là bạch cầu đa nhân (polynuclear leukocyte hoặc gọi tắt là polynuclear). Thực sự, các bạch cầu này cũng chỉ có một nhân, nhưng nhân chia làm nhiều múi. Bạch cầu đa nhân ở người chiếm trên 2/3 tổng số bạch cầu, và chia ra bạch cầu đa nhân trung tính chiếm 65-70%; ưa acid chiếm 2-6%; ưa kiềm 0,5%.

Bạch cầu không hạt (agranulocyte), còn gọi là bạch cầu đơn nhân (mononuclear leukocyte hoặc gọi tắt là mononuclear) ở người chiếm gần 1/3 tổng số bạch cầu và chia ra bạch cầu lymphô hoặc lymphô bào (lymphocyte) chiếm 20-25%; và bạch cầu đơn nhân to (monocyte) chiếm 5-7%. Thuốc hoặc bệnh tật có thể làm thay đổi số lượng và công thức bạch cầu.

2.3.3. Thông số thuộc chức năng gan (trước, trong và sau ngừng thuốc)

Trong cơ thể, gan là cơ quan đảm nhận nhiều chức năng rất quan trọng. Khi đưa thuốc vào cơ thể, thuốc có thể gây độc với gan, ảnh hưởng đến chức năng gan.

2.3.3.1. Enzym gan ALT và AST

Alaninaminotransferase (ALT) và aspartataminotransferase (AST) là những enzym nguồn gốc tại gan có trong huyết thanh. Sự tăng hoạt độ các enzym này thường gắn liền với độc tính của thuốc do gây tổn thương tế bào gan. Do đó, cần xác định hoạt độ các enzym này để đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan.

2.3.3.2. Bilirubin

Một trong những chức năng quan trọng của gan phải kể đến là chức năng tiết mật. Gan tạo ra mật, bài tiết mật vào tá tràng, tham gia vào quá trình tiêu hóa.

Xét nghiệm bilirubin trong máu để thăm dò chức năng bài tiết và chuyển hóa mật của gan, đặc biệt là bilirubin trực tiếp (bilirubin ester hóa).

2.3.3.3. Cholesterol

Gan còn có chức năng chuyển hóa lipid. Cholesterol là một thành phần của mật, được gan tổng hợp, ester hóa và thải trừ ra ngoài. Vì vậy, định lượng cholesterol có thể đánh giá được một khía cạnh chức năng chuyển hóa lipid của gan. Cũng có thể định lượng cholesterol trong lipoprotein tỷ trọng cao (HDL-C) và cholesterol trong lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL-C).

2.3.3.4. Albumin, globulin, protein toàn phần, protein phi protid

Chuyển hóa protein ở gan là một trong những chức năng quan trọng của gan. Gan có hệ thống các enzym để tổng hợp và thoái hóa protein. Tại gan, các acid amin được tổng hợp thành albumin, globulin, một số yếu tố đông máu. Vì vậy, định lượng albumin, globulin, protein toàn phần, protein phi protid cũng đánh giá được một phần chức năng chuyển hóa protein của gan.

2.3.4. Thông số thuộc chức năng thận

Thận là cơ quan bài tiết của cơ thể. Cầu thận và ống thận rất dễ bị tổn thương bởi các chất nội sinh và ngoại sinh, trong đó có thuốc.

2.3.4.1. Creatinin huyết

Để đánh giá ảnh hưởng của thuốc trên chức năng thận, thường dùng xét nghiệm định lượng creatinin huyết, vì creatinin là thành phần ổn định nhất trong máu, hầu như không phụ thuộc vào chế độ ăn hoặc những thay đổi sinh lý, mà chỉ phụ thuộc vào khả năng đào thải của thận. Khi cầu thận bị tổn thương, nồng độ creatinin huyết tăng sớm hơn urê huyết. Creatinin huyết là chỉ tiêu tin cậy, nên hiện nay thường được dùng để đánh giá và theo dõi chức năng thận.

2.3.4.2. Urê huyết

Urê huyết cũng là một thông số để đánh giá chức năng của thận. Khi thận bị tổn thương, urê huyết tăng. Hiện nay, thường định lượng nitrogen có trong urê huyết (BUN = Blood urea nitrogen).

2.3.5. Các thông số khác

2.3.5.1. Cơ chất

- Glucose

- Lipid toàn phần
- Triglycerid

2.3.5.2. Enzym

- Amylase
- Phosphatase acid
- Phosphatase kiềm
- Aldolase
- Lipase
- Lacticodehydrogenase (LDH)
- Creatininkinase (CK)
- CKMB
- L- γ -glutamyltransferase (γ -GT)
- Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G-6-PD)

2.3.5.3. Điện giải

- Ca
- Na
- K
- Mg
- Fe
- Cl^-
- P
- CO_2

2.3.6. Xét nghiệm đại thể và vi thể

2.3.6.1. Đại thể

- Gan
- Thận
- Thượng thận
- Tim
- Lách

- Phổi
- Dạ dày
- Ruột

2.3.6.2. Vi thể (kính hiển vi)

- Gan
- Thận
- Tim

2.3.6.3. Vi điện tử (kính hiển vi điện tử)

- Gan
- Thận
- Tim

2.3.7. Niệu học (phân tích nước tiểu)

Trước, trong, ngay sau và sau một thời gian dùng thuốc.

2.3.8. Xét nghiệm mắt

2.3.9. Các xét nghiệm khác

- ECG...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế, Quy chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực của thuốc cổ truyền (Ban hành kèm theo quyết định số 371/BYT-QĐ ngày 12-3-1996 của Bộ trưởng Bộ Y tế), Phụ lục 3: Hướng dẫn về khảo sát độc tính của thuốc cổ truyền.
2. WHO, Regional office for the Western Pacific, Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. In "Report of working group on the safety and efficacy of herbal medicines", Manila-Philippines, March, 1993.

CHƯƠNG 25

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH TẠI CHỖ

PGS.TSKH. Đỗ Trung Đàm

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chương này mô tả phương pháp nghiên cứu tác dụng không mong muốn khi dùng thuốc tại chỗ, và thường thử tác dụng kích ứng da và niêm mạc.

Các chất gây kích ứng da trong nhiều trường hợp lại được dùng để điều trị một số bệnh ngoài da. Ví dụ hắc ín than đá được dùng để điều trị bệnh vẩy nến. Dầu cao với một số thành phần tinh dầu (như dầu cao sao vàng, dầu cao con hổ...), hoặc một số loại dầu gió có tác dụng kích ứng, làm tăng tuần hoàn máu, tiêu ứ, nên thường được dùng chữa sưng, nóng, đỏ, đau ngoài da, đung dập chấn thương (kín), đau nhức xương, khớp, cơ, gân.

Tuy nhiên, các chất gây kích ứng da không phải bao giờ cũng có lợi. Nhiều thuốc hoặc mỹ phẩm, khi bôi trên da, gây kích ứng làm hại cho cơ thể. Ngay các thuốc được dùng nhờ tác dụng kích ứng da, nhưng nếu kích ứng quá mức cũng gây hại cho cơ thể, như có thể gây phỏng rộp hoặc thậm chí hoại tử da. Vì vậy, việc nghiên cứu tác dụng kích ứng trên da, tránh những kích ứng vượt quá một ngưỡng kích ứng nào đó là cần thiết.

Có rất nhiều phương pháp nghiên cứu độc tính tại chỗ như:

- Nghiệm pháp Draize (Draize test)
- Nghiệm pháp Buehler (Buehler test)
- Nghiệm pháp chất bổ trợ đầy đủ Freund (Freund's complete adjuvant test).
- Nghiệm pháp gạc tẩm thuốc (Adjuvant and patch test)
- Nghiệm pháp tối đa hóa (Maximization test)

- Nghiệm pháp tối ưu hóa (Optimization test)
- Nghiệm pháp da hở (Open epicutaneous test)
- Nghiệm pháp chất bổ trợ phân rã (Split adjuvant test)

Các phương pháp nêu trên có mức độ đáp ứng khác nhau với các chất gây kích ứng. Nghiệm pháp chất bổ trợ đầy đủ Freund là phương pháp có thể phát hiện được các chất gây kích ứng dù ở mức độ yếu.

Hiện nay, đã có nhiều cơ quan ở nhiều nước quy định cách thử tác dụng kích ứng trên da (bảng 1), nhưng hầu hết đều dựa vào nguyên lý của nghiệm pháp Draize. Vì vậy, sau đây trình bày nghiệm pháp Draize, đã được nhiều tác giả khác chỉnh lý, bổ sung và cải tiến.

Bảng 1. Tên cơ quan ở một số nước và tên phương pháp thử

Tên cơ quan	Tên phương pháp thử	Năm
Draize J.H. (Tác giả đề xuất đầu tiên)	Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied to skin and mucous membranes	1944
US Food and Drug administration (FDA)	Hazardous substances, proposed revision of test for primary skin irritants	1972
Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)	OECD Guidelines for testing of chemicals, Section 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion	1981
International Standard Organisation (ISO)	Biological evaluation of medical devices, Part 10: Test for Irritation and Sensitization	1995

II. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KÍCH ỨNG DA

2.1. Đặt vấn đề

Các phương pháp nghiên cứu tác dụng kích ứng da thường dựa vào nghiệm pháp Draize (1944), có sự cải tiến bổ sung của Luduena & Hoppe (1952) và Finkelstein (1963).

2.2. Nguyên vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Thuốc nghiên cứu

2.2.1.1. Thuốc thuộc dạng lỏng

Có thể thử nguyên dạng hoặc hòa loãng với dung môi thích hợp để được dạng có nồng độ thuốc thấp hơn (1/2; 1/4; 1/10; 1/20; 1/40; 1/100...). Lấy gạc, thấm vào dung dịch và đắp lên da.

2.2.1.2. Thuốc dạng mềm (cao mềm, dầu cao...)

Có thể thử nguyên dạng, hoặc nghiền với dung môi thích hợp để được cao có nồng độ thấp hơn (1/2; 1/4; 1/10; 1/20; 1/40; 1/100 ...). Lấy cao phết lên giấy bản hoặc giấy polyetylen, rồi đắp lên da. Nếu thuốc dạng mềm có thể hòa tan được thành dung dịch với các dung môi trợ thích hợp, thì hòa theo các tỷ lệ % khác nhau, rồi tiến hành như thuốc thuộc dạng lỏng.

2.2.1.3. Thuốc dạng bột rắn hoặc thể rắn

– Có thể nghiền nguyên dạng thành bột mịn rồi xoa bột lên da; hoặc nghiền bột nguyên dạng trộn với bột trợ thành bột có tỷ lệ bột nguyên dạng thấp hơn (1/2; 1/4; 1/10; 1/20; 1/40; 1/100), rồi xoa bột lên da.

– Có thể dùng bột đã nghiền mịn (nguyên dạng hoặc đã trộn thêm bột trợ) hòa với một ít nước thành bột nhão, rồi bôi lên da.

– Nếu loại bột rắn hoặc thể rắn có thể hòa tan được thành dung dịch với các dung môi trợ thích hợp, thì hòa tan các tỷ lệ % khác nhau, rồi tiến hành như thuốc thuộc dạng lỏng.

2.2.2. Động vật nghiên cứu

– Thỏ là loài động vật được sử dụng nhiều nhất, sau đó đến chuột cống trắng, chuột lang. Ngoài ra, còn dùng mèo, người, lợn. Kinh nghiệm cho thấy mức độ nhạy cảm trên da giảm dần theo thứ tự sau: thỏ, chuột lang, mèo, chuột cống trắng, người, lợn.

– Thỏ là loài được dùng nhiều nhất vì:

- Có độ nhạy cảm tốt.
- Da thỏ trắng nên dễ nhận định và đánh giá.
- Thỏ rất hiền, nên có thể thử mà không cần gây mê.
- Dễ mua, giá cả thường rẻ.
- Một con có thể thử được 8 vùng.

2.2.3. Dung môi pha loãng thuốc

Thường dùng các dung môi sau:

- Nước cất: Nên ưu tiên dùng dung môi này
- Nước muối sinh lý
- Dầu thực vật, như dầu bông, dầu ôliu, dầu dừa, dầu vừng
- Ethanol/nước với các tỷ lệ thích hợp
- PEG 400
- Aceton
- Cloroform
- Bột talc (trường hợp nghiền bột)
- Tinh bột (trường hợp nghiền bột)

2.2.4. Thuốc, hóa chất

- Thuốc mê (khi thử trên mèo...)
- Formaldehyd 20%
- Thuốc chuẩn để đối chiếu
- Xanh trypan
- Hóa chất làm rụng lông (nếu có)

2.2.5. Dụng cụ, máy

- Bàn mổ để cố định động vật
- Bơm tiêm, kim tiêm các loại
- Dao cạo hoặc dụng cụ để cạo lông động vật
- Bút chì để khoanh các vùng thử
- Bông
- Kẹp
- Gạc miếng 2 x 2 cm hoặc 2,5 x 2,5 cm
- Cối, chày sứ
- Ống đong
- Cốc thủy tinh để pha thuốc
- Kéo

III. THỬ TÁC DỤNG KÍCH ỨNG DA CỦA THUỐC NGHIÊN CỨU SO VỚI MỘT THUỐC THAM CHIẾU

3.1. Thuốc

Trong trường hợp này, tùy theo thuốc nghiên cứu ở dạng nào (dạng lỏng, dạng mềm, dạng bột...), thường chọn thuốc tham chiếu có dạng tương tự như dạng thuốc nghiên cứu, ví dụ, để đánh giá tác dụng kích ứng da của kem chống nắng "TH" so với thuốc tham chiếu là thuốc dưỡng da "NV" chẳng hạn. Tất nhiên, trong trường hợp này, kem dưỡng da "NV" là một loại có tác dụng kích ứng da ở mức độ đã được chấp nhận.

3.2. Chuẩn bị động vật thí nghiệm

Động vật dùng 3 con cho mỗi thí nghiệm để có thể thử 6-12 vị trí cho mỗi thuốc nghiên cứu và thuốc tham chiếu. Dùng loại động vật đã trưởng thành, như thỏ dùng loại có cân nặng 2-3 kg, chuột lang 400-500 kg, chuột cống trắng 160-200 g, khỏe mạnh, không phân biệt đực cái, không trong thời kỳ có thai hoặc nuôi con bú.

Để động vật nhịn đói qua đêm (không cho ăn 16-18 giờ trước khi thí nghiệm). Gây mê động vật, hoặc nếu là loại động vật hiền lành như thỏ, chuột lang,... thì có thể không cần gây mê.

Buộc động vật lên bàn mổ tư thế nằm ngửa. Nói chung, da bụng nhạy cảm hơn, do đó, thường thử trên da bụng và phải buộc thỏ theo tư thế nằm ngửa. Cần chú ý khi cạo lông bụng động vật thí nghiệm để tránh tạo ra các vết trầy xước trên da. Một số tác giả thử trên da ở lưng, như thế phải buộc động vật theo tư thế nằm sấp. Nói chung, cạo da lưng dễ dàng hơn, ít tạo ra các vết trầy xước, nhưng da lưng kém nhạy cảm hơn. Khi cạo lông phải cố gắng để ít gây tổn thương cho da con vật. Trước khi cạo, cần lấy kéo cắt ngắn lông sát mặt da. Sau đó, dùng dao cạo, cạo sạch lông bụng (hoặc lưng, tùy theo người thí nghiệm). Cũng có thể dùng thuốc làm rụng lông.

3.3. Tiến hành thí nghiệm

Dùng bút chì khoanh thành nét mờ các vùng sẽ thí nghiệm có đường kính 2 cm hoặc 2,5 cm. Với thỏ, có thể khoanh 8 vùng, chuột lang 6 vùng và chuột cống trắng 4 vùng. Lấy bông, thấm nước ấm lau sạch các vùng thí nghiệm, rồi lấy bông lau khô.

Nhỏ vào giữa mỗi vùng 0,1 ml dung dịch formaldehyd 20%, rồi lấy đầu ống nhỏ giọt dàn đều dung dịch formaldehyd khắp mỗi diện tích thí nghiệm. Để cho dung dịch formaldehyd khô. Sau đó, lại nhỏ dung dịch formaldehyd vào vùng thí nghiệm và tiến hành như lần trước. Tiến hành 3 lần như vậy. Sau khi khô lần nhỏ

formaldehyd cuối cùng, lấy thuốc nghiên cứu hoặc thuốc tham chiếu, phết lên miếng gạc hình tròn có đường kính 2 cm hoặc 2,5 cm, mỗi miếng 0,2 g thuốc kem (nếu miếng gạc có đường kính 2,5 cm, thì cần 0,3 g), rồi đắp lên các vùng đã đánh dấu bằng bút chì. Cần đắp miếng thuốc nghiên cứu và thuốc tham chiếu xen kẽ nhau giữa các vùng trên một con vật. Phía trên mỗi miếng gạc thuốc, đặt một miếng polyethylen mềm, rồi lấy băng dính dán để cố định miếng gạc thuốc trên mặt da. Cố gắng dán ép băng dính các miếng thuốc vào da với mức độ chặt như nhau. Cuối cùng, tiêm dung dịch xanh trypan 0,5% vào dưới da nách chân trước của con vật với liều 1 ml/kg đối với thỏ, hoặc 2 ml/kg đối với chuột lang hoặc chuột cống trắng.

3.4. Quan sát kết quả

Sau 4 giờ tính từ khi đặt thuốc (có tác giả dùng thời gian dài hơn), gỡ miếng thuốc dán ra khỏi da con vật. Làm sạch thuốc còn bám trên da bằng bông tẩm nước ấm, rồi lau nhẹ cho khô bằng bông sạch. Quan sát mức độ xanh ở vết da dán thuốc ngay sau đó, theo dõi sau 2 giờ và 6 giờ. Có tác giả yêu cầu quan sát sau một thời gian lâu hơn. Nếu thí nghiệm trên lưng con vật (nhất là con vật không gây mê), thì có thể theo dõi đến sau 24 giờ, 48 giờ hoặc lâu hơn.

Cho điểm kích ứng và đánh giá mức độ kích ứng tùy theo mức độ xanh ở vết da dán thuốc theo bảng 2.

Bảng 2. Cách cho điểm và đánh giá mức độ kích ứng khi đắp thuốc trên da

Cường độ màu ở vùng da dán thuốc	Điểm kích ứng	Mức độ kích ứng
Không có màu	0	Không
Màu xanh mờ nhạt	2	Nhẹ
Màu xanh thấy rõ	4	Vừa
Màu xanh đậm	6	Mạnh
Có đốm rất đậm và quầng xanh đậm	8	Rất mạnh

3.5 Đánh giá kết quả

Tính điểm kích ứng trung bình của các vết do thuốc nghiên cứu và do thuốc tham chiếu ở từng thời điểm quan sát. Nếu điểm kích ứng của thuốc nghiên cứu thấp hơn thuốc tham chiếu thì thuốc nghiên cứu đạt yêu cầu về mức độ kích ứng cho phép.

Trường hợp có nghi ngờ thì phải tiến hành lần thứ 2 với 3 con vật khác.

IV. THỬ TÁC DỤNG KÍCH ỨNG DA CỦA THUỐC NGHIÊN CỨU SO VỚI MỘT THUỐC KÍCH ỨNG CHUẨN

4.1. Thuốc

Trong trường hợp này cũng tùy theo thuốc nghiên cứu ở dạng nào mà chọn loại thuốc kích ứng chuẩn cho thích hợp, và thông thường trong chuyên luận thử có ghi rõ. Ví dụ, để đánh giá tác dụng kích ứng da của dung dịch thuốc nhỏ mũi "NS", theo quy định là phải có tác dụng kích ứng thấp hơn nồng độ kích ứng ngưỡng (TIC: threshold irritant concentration) của một dung dịch kích ứng chuẩn nào đó. Nồng độ kích ứng ngưỡng TIC là nồng độ (theo %) lớn nhất của thuốc gây ra mức độ kích ứng nhẹ, tương đương với điểm 2. Sau đây là nồng độ kích ứng ngưỡng của một số chất gây kích ứng da (bảng 3).

Bảng 3. Nồng độ kích ứng ngưỡng của một số chất chuẩn gây kích ứng

Chất chuẩn gây kích ứng	Nồng độ kích ứng ngưỡng (%)
Dibucain hydroclorid	0,2
Quinin hydroclorid	0,25
Dynium clorid (N-dodecyl-N, N'-dimethyl-3,4-diclorobenzyl ammonium clorid)	0,04

Ví dụ, quy định thuốc nhỏ mũi "NS" phải có tác dụng kích ứng thấp hơn nồng độ kích ứng ngưỡng của quinin hydroclorid chẳng hạn, thì ta phải đánh giá tác dụng gây kích ứng của thuốc nhỏ mũi này so với dung dịch quinin hydroclorid 0,25%.

4.2. Chuẩn bị động vật

Như mục 3.2.

4.3. Tiến hành thí nghiệm

Trong trường hợp này, cũng có thể dùng phương pháp tẩm thuốc vào gạc rồi đắp lên da như mục III. Nhưng ở đây xin giới thiệu phương pháp tiêm thuốc trong da, vì thuốc nghiên cứu là dung dịch.

Bước đầu tiên của việc tiến hành thí nghiệm như đoạn đầu của mục 3.3. Sau khi dung dịch formaldehyd của lần nhỏ cuối đã khô, ta tiến hành thử thuốc. Tiêm vào trong da 0,3 ml dung dịch thuốc nhỏ mũi hoặc dung dịch quinin hydroclorid 0,25% vào chính giữa các vùng đã đánh dấu. Cần tiêm thuốc nghiên cứu và thuốc kích ứng chuẩn vào các vị trí xen kẽ nhau giữa các vùng trên một con vật.

Sau khi tiêm thuốc được 10 phút, tiêm vào tĩnh mạch dung dịch xanh trypan 0,5% trong nước muối sinh lý với liều 1 ml/kg. Cũng có thể tiêm vào dưới da nách chân trước dung dịch xanh trypan 0,5% với liều 1 ml/kg nếu là thỏ hoặc 2 ml/kg nếu là chuột lang hoặc chuột cống trắng.

4.4. Quan sát kết quả

Quan sát mức độ xanh ở các vùng tiêm vào các thời điểm 30 phút, 60 phút và 180 phút sau khi tiêm xanh trypan. Có thể quan sát thêm vào các thời điểm lâu hơn sau khi tiêm xanh trypan.

Cho điểm mỗi vị trí tiêm như mục 3.4. Nhưng ở đây, điểm kích ứng 8 tương đương với mức độ kích ứng rất nặng, khi chỗ tiêm có hiện tượng tổn thương thiếu máu và có quầng xanh rất đậm ở xung quanh vị trí tổn thương (bảng 4).

Bảng 4. Cách cho điểm và đánh giá mức độ kích ứng khi tiêm thuốc trong da

Cường độ màu ở vùng da dán thuốc	Điểm kích ứng	Mức độ kích ứng
Không có màu	0	Không
Màu xanh mờ nhạt	2	Nhẹ
Màu xanh thấy rõ	4	Vừa
Màu xanh đậm	6	Mạnh
Có tâm tổn thương thiếu máu và quầng xanh rất đậm	8	Rất mạnh

4.5. Đánh giá kết quả

- + Tính điểm kích ứng trung bình của dung dịch thuốc kích ứng chuẩn quinin hydroclorid 0,25%. Nếu phương pháp tiến hành đúng, thì ở vùng tiêm sẽ xuất hiện màu xanh mờ nhạt, tương ứng với điểm 2 và mức độ kích ứng là nhẹ. Điểm kích ứng trung bình xấp xỉ 2. Nếu kết quả không như vậy, phải làm lại thí nghiệm.

- + Tính điểm kích ứng trung bình của dung dịch thuốc nhỏ mũi. Nếu điểm kích ứng trung bình không lớn hơn điểm kích ứng trung bình của dung dịch thuốc kích ứng chuẩn, thì thuốc nghiên cứu đạt yêu cầu về mức độ kích ứng cho phép.
- + Nếu thí nghiệm còn nghi ngờ, phải tiến hành lại thí nghiệm. Có thể phải thay đổi nồng độ dung dịch quinin cho phù hợp.

V. XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ KÍCH ỨNG DA CỦA THUỐC NGUYÊN DẠNG

5.1. Thuốc

Thuốc nghiên cứu có thể ở các dạng khác nhau (dạng lỏng, dạng mềm, dạng bột hoặc thể rắn). Vấn đề đặt ra ở đây là muốn thử nguyên dạng của thuốc. Nếu thuốc thuộc dạng lỏng hoặc dạng mềm thì để nguyên. Nếu thuốc là dạng bột hoặc thể rắn thì nghiền thành bột mịn.

5.2. Chuẩn bị động vật thí nghiệm

Tiến hành như mục 3.2.

5.3. Tiến hành thí nghiệm

Những bước đầu tiên, tiến hành như đoạn đầu mục 3.3. Sau khi dung dịch formaldehyd của lần nhỏ cuối cùng đã khô, ta tiến hành thử thuốc. Nếu thuốc thuộc dạng mềm, dùng phương pháp phết thuốc lên gạc, rồi đắp lên da như mục III. Nếu thuốc dạng lỏng, thì có thể tẩm gạc, rồi đắp lên như mục III, hoặc tiêm trong da như mục IV. Nếu thuốc ở dạng bột mịn (thuốc thuộc dạng bột hoặc thể rắn đã được nghiền thành bột mịn), có thể xoa bột trực tiếp lên diện tích da nghiên cứu. Nhưng thông thường, người ta trộn bột mịn với một ít nước thành bột nhão sền sệt, rồi bôi trực tiếp lên vùng thực nghiệm, mỗi vùng tương đương 0,2 g bột mịn khô. Song song tiến hành với một chất chuẩn gây kích ứng dùng nồng độ kích ứng chuẩn (bảng 3). Thuốc nghiên cứu và thuốc chuẩn được thử trên các vùng xen kẽ nhau trên cùng một con vật. Sau khi bôi thuốc lên các vùng da thí nghiệm được 10 phút, tiêm dung dịch xanh trypan vào tĩnh mạch hoặc tiêm vào dưới da nách chân trước của con vật như mục 4.3.

5.4. Quan sát kết quả

Sau 4 giờ (có tác giả để thời gian lâu hơn) tính từ khi đặt thuốc, bóc nhẹ lớp thuốc ra, lấy bông thấm nước ấm lau sạch thuốc, sau đó, lấy bông lau nhẹ cho khô,

rồi quan sát mức độ xanh ngay sau đó, rồi sau 2 giờ và 6 giờ. Cho điểm kích ứng và đánh giá mức độ kích ứng dựa vào bảng 2.

5.5. Đánh giá kết quả

- + Tính điểm kích ứng trung bình của các vết thí nghiệm với chất kích ứng chuẩn ở nồng độ kích ứng ngưỡng. Nếu điểm kích ứng trung bình này xấp xỉ 2, tương ứng với điểm kích ứng là nhẹ, thì phương pháp thí nghiệm đạt yêu cầu.
- + Tính điểm kích ứng trung bình của bột thuốc nghiên cứu, từ đó, rút ra kết luận về thuốc nghiên cứu dùng nguyên dạng có mức độ kích ứng nào theo bảng 5

Bảng 5. Mức độ kích ứng tùy theo điểm kích ứng trung bình

Điểm kích ứng trung bình	Mức độ kích ứng
0-1,0	Không đáng kể
1,1-3,0	Nhẹ
3,1-5,0	Vừa
5,1-7,0	Mạnh
> 7,0	Rất mạnh

Nếu mức độ kích ứng từ vừa trở lên (điểm kích ứng từ 3,1 trở lên), thì cần xác định nồng độ kích ứng ngưỡng của thuốc nghiên cứu như mục VI sau đây.

VI. XÁC ĐỊNH NỒNG ĐỘ KÍCH ỨNG NGƯỠNG

6.1. Thuốc

Chỉ những thuốc khi nghiên cứu nguyên dạng có mức độ kích ứng từ vừa trở lên (điểm kích ứng trung bình 3,1 trở lên) mới tiến hành xác định nồng độ kích ứng ngưỡng TIC. Trước hết, phải hòa loãng thuốc nguyên dạng theo cách sau:

+ *Đối với dạng lỏng*: Dung môi hòa loãng tốt nhất là nước cất. Trường hợp thuốc không tan trong nước cất, thì phải dùng dung môi trơ khác thuộc dạng lỏng để hòa loãng, và ưu tiên là dùng loại dung môi đã dùng để chế tạo thuốc. Hòa loãng thuốc với dung môi theo tỷ lệ thuốc/dung dịch (thể tích/thể tích) là 1/2 (50%); 1/4 (25%); 1/8 (12,5%); 1/16 (6,25%); 1/32 (3,125%)...

+ *Đối với thuốc dạng mềm*: Hòa thuốc với nước cất thành dung dịch. Nếu thuốc không tan trong nước cất, thì dùng một dung môi trơ khác thuộc dạng lỏng để hòa loãng thành dung dịch, ưu tiên dùng loại dung môi lỏng đã dùng để chế tạo thuốc, theo các tỷ lệ thuốc/dung dịch (khối lượng/thể tích) là 1/2 (50%); 1/4 (25%); 1/8 (12,5%); 1/16 (6,25%); 1/32 (3,125%)... Nếu không có dung môi lỏng nào hòa tan thuốc thành dung dịch được, thì dùng tá dược chế tạo thuốc (vaselin, lanolin...) để cũng tạo thành dạng thuốc mềm với tỷ lệ thuốc nguyên dạng/hỗn hợp với tá dược (khối lượng/khối lượng) là 1/2 (50%); 1/4 (25%); 1/8 (12,5%); 1/16 (6,25%); 1/32 (3,125%)...

+ *Đối với thuốc dạng bột hoặc thể rắn (đã nghiền thành dạng bột mịn)*: Cách tốt nhất là hòa thuốc với nước cất thành dung dịch. Nếu thuốc không tan trong nước cất, thì có thể dùng một dung môi trơ khác thuộc dạng lỏng để hòa tan thành dung dịch theo tỷ lệ thuốc/dung dịch (khối lượng/thể tích) là 1/2 (50%); 1/4 (25%); 1/8 (12,5%); 1/16 (6,25%); 1/32 (3,125%)... Cũng có thể nghiền thành bột mịn, rồi thêm bột trơ khác (như bột cao lanh, bột talc...) để tạo thành một hỗn hợp bột theo tỷ lệ thuốc/hỗn hợp (khối lượng/khối lượng) là 1/2 (50%); 1/4 (25%); 1/8 (12,5%); 1/16 (6,25%); 1/32 (3,125%)...

6.2. Chuẩn bị động vật thí nghiệm

Như mục 3.2.

6.3. Tiến hành thí nghiệm

Những bước đầu, tiến hành như đoạn đầu, mục 3.3. Sau khi nhỏ lần thứ ba dung dịch formaldehyd, đợi cho vùng thí nghiệm đã khô thì tiến hành như sau:

- + Với mỗi nồng độ, phải tiến hành ít nhất là 6 vùng thử nghiệm. Các nồng độ khác nhau phải bố trí ở các vị trí xen kẽ nhau trên một con vật.
- + Trường hợp thuốc sau khi pha loãng có dạng mềm, thì tiến hành như mục III.
- + Trường hợp thuốc sau khi pha loãng thành dạng dung dịch, thì có thể tiến hành như mục III hoặc mục IV.
- + Trường hợp thuốc sau khi pha loãng thuộc dạng bột, thì tiến hành theo mục V.

6.4. Quan sát kết quả

Quan sát mức độ xanh ở các vùng thí nghiệm. Cho điểm và đánh giá mức độ kích ứng của từng vùng thuốc mỗi nồng độ, theo bảng 2 hoặc bảng 4.

6.5. Đánh giá kết quả

- + Tính điểm kích ứng trung bình của mỗi nồng độ thử nghiệm. Lập bảng, ghi rõ điểm kích ứng trung bình tương ứng với các nồng độ đã thử.
- + Rút ra nồng độ nào có điểm kích ứng trung bình trong khoảng 1,1–3,0 chính là nồng độ kích ứng ngưỡng TIC của thuốc nghiên cứu.
- + Có thể xác định nồng độ kích ứng ngưỡng chính xác hơn bằng cách dựa vào bảng ghi điểm kích ứng trung bình tương ứng với các nồng độ đã thử. Vẽ đồ thị, trục tung là điểm kích ứng trung bình và trục hoành là logarit của nồng độ. Đường biểu diễn của đồ thị trên hệ trục tọa độ bán logarit như vậy sẽ có dạng là một đường thẳng. Qua các điểm biểu diễn, vẽ một đường thẳng, làm thế nào để các điểm biểu diễn nằm ở 2 bên và cách đều đường thẳng này. Sau đó, trên đồ thị này, ta xác định logarit của nồng độ ứng với điểm kích ứng trung bình là 2. Từ trị số của logarit nồng độ này, tra bảng đối logarit, ta sẽ xác định được nồng độ của thuốc nghiên cứu ứng với điểm kích ứng là 2. Đó chính là nồng độ kích ứng ngưỡng.

Lấy một ví dụ:

Để xác định nồng độ kích ứng ngưỡng của một loại cao mềm, sau khi xác định mức độ kích ứng da của thuốc nguyên dạng, thấy điểm kích ứng trung bình là 4,3 tương ứng với độ kích ứng là vừa, nên đã tiến hành xác định nồng độ kích ứng ngưỡng của thuốc cao mềm này.

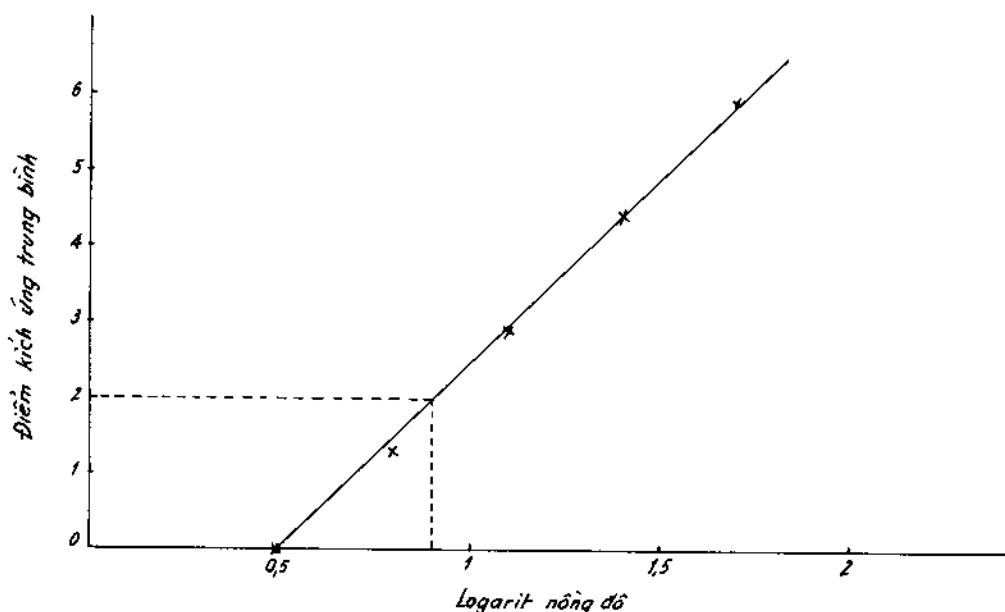
Đã thử với 5 nồng độ 1/2 (50%); 1/4 (25%); 1/8 (12,5%); 1/16 (6,25%) và 1/32 (3,125%). Điểm kích ứng trung bình tương ứng với các nồng độ đã thử được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Điểm kích ứng trung bình của cao mềm nghiên cứu tương ứng với các nồng độ đã thử

Tỷ lệ hòa loãng	Nồng độ thử (%)	Logarit nồng độ	Điểm kích ứng trung bình
1/2	50	1,699	5,9
1/4	25	1,398	4,4
1/8	12,5	1,097	2,9
1/16	6,25	0,796	1,3
1/32	3,125	0,495	0

Nếu theo cách thông thường, từ bảng trên rút ra, ta có thể kết luận là nồng độ kích ứng ngưỡng của cao mềm nghiên cứu là 6,25 và 12,5% (vì nồng độ này tương ứng với điểm kích ứng trung bình là 1,3 và 2,9 nằm trong giới hạn quy định điểm kích ứng trung bình là 1,1-3,0). Ta tính được nồng độ kích ứng ngưỡng trung bình là 9,4%.

Nếu tiến hành vẽ đồ thị, ta sẽ thu được đồ thị sau:



Tương quan giữa điểm kích ứng trung bình và logarit nồng độ

Điểm kích ứng trung bình là 2 tương ứng với logarit nồng độ là 0,9. Tra bảng đối logarit ta sẽ được nồng độ là 7,9%.

Như vậy, nếu tính theo phương pháp thông thường, nồng độ kích ứng ngưỡng là 9,4%. Nhưng bằng phương pháp vẽ đồ thị, ta xác định được chính xác hơn nồng độ kích ứng ngưỡng chỉ là 7,9%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. Draize J.H (1944), J.Pharmacol. Exptl. Therap., 82, 377-382.
2. Luduena F.H., Hope J.O (1952), J.Pharmacol. Exptl. Therap., 104, 40-46.
3. Finkelstein P. (1963), J. Invest. Dermatol., 40, 11-15.

CHƯƠNG 26

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH GÂY BIẾN CHỨNG
VÀ SINH UNG THƯ

PGS. TSKH. Đỗ Trung Đàm

I. ĐỘC TÍNH GÂY BIẾN CHỨNG (MUTAGENICITY TEST)

1.1. Phương pháp ames dùng vi khuẩn không tổng hợp được histidin
(ames test)

1.1.1. Nguyên tắc

- Dùng loại vi khuẩn không có khả năng tổng hợp histidin (His-) như *Salmonella typhimurium* TA-1535, TA-1537, TA-98 hoặc TA-100; *Escherichia coli* WP-2 uvr A.
- Như vậy, nuôi vi khuẩn trên trong môi trường nuôi cấy không có histidin, thì vi khuẩn không phát triển được.
- Nay nuôi vi khuẩn trên trong một môi trường không có histidin cộng thêm chất thử nghiên cứu tác dụng gây biến chủng. Nếu vi khuẩn phát triển được, tức là chất thử đã gây biến chủng vi khuẩn, làm cho vi khuẩn từ dạng không tổng hợp được histidin sang dạng tổng hợp được histidin (His+).

1.1.2. Phương pháp thực nghiệm

1.1.2.1. Điều kiện thực nghiệm

- Một trong các chủng vi khuẩn trên.
- Môi trường nuôi vi khuẩn thử nghiệm, nhưng không có histidin.
- Các phương tiện nuôi cấy vi khuẩn.

1.1.2.2. Tiến hành thực nghiệm

- Lô chứng: Vi khuẩn trong môi trường nuôi không có histidin.
- Lô thuốc: Vi khuẩn trong môi trường nuôi không có histidin, có thêm thuốc với 5 nồng độ thuốc khác nhau.
- Ủ ở 37°C trong 24 - 48 giờ.
- Lấy ra, đếm số khuẩn lạc.

1.1.2.3. Đánh giá kết quả

- Lô chứng: Không có khuẩn lạc mọc.
- Lô thuốc: Đánh giá dựa vào lô có nồng độ thuốc thấp nhất có vi khuẩn mọc. Nếu số khuẩn lạc càng nhiều, thì thuốc có khả năng gây biến chủng càng mạnh.

1.2. Nghiệm pháp dùng tế bào u lymphô L-5178Y ở chuột nhắt (mouse lymphoma cells test)**1.2.1. Nguyên tắc**

- Các tế bào u lymphô này có vị trí (locus) có enzym thymidinkinase (TK+) sử dụng được thymidin để tổng hợp ra ADN.
- Trong môi trường nuôi tế bào này, cho thêm trifluorothymidin (TFT). Do có thymidinkinase TK+, nên tế bào sử dụng được thymidin để tổng hợp ra ADN. Nhưng do trong môi trường có cả TFT, nên tế bào sẽ sử dụng cả TFT để tổng hợp ADN. ADN có TFT sẽ bị nhiễm độc và chết vì độc tính do F gây ra.
- Nếu có đột biến ở locus đó, tế bào sẽ không còn thymidinkinase (TK-) nữa, không sử dụng được thymidin và do đó, cũng không sử dụng TFT, nên tế bào không bị nhiễm độc, kết quả là tế bào vẫn tăng trưởng.

1.2.2. Phương pháp thực nghiệm**1.2.2.1. Điều kiện thực nghiệm**

- Dòng tế bào u lymphô L-5178Y (viết tắt là tế bào u) chuột nhắt trắng (thể giới đã tạo ra được).
- Môi trường nuôi tế bào u.
- Các phương tiện nuôi cấy tế bào.
- Phương pháp nhuộm và quan sát tế bào qua kính hiển vi.

1.2.2.2. Tiến hành thí nghiệm

- Lô chứng trắng: Tế bào u nuôi trong môi trường nuôi.
- Lô chứng có TFT: Tế bào u trong môi trường nuôi, có thêm TFT.
- Lô thuốc: Tế bào u trong môi trường nuôi có thêm TFT và thuốc với 5 nồng độ khác nhau.
- Ủ ở 37°C trong 24 - 48 giờ.
- Thêm vào môi trường một giọt xanh trypan 0,1%.
- Quan sát trên kính hiển vi. Đếm số tế bào sống và tế bào chết. Những tế bào bị nhuộm xanh là tế bào chết, những tế bào không bị nhuộm xanh là tế bào sống.
- Xác định tỷ lệ % số tế bào sống so với tổng số tế bào quan sát ở mỗi lô.

1.2.2.3. Đánh giá kết quả

- Lô chứng trắng: Tỷ lệ % tế bào sống rất cao.
- Lô chứng với TFT: Tỷ lệ % tế bào sống rất thấp (vì tế bào bị chết nhiều).
- Đánh giá dựa vào lô thuốc có nồng độ thấp nhất cho tỷ lệ % sống cao hơn có ý nghĩa so với lô chứng có TFT. Nếu tỷ lệ % sống càng cao thì thuốc có khả năng gây biến chủng càng mạnh.

**1.3. Nghiệm pháp biến chủng thể nhiễm sắc bạch cầu người
(chromosome test of human leucocytes)****1.3.1. Nguyên tắc**

- Bạch cầu ở máu ngoại vi người là những tế bào không phân chia. Dưới tác dụng của phytohemagglutinin (một chất được chiết xuất từ hạt cây đậu tây *Phaseolus vulgaris* L.), bạch cầu lymphô và một số bạch cầu mono chuyển dạng và phân chia mạnh. Trong môi trường bạch cầu chuyển dạng và phân chia mạnh, nếu có chất gây biến chủng, sẽ tạo nên các bất thường của thể nhiễm sắc như hình gãy (break), thể nhiễm sắc 3 nhánh, 4 nhánh hoặc phức tạp (triradical, tetradiradical hoặc complex rearrangement).

1.3.2. Phương pháp thực nghiệm**1.3.2.1. Điều kiện thực nghiệm**

- Bạch cầu người.

- Môi trường nuôi bạch cầu người.
- Các phương tiện nuôi cấy tế bào.
- Phương pháp nhuộm và quan sát tế bào qua kính hiển vi.
- Dung dịch phytohemagglutinin.

1.3.2.2. Tiến hành thực nghiệm

- Lô chứng: Bạch cầu người trong môi trường nuôi có thêm phytohemagglutinin.
- Lô thuốc: Bạch cầu người trong môi trường nuôi có phytohemagglutinin như trên, có thêm thuốc nghiên cứu với 5 nồng độ khác nhau.
- Ủ ở 37°C trong 24 - 48 giờ.
- Nhuộm và quan sát qua kính hiển vi để xem các bất thường của thể nhiễm sắc.

1.3.2.3. Đánh giá kết quả

- Lô chứng: Thể nhiễm sắc của bạch cầu bình thường.
- Lô thuốc: Quan sát lô có nồng độ thấp nhất gây ra biến chứng, được biểu hiện bằng sự bất thường của thể nhiễm sắc. Thể nhiễm sắc bất thường càng nặng thì khả năng gây biến chứng của thuốc nghiên cứu càng mạnh.

1.4. Nghiệm pháp vi nhân hồng cầu non loài gặm nhấm (Micronucleus test with rodent)

1.4.1. Nguyên tắc

- Thuốc gây biến chứng có thể tạo thành các vi nhân trong hồng cầu non đa sắc (polychromatic erythrocytes) ở tủy xương của chuột cống trắng hoặc chuột nhắt trắng.
- Bình thường, trong quá trình phát triển, trước khi trở thành hồng cầu, nhân được đẩy ra khỏi tế bào, nên hồng cầu là loại tế bào không nhân. Nếu trong hồng cầu có vi nhân (nhân nhỏ) là dấu vết của phần nhỏ một nhiễm sắc thể bị gãy (bị giữ lại trong tế bào) do thuốc gây biến chứng tạo ra.

1.4.2. Phương pháp thực nghiệm

1.4.2.1. Điều kiện thực nghiệm

- Chuột cống trắng hoặc chuột nhắt trắng, đực hoặc cái.

- Phương tiện để dùng thuốc cho chuột.
- Phương tiện nhuộm màu và quan sát qua kính hiển vi.

1.4.2.2. Phương pháp thực nghiệm

- Thường dùng chuột nhắt trắng đực (vì nhạy hơn).
- Lô thuốc: Dùng thuốc (uống hoặc tiêm) với 5 liều lớn nhỏ khác nhau.
- Lô chứng: Dùng nước cất (nếu uống) hoặc nước muối sinh lý (nếu tiêm) với cùng thể tích như lô thuốc.
- 24 giờ sau, giết chuột, lấy tủy xương, tráng lên phiến kính, rồi nhuộm màu.
- Quan sát dưới kính hiển vi, đếm số hồng cầu non có vi nhân.

1.4.2.3. Đánh giá kết quả

- Lô chứng: Không thấy có vi nhân.
- Lô thuốc: Đánh giá dựa vào lô dùng thuốc liều thấp nhất mà hồng cầu non có vi nhân. Nếu càng có nhiều hồng cầu non có vi nhân, thì khả năng thuốc gây biến chứng càng mạnh.

1.5. Nghiệm pháp nhiễm sắc thể ở tế bào tủy xương và tinh hoàn

1.5.1. Nguyên tắc

Thuốc gây biến chứng ít có khả năng gây ra những thay đổi nhiễm sắc thể của những tế bào bình thường. Nhưng có thể tạo ra những rối loạn nhiễm sắc thể của tế bào mô tủy xương hoặc tế bào mô tinh hoàn là những mô thường phát triển mạnh và có nhiều tế bào đang phân chia. Làm cho tế bào đang phân chia dừng lại ở kỳ giữa (metaphase), vì nhiễm sắc thể ở kỳ này có dạng điển hình nhất. Chất làm dừng sự phân chia tế bào ở kỳ giữa là colchicin, một hoạt chất của hạt cây Thu thủy tiên, còn gọi là cây tỏi độc *Colchicum autumnale* L., hoặc một số chất tổng hợp như colcemid. Đặc tính của những hóa chất này là phá hủy thoi bất nhiễm, do đó, nhiễm sắc thể mất chỗ dựa và không thể di chuyển về 2 cực tế bào được. Các đôi nhiễm sắc tử vẫn dính với nhau ở phần tâm. Những hóa chất này còn làm cho nhiễm sắc thể co ngắn lại, dày lên, nên dễ quan sát hơn.

1.5.2. Phương pháp thực nghiệm

1.5.2.1. Điều kiện thực nghiệm

- Chuột nhắt trắng (nếu đánh giá cả ảnh hưởng trên nhiễm sắc thể tế bào tinh hoàn, thì phải dùng chuột đực) khỏe mạnh, cân nặng 25 ± 3 g.

- Thức ăn, nước uống cho chuột.
- Bơm tiêm, kim tiêm đầu tù để cho chuột uống thuốc.
- Thuốc nghiền cứu.
- Gôm arabic để chế hỗn dịch thuốc, nếu thuốc khó tan.
- Dung dịch Hanks do hãng Gibco cung cấp để làm tiêu bản nhiễm sắc thể.
- Colcemid do hãng Gibco cung cấp để làm cho tế bào đang phân chia dừng lại ở kỳ giữa.
- Hematoxylin eosin để nhuộm tiêu bản.
- Kính hiển vi để soi, xác định những biến đổi của nhiễm sắc thể.

1.5.2.2. Tiến hành thí nghiệm

- Dùng chuột nhắt trắng, chia làm 2 lô, một lô chứng, 1 lô thuốc, mỗi lô ít nhất 30 con.
- Chuột ở lô thuốc, cho dùng thuốc nhiều đợt, mỗi đợt 5 - 7 ngày, nghỉ xen kẽ 5 - 7 ngày giữa các đợt, hoặc dùng liên tục 30 ngày. Chuột chứng dùng dung môi pha thuốc.
- Sau khi dùng thuốc, giết chuột, dùng dung dịch Hanks và Colcemid làm tiêu bản nhiễm sắc thể từ tủy xương theo phương pháp Ford, và làm tiêu bản nhiễm sắc thể từ tinh hoàn theo phương pháp Evans.
- Nhuộm tiêu bản bằng Hematoxylin eosin.
- Soi lên kính hiển vi để đánh giá kết quả.

1.5.2.3. Đánh giá kết quả

Đối với mỗi chuột, đánh giá 50 tế bào ở kỳ giữa (metaphase) của tủy xương, và 50 tế bào ở kỳ giữa, là giai đoạn hướng cực (diakinesis) của tinh hoàn.

a) Với tế bào tủy xương, đánh giá các thông số sau (so với lô chứng):

- + Rối loạn về số lượng nhiễm sắc thể, bao gồm lệch bội (40+1), đa bội có 60 hoặc 80 nhiễm sắc thể.
- + Rối loạn về cấu trúc kiểu nhiễm sắc tử (chromatid like aberrations) như đứt kép, đứt đoạn, đảo đoạn.
- + Rối loạn cả cụm nhiễm sắc thể, được biểu hiện bằng nhiễm sắc thể không bắt màu thuốc nhuộm (nhoe hoặc nhạt) hoặc nhiễm sắc thể bị vụn nát (pulverization).

b) Với nhiễm sắc thể tế bào tinh hoàn, đánh giá các thông số sau:

- + Rối loạn về số lượng nhiễm sắc thể bao gồm lệch bội (20 thể lưỡng trị + 1), đa bội (tế bào có 40 thể lưỡng trị).
- + Rối loạn trong sự ghép đôi cặp nhiễm sắc thể, tạo nên thể đơn trị X/Y, hoặc thể đơn trị nhiễm sắc thể thường.
- + Rối loạn cấu trúc, tạo ra các dạng chuyển đoạn, hoặc mảnh nhiễm sắc thể.

Bảng 1. Tần số một số dạng rối loạn nhiễm sắc thể tế bào tủy xương

Lô	Số chuột mỗi lô	Số tế bào được đánh giá	(%) rối loạn số lượng	
			Lệch bội (40+1)	Đa bội
Thuốc	30	1429	$9,01 \pm 3,66$	$0,56 \pm 0,24$
Chứng	30	1482	$8,60 \pm 4,72$	$0,60 \pm 0,39$

Bảng 2. Tần số rối loạn cấu trúc NST ở tế bào tủy xương

Lô	Số chuột mỗi lô	Số TB đánh giá	% rối loạn cấu trúc		Số TB rối loạn	Rối loạn cả cụm
			Kiểu NS tử	Kiểu NST		
Chứng	30	1484	$0,60 \pm 0,34$	$0,40 \pm 0,29$	0	0
Thuốc	30	1425	$0,56 \pm 0,26$	$0,56 \pm 0,40$	0	0

Bảng 3. Tần số các dạng rối loạn NST ở tế bào tinh hoàn

Lô	Số TB được đánh giá	Tần số các dạng rối loạn					
		Rối loạn số lượng		Thể đơn trị		Rối loạn cấu trúc	
		Lệch bội	Đa bội	X/Y	NST thường	Chuyển đoạn	Mảnh
Chứng	968	$5,87 \pm 1,78$	$0,65 \pm 0,47$	$5,21 \pm 2,08$	$0,43 \pm 0,22$	0	0
Thuốc	1382	$5,43 \pm 1,84$	$0,63 \pm 0,44$	$5,15 \pm 2,06$	$0,55 \pm 0,36$	0	0,21

1.6. Những thuốc gây biến chủng

Những chất đã được chứng minh trên thực nghiệm có khả năng gây biến chủng là:

- Carboplatin
- Paclitaxel (Anzatax)
- Melphalan (Sarcolysin, Alkeran)
- Busulphan (Busulfan, Misulfan, Mitosan, Myleran, Myelosan).

II. NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH SINH UNG THƯ (CARCINOGENICITY TEST)

2.1. Động vật thí nghiệm

2.1.1. *Chủng loại động vật*

Cần chọn loại động vật có các tiêu chí sau:

- Chống đỡ tốt với vi khuẩn, vì thời gian thí nghiệm lâu.
- Tuổi thọ vừa phải, để thời gian nghiên cứu trải qua được nhiều giai đoạn phát triển của con vật.
- Chỉ số u tự nhiên thấp, để đánh giá được thuận lợi.
- Nhạy với tác nhân gây ung thư.
- Dễ mua và không quá đắt.
- Chọn chủng loại động vật khi nghiên cứu sơ bộ, nên chính cũng là loại khi nghiên cứu triển khai.

2.1.2. *Các loại động vật được chọn*

Thường là chuột cống trắng, chuột nhắt trắng, chuột hamster, hoặc thỏ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu sơ bộ

2.2.1. *Mục đích*

Mục đích của nghiên cứu sơ bộ là thăm dò liều cho nghiên cứu triển khai. Nếu đã xác định được liều nghiên cứu triển khai rồi, thì có thể bỏ qua giai đoạn này hoặc bỏ một số bước, miễn là đạt yêu cầu như mục 2.2.3.4 được ghi ở dưới.

2.2.2. Nghiên cứu sơ bộ độc tính sinh ung thư dùng thuốc một lần

Thử trên một số ít con vật để xác định liều cao nhất được dùng cho nghiên cứu liều nhiều lần. Nếu đã xác định được rồi thì bỏ qua giai đoạn này.

2.2.3. Nghiên cứu sơ bộ độc tính sinh ung thư dùng thuốc nhiều lần

Mục đích để xác định liều cao nhất sẽ được dùng trong nghiên cứu triển khai độc tính sinh ung thư.

2.2.3.1. Động vật thí nghiệm

- Loại động vật: Ít nhất dùng 2 loại động vật, thuộc cả 2 giới đực và cái. Thường dùng các con vật có cùng lứa tuổi, nhưng không quá 6 tuần, nếu là loài gặm nhấm.

- Số con vật: Mỗi lô cần có khoảng 10 con đực, 10 con cái.

2.2.3.2. Dùng thuốc

- Đường dùng: Nên dùng đường dự kiến sẽ dùng trong nghiên cứu triển khai, và cũng là đường dự kiến sẽ dùng trên lâm sàng sau này.

- Liều dùng: Ít nhất dùng 3 lô liều khác nhau, các liều gấp đôi nhau, kèm theo 1 lô chứng đối với mỗi giới, đực và cái.

- Thời gian dùng: Thời gian dùng nên là 90 ngày, ngày 1 lần, tuần uống cả 7 ngày. Tuy nhiên, nếu thuốc nghiên cứu có độc tính xuất hiện chậm hoặc có tác dụng tích lũy, cần phải dùng một thời gian lâu hơn.

2.2.3.3. Phương pháp thực nghiệm

- Quan sát và ghi chép các biểu hiện bên ngoài (hành vi, lông và các cơ quan mắt, mũi, mức ăn, nước uống, ỉa, đái...).

- Cân nặng: Trong tháng đầu, cân ít nhất mỗi tuần một lần. Sau đó, cứ 4 tuần cân một lần.

- Xét nghiệm đại thể và vi thể mô bệnh học, đặc biệt là xem các khối u ở các cơ quan nội tạng và mô.

+ Các con vật chết trong quá trình nghiên cứu.

+ Các con vật còn sống sót khi kết thúc thí nghiệm.

- Xét nghiệm huyết học và sinh hóa máu khi kết thúc thí nghiệm (trước khi giết con vật để xét nghiệm mô bệnh học).

2.2.3.4. Đánh giá kết quả

- Trong 3 lô nghiên cứu, phải có ít nhất 1 lô có những biểu hiện độc tính rõ.
- Liều dùng cho nghiên cứu triển khai là liều lớn nhất đạt 4 yêu cầu sau:
 - + Ước chế sự tăng trọng không quá 10% so với lô chứng.
 - + Không gây chết do tác dụng độc của thuốc.
 - + Không có những thay đổi lớn về biểu hiện bên ngoài.
 - + Không có những thay đổi lớn về các thông số huyết học và sinh hóa.

Như vậy, phải làm lại thí nghiệm, nếu:

- Cả 3 lô đều có những biểu hiện độc tính rõ, là do đã dùng liều quá cao. Khi đó phải làm thí nghiệm với các lô liều dùng thấp hơn.
- Cả 3 lô đều không có biểu hiện độc tính, là do đã dùng liều quá thấp. Phải làm thí nghiệm với các lô liều dùng cao hơn.

2.3. Nghiên cứu triển khai

2.3.1. Động vật thí nghiệm

- Loài động vật: Thường dùng chuột cống trắng hoặc thỏ. Có tài liệu yêu cầu dùng cả 2 loài động vật. Cũng có thể dùng chuột nhắt trắng hoặc chuột hamster.
- Giới tính: Phải dùng cả đực cái.
- Tình trạng sinh lý: Các con vật phải khoẻ mạnh, phát triển bình thường, cùng lứa tuổi, thường dùng loại 6 tuần tuổi.
- Số con vật: Mỗi lô, cần 50 con đực, 50 con cái. Chia lô theo phương pháp chọn mẫu ngẫu nhiên, dựa vào khối lượng con vật.

2.3.2. Dùng thuốc

2.3.2.1. Đường dùng

Nên dùng đường dùng dự kiến sẽ dùng trên lâm sàng sau này.

2.3.2.2. Liều dùng

- Dùng 3 mức liều khác nhau và một làm chứng.
- Mỗi mức liều và chứng đều dùng 2 lô, một lô dùng con đực, một lô dùng con cái. Như vậy, tổng số có 8 lô.
- Về mức liều, lấy liều đã xác định được trong nghiên cứu sơ bộ làm cơ sở, dùng thêm một liều gấp đôi và một liều bằng một nửa.

- Về 2 lô chứng (một lô dùng con đực, một lô dùng con cái), dùng nước cất hoặc nước muối sinh lý, cùng thể tích với lô dùng thuốc (dùng nước cất, nếu uống; dùng nước muối sinh lý, nếu tiêm). Trường hợp dung môi dùng để pha thuốc không phải là nước cất, mà là dung môi khác hoặc có chất nhũ hóa, thì lô chứng, dùng các dung môi này, thay cho nước cất hoặc nước muối sinh lý.

2.3.2.3. Thời gian dùng thuốc

- Thời gian dùng thuốc cần kéo dài 24 - 30 tháng đối với chuột cống trắng; 18 - 24 tháng đối với chuột nhắt trắng hoặc chuột hamster. Phải dùng ngày một lần, 7 ngày 1 tuần.

- Thời gian thí nghiệm phải kéo dài thêm 1 - 3 tháng sau khi ngừng thuốc. Có khi kéo dài thêm 30 tháng đối với chuột cống trắng; 24 tháng đối với chuột nhắt trắng hoặc chuột hamster, hoặc khi số con vật trong một lô nào đó (lô chứng hoặc lô dùng chuột) chết 75% thì kết thúc thí nghiệm.

2.3.3. Phương pháp thí nghiệm

2.3.3.1. Quan sát và ghi chép biểu hiện bên ngoài

- Hành vi (tăng đi lại, giảm đi lại, nằm im...)
- Lông và các cơ quan như mắt mũi...
- Mức ăn, mức uống tăng hoặc giảm.
- Đái, ỉa có gì đặc biệt.

2.3.3.2. Cân nặng

Trong tháng đầu, theo dõi hàng tuần. Sau đó, tháng một lần.

2.3.3.3. Xét nghiệm mô bệnh học

Xét nghiệm mô bệnh học đại thể và vi thể, đặc biệt là các khối u ở các cơ quan và mô.

- Tất cả các con vật vừa mới chết.
- Tất cả các con vật hấp hối và triển vọng sẽ chết.
- Khi hết thời gian thí nghiệm, trước hết, xét nghiệm lô chứng và lô dùng liều cao nhất:

+ Nếu 2 lô này không có sự khác nhau có ý nghĩa về số lượng u và tổng khối lượng u, thì có thể kết luận thuốc không gây ung thư ở liều dùng cao nhất này với thời gian dùng thuốc như đã tiến hành.

+ Nếu 2 lô này khác nhau có ý nghĩa về số lượng hoặc tổng khối lượng các khối

u, thì phải xét nghiệm cả các lô dùng liều thấp, để xác định lô dùng liều thấp nhất gây ra sự tăng có ý nghĩa về số lượng hoặc tổng khối lượng khối u so với lô chứng.

2.3.4. Đánh giá kết quả

- Tỷ lệ các con vật chết ở mỗi lô so với lô chứng. Thông số này chỉ có giá trị, nếu con vật chết là do khối u gây ra ở lô dùng thuốc cao hơn ở lô chứng.
- Tỷ lệ số khối u của các con vật chết ở mỗi lô so với lô chứng.
- Tỷ lệ tổng khối lượng u của các con vật chết ở mỗi lô so với lô chứng.
- Tỷ lệ số khối u của các con vật sống đến cuối thí nghiệm ở mỗi lô so với lô chứng.
- Tỷ lệ tổng khối lượng u của các con vật sống đến cuối thí nghiệm ở mỗi lô so với lô chứng.
- Tỷ lệ tổng cộng số khối u (cả con chết cả con sống) ở mỗi lô so với lô chứng.
- Tỷ lệ tổng cộng khối lượng u (cả con chết cả con sống) ở mỗi lô so với lô chứng.
- Nhận định về biểu hiện bên ngoài và cân nặng của các con vật ở mỗi lô so với lô chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Evans HJ, Mauren LQ (1972), Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test, *Mutation Research*, 31, 135-148.
2. WHO, Regional office for the Western Pacific (1993), Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines, Manila-Philippines.

CHƯƠNG 27

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH TRÊN CHỨC NĂNG
SINH SẢN VÀ PHÁT TRIỂN***PGS.TSKH. Đỗ Trung Đàm***I. ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM****1.1. Chọn loại động vật thí nghiệm**

Cần chọn loại động vật thí nghiệm có khả năng cho nhiều thông tin tốt về sinh sản và phát triển.

- Khả năng sinh sản tốt.
- Tỷ lệ dị dạng tự nhiên ít.
- Nhạy cảm với chất có ảnh hưởng đến sinh sản và phát triển.

1.2. Loại động vật thường dùng

Chuột cống trắng hoặc chuột nhắt trắng. Nhiều trường hợp dùng thêm thỏ.

II. PHƯƠNG PHÁP THỰC NGHIỆM**2.1. Dùng thuốc nghiên cứu trước và trong giai đoạn sớm của thai kỳ****2.1.1. Động vật thí nghiệm**

Thường dùng chuột cống trắng, chuột nhắt trắng, thỏ.

2.1.2. Số con vật

Nếu là chuột cống trắng hoặc chuột nhắt trắng mỗi lô 20 con đực và 20 con cái.
Nếu là thỏ, mỗi lô 10 con.

2.1.3. Đường dùng thuốc

Dùng đường sẽ dùng trong lâm sàng ở người.

2.1.4. Liều dùng

Thường dùng 3 liều khác nhau (3 lô): Liều thấp, liều trung bình và liều cao. Nên dùng liều hơn kém nhau 2 lần.

2.1.5. Lô chứng thường dùng 4 lô

- Lô chứng âm: Không dùng gì, thay thuốc bằng nước cất hoặc nước muối sinh lý với cùng thể tích.
- Lô chứng dương: Dùng một thuốc đã biết có độc trên sinh sản và phát triển.
- Lô dùng dung môi: Khi thuốc phải dùng dung môi đặc biệt để hòa tan hoặc phải dùng chất nhũ hóa, cần dùng một lô có dung môi hoặc chất nhũ hóa.
- Lô tham chiếu: Dùng một thuốc có cấu trúc hoặc tác dụng dược lý tương tự thuốc định nghiên cứu.

2.1.6. Thời gian dùng thuốc

- *Con đực*: Dùng chuột đực 40 ngày tuổi. Cho dùng liên tục 60 ngày hoặc nhiều hơn trước khi ghép đôi, và tiếp tục dùng cho đến khi thấy giao phối.
- *Con cái*: Dùng thuốc hàng ngày trước khi ghép ít nhất 14 ngày, trong khi ghép đôi, và sau khi thấy giao phối, cho đến khi chuẩn bị bắt đầu giai đoạn tạo thành cơ quan của thai.

2.1.7. Phương pháp thực nghiệm

- Trong khi thí nghiệm, ghi
 - + Biểu hiện bên ngoài
 - + Cân nặng
 - + Tiêu thụ thức ăn
 - + Tỷ lệ chuột chết.
- Nhốt 1 chuột đực và 1 chuột cái với nhau và quan sát hàng ngày cho đến khi giao phối thành công.

- Thời gian ghép đôi nên 2 tuần. Nếu cần nghiên cứu riêng độc tính trên con đực, thì ghép con đực dùng thuốc với con cái không dùng thuốc; nếu cần nghiên cứu riêng độc tính trên con cái, thì ghép con cái dùng thuốc với con đực không dùng thuốc.
- Sau khi thấy giao phối được rồi, sau từng thời kỳ (tùy ý ta muốn xác định độc tính trên giai đoạn nào), mổ chuột cái. Xác định:
 - + Số hoàng thể
 - + Số thai đậu
 - + Số thai chết.
- Chuột đực hoặc chuột cái dùng thuốc được dùng để ghép, nếu không thấy giao phối, sau một thời gian thích hợp, mổ chuột, quan sát đại thể xem các cơ quan, đặc biệt là các cơ quan sinh sản có ảnh hưởng như thế nào mà chuột không giao phối được.

2.2. Dùng thuốc trong giai đoạn hình thành các cơ quan của thai

2.2.1. Động vật thí nghiệm

Thường dùng 2 loại là chuột và thỏ, loại đã giao phối có kết quả.

2.2.2. Số con vật

Chuột 30 con/lô; thỏ 12 con/lô.

2.2.3. Đường dùng thuốc

Dùng đường sẽ dùng trên lâm sàng ở người.

2.2.4. Liều dùng

Thường dùng 3 liều khác nhau: liều thấp, liều trung bình và liều cao. Các liều hơn kém nhau 2 lần.

2.2.5. Lô chứng thường dùng 4 lô

- *Lô chứng âm*: Không dùng gì, thay thuốc bằng nước cất hoặc nước muối sinh lý với cùng thể tích, để xem sự phát triển tự nhiên.
- *Lô chứng dương*: Dùng một thuốc đã biết có độc trên giai đoạn này.
- *Lô chứng dùng dung môi*: Khi thuốc phải dùng dung môi đặc biệt để hòa tan hoặc dùng chất nhũ hóa, phải dùng một lô có dung môi hoặc chất nhũ hóa.

- *Lô tham chiếu*: Dùng một thuốc có cấu trúc hoặc tác dụng dược lý tương tự thuốc định nghiên cứu.

2.2.6. Thời gian dùng thuốc

Dùng thuốc từ khi bắt đầu thấy có giao phối đến khi tạo thành các cơ quan của thai và mô con mẹ.

2.2.7. Phương pháp thực nghiệm

- Trong khi thí nghiệm, ghi:
 - + Biểu hiện bên ngoài
 - + Cân nặng
 - + Tiêu thụ thức ăn
 - + Tỷ lệ chuột chết.
- Chuột (cống trắng hoặc nhắt trắng) đến giai đoạn hoàn thành sớm sự phát triển các cơ quan của thai, mô 2/3, còn thỏ mô 100%. Ghi:
 - + Số chuột mẹ có thai
 - + Số chuột mẹ có thai chết
 - + Số, khối lượng và quan sát hình thái thai còn sống
 - + Xét nghiệm đại thể các cơ quan và mô của con mẹ.
- Đối với chuột, còn 1/3 con mẹ chưa mổ, để đẻ tự nhiên, xem số lượng chuột dị dạng.
- Chuột con đẻ ra ghi
 - + Số chuột con trong 1 ổ
 - + Tỷ lệ chuột con chết
 - + Khối lượng chuột con đẻ ra
 - + Quan sát bộ phận sinh dục và hình thái chuột con (đặc biệt là xem có dị dạng gì không).
- Sự lớn lên và phát triển của chuột con:
 - + Sự lớn lên
 - + Sự phát triển (hình thái, chức năng, hành vi)
 - + Hành vi giao phối
 - + Khả năng có thai và sinh con

- Con mẹ đẻ rồi, từng thời gian mổ, quan sát đại thể cơ quan, mô. Có thể theo dõi lứa đẻ tiếp sau.

2.3. Dùng thuốc trong thời kỳ chu sinh và nuôi con bú

2.3.1. Động vật thí nghiệm

Thường dùng chuột cống trắng, chuột nhắt trắng cái có thai chuẩn bị đẻ.

2.3.2. Số con vật

Mỗi lô ít nhất 20 con.

2.3.3. Đường dùng thuốc

Đường dự kiến sẽ dùng trên lâm sàng cho người.

2.3.4. Liều dùng

Thường dùng 3 liều: thấp, trung bình và cao.

2.3.5. Lô chứng

- *Lô chứng âm*: Không dùng gì, thay thuốc bằng nước cất hoặc nước muối sinh lý với cùng thể tích, để xem sự phát triển tự nhiên.
- *Lô chứng dương*: Dùng một thuốc đã biết có độc trên giai đoạn này.
- *Lô chứng dùng dung môi*: Khi thuốc phải dùng dung môi đặc biệt để hòa tan hoặc chất nhũ hóa, phải dùng một lô có dung môi hoặc chất nhũ hóa.
- *Lô tham chiếu*: Dùng một thuốc có cấu trúc hoặc tác dụng dược lý tương tự thuốc định nghiên cứu.

2.3.6. Thời gian dùng thuốc

- *Chu sinh*: Từ khi chuẩn bị đẻ cho đến khi đẻ xong.
- *Cho con bú*: Từ khi đẻ xong cho đến khi ngừng cho con bú.

2.3.7. Phương pháp thực nghiệm

- Trong khi thí nghiệm, ghi:
 - + Tỷ lệ chuột mẹ chết
 - + Biểu hiện chung bên ngoài
 - + Thể trọng
 - + Tiêu thụ thức ăn

- Để chuột đẻ tự nhiên và nuôi con tự nhiên:
 - + Con mẹ khi đẻ có gì bất thường không
 - + Số con con trong một ổ: Tỷ lệ con chết; thay đổi cơ quan sinh dục và hình thái bên ngoài; khối lượng từng chuột con.
- Theo dõi chuột con lớn lên và phát triển
 - + Sự lớn lên
 - + Sự phát triển (hình thái, chức năng, hành vi)
 - + Hành vi giao phối
 - + Khả năng có thai và sinh con.
- Con mẹ đẻ rồi
 - + Từng thời gian mổ một số để quan sát cơ quan và mô
 - + Theo dõi lứa đẻ tiếp sau.

III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

- 3.1. Kết quả thu được trình bày theo bảng và hình vẽ, có nhận xét, thảo luận kết quả, có phụ lục ghi kết quả theo dõi từng con vật ở mỗi lô.
- 3.2. Thống kê và phân tích thống kê. Nên phân tích theo ổ chuột tốt hơn là phân tích theo tổng số thai hoặc tổng số con chuột con trong một lô (20 - 30 con mẹ).
- 3.3. Khi bàn luận, nên chú ý:
 - Liều thuốc thí nghiệm không có ảnh hưởng đến chuột bố mẹ và chuột con, để có nhận định về liều an toàn.
 - Liều bắt đầu có ảnh hưởng đến chuột bố mẹ và chuột thế hệ sau.
 - So sánh độc tính trên sự sinh sản và phát triển với thuốc có cấu trúc tương tự hoặc có tác dụng dược lý tương tự.

IV. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG SINH QUÁI THAI CỦA THALIDOMID

(Phương pháp DeBock và Peter, 1963)

4.1. Đặt vấn đề

Tác dụng sinh quái thai của thalidomid (là một thuốc có tác dụng an thần rất tốt) đã gây ra một nỗi kinh hoàng cho cả thế giới. Vì vậy, việc thử tác dụng sinh

quái thai của một thuốc mới là một yêu cầu cần thiết. Tuy nhiên, phương pháp DeBock và Peter (1963) thử trên phôi gà, nên cũng chỉ có tính chất tham khảo. Việc nghiên cứu trên phôi thai động vật có vú sẽ có giá trị hơn vì gần với phôi thai người. Tuy nhiên, đây là một phương pháp tham khảo tốt khi nghiên cứu tác dụng gây quái thai của thuốc.

4.2. Nguyên vật liệu nghiên cứu

4.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Thuốc thalidomid cân 500 mg cho mỗi thí nghiệm.
- Trứng gà Lơ-go (Leghorn) (loại gà trắng nuôi bằng phương pháp công nghiệp), dùng trứng của gà mái có ghép với con đực (gà trống) 120 quả.

4.2.2. Hóa chất dung môi

- Carboxymethylcellulose 1 g.
- Nước cất.

4.2.3. Vật liệu

- Kim tiêm chủng và bơm tiêm.
- Cối chày sứ.
- Ống dong và cốc thủy tinh để pha thuốc và đựng dung môi.

4.2.4. Dụng cụ máy móc

- Máy ấp trứng ở 37°C.
- Dụng cụ để soi trứng.
- Máy lạnh ở -20°C.

4.3. Phương pháp nghiên cứu

Trứng gà 120 trứng, đánh dấu và chia làm 6 lô, mỗi lô 20 quả, 3 lô làm chứng và 3 lô dùng thalidomid.

Thalidomid được pha thành hỗn dịch 1% trong dung môi là gel carboxymethylcellulose 1% trong nước cất. Mỗi ngày dùng thuốc, lấy cối, chày sứ, nghiền kỹ 150 mg thalidomid, rồi thêm vừa đủ 15 ml gel carboxymethylcellulose 1% vào. Lại nghiền kỹ để được một hỗn dịch đồng nhất, gọi là dịch thuốc. Còn gel carboxymethylcellulose 1% không có thuốc thalidomid được gọi là dung môi pha thuốc.

Tất cả 120 trứng được ủ trong lò ấp trứng ở 37°C. Sau một ngày ủ, tiêm vào túi noãn hoàng (yolk sac) mỗi trứng ở lô thuốc thứ nhất 0,5 ml dịch thuốc tương đương với 5 mg thalidomid. Còn ở lô làm chứng thứ nhất, tiêm vào mỗi trứng 0,5 ml dung môi pha thuốc. Sau ngày ủ thứ 2, tiêm cho lô thuốc thứ 2 và lô chứng thứ 2 như lần trước, và sau ngày ủ thứ 3, lại tiêm cho lô thuốc thứ 3 và lô chứng thứ 3 như vậy.

Các trứng sau khi tiêm xong, lại cho vào lò ấp trứng. Hàng ngày, tiến hành đảo trứng. Vào ngày sau của ngày tiêm thuốc thứ 3, soi trứng trước một ngọn nến. Loại bỏ những trứng chết và trứng bất thụ. Sau đó, soi trứng hàng ngày. Ghi và kiểm tra trứng chết. Sau khi ủ được 18 ngày, soi trứng lần cuối, rồi để trứng lạnh ở -20°C trong 2 giờ. Sau đó xét nghiệm phôi.

4.4. Ghi kết quả thí nghiệm

Tính kết quả gộp cho cả 3 lô thuốc (60 trứng) và 3 lô chứng (60 trứng).

– Số trứng chết và bất thụ sau khi ủ 3 ngày ở các lô làm chứng là 2/60, số còn lại là 58 trứng; còn ở các lô dùng thuốc thalidomid là 15/60, số còn lại là 45 trứng.

– Số trứng chết từ ngày 4 đến ngày thứ 18 ở các lô làm chứng là 6/58; còn ở các lô dùng thuốc là 22/45.

– Số phôi thai dị dạng ở các lô chứng là 0/58; còn số dị dạng ở lô thuốc là 5/45. Biểu hiện của dị dạng là chân quá ngắn, hoặc chân bị xoắn vặn vỏ đồ, trong đó 4 con còn có cánh mọc cùng một chỗ hoặc cánh bị biến dạng.

4.5. Biểu thị kết quả

Đánh giá kết quả thí nghiệm bằng cách dùng test χ^2 theo phương pháp tính của Pearson. Trong trường hợp có tần số ≤ 4 , đã áp dụng công thức của Yates. Các kết quả thí nghiệm được trình bày trên bảng sau:

Tác dụng gây chết và gây quái thai của thalidomid trên phôi gà

Thông số	Lô chứng	Lô thuốc	P
Trứng chết và bất thụ sau 3 ngày ủ	2/60 (3,3%)	15/60 (25%)	< 0,001
Trứng chết khi ủ từ ngày 4 đến ngày 18	6/58 (10,3%)	22/45 (48,9%)	< 0,001
Số quái thai	0/58 (0%)	5/45 (11,1%)	< 0,05

CHƯƠNG 28

**PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TÍNH AN TOÀN
VÀ LIỀU CÓ HIỆU QUẢ CỦA THUỐC***PGS. TSKH. Đỗ Trung Đàm***I. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Trong thời gian qua, việc nghiên cứu tác dụng dược lý và nghiên cứu lâm sàng thuốc từ dược liệu và thuốc y học cổ truyền đã được quan tâm nhiều. Nhưng các nhà nghiên cứu vẫn còn rất nhiều khó khăn trong việc xác định tính an toàn và liều có hiệu quả của thuốc.

Để giúp giải quyết những vấn đề trên, chúng tôi đã cung cấp hai tài liệu cơ bản. Đó là "Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc" [1] và "Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm" [2]. Tuy nhiên, đi vào áp dụng cụ thể các tài liệu trên để xác định tính an toàn và tính liều có hiệu quả của thuốc, các nhà nghiên cứu vẫn rất lúng túng. Có người nghiên cứu dược lý thực nghiệm trên chuột cống trắng dùng liều tính ra dược liệu khô đến 40 g/kg, hoặc gọi liều tối đa không gây chết LD₀ là liều tuyệt đối an toàn, chứng tỏ chưa nắm được cơ sở lý luận của nghiên cứu dược lý các thuốc.

Để giải quyết khó khăn trên cho các nhà nghiên cứu thực nghiệm dược lý và lâm sàng, trong bài này, chúng tôi xin trình bày cách xác định tính an toàn và liều có hiệu quả khi nghiên cứu một thuốc mới. Đối với những thuốc dân tộc sâu thâm được từ các thầy lang, ta đã biết liều mà các thầy lang vẫn dùng cho người rồi, thì cách xác định có đơn giản hơn, và chúng tôi sẽ trình bày trong một công trình khác.

**II. NHỮNG ĐIỂM CẦN QUẢN TRIỆT KHI XÁC ĐỊNH TÍNH AN TOÀN
VÀ LIỀU CÓ HIỆU QUẢ CỦA THUỐC**

- 2.1. Phải biết "Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc" [1] để tìm liều chết trung bình LD₅₀ của thuốc nghiên cứu. Phải xác định rõ là thử độc tính cấp với động vật thực nghiệm nào, và đường dùng nào của thuốc.

2.2. Phải biết "Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm" [2]. Có rất nhiều cách tính liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm. Tài liệu [2] đã nêu 10 cách tính khác nhau, và đã rút ra một phương pháp đơn giản nhất là tính liều có hiệu quả tương đương dựa vào diện tích bề mặt cơ thể của các loài động vật khác nhau và của người. Khi đã tính liều theo diện tích bề mặt cơ thể, thì bất kỳ là người cao to, hoặc lùn bé, hoặc trẻ em, đều chỉ dùng một liều duy nhất giống nhau, tính theo một đơn vị diện tích bề mặt cơ thể. Cũng như vậy, liều cho các con vật nhỏ như chuột nhắt trắng, chuột cống trắng; con vật trung bình như mèo, thỏ, khỉ; con vật lớn hơn như chó, cho đến người, cũng vẫn dùng một liều duy nhất giống nhau. Tuy nhiên, những con vật càng nhỏ, thì diện tích bề mặt cơ thể tính cho 1 kg thể trọng càng lớn. Mối tương quan của liều dùng giữa các con vật khác nhau và người tính theo 1 kg thể trọng được trình bày ở bảng 1 (xin xem tài liệu [2]).

Bảng 1. Hệ số có hiệu quả tương đương giữa các loài động vật và người (theo tài liệu [2])

Từ \ Sang	Chuột nhắt trắng	Chuột cống trắng	Thỏ	Chó	Người
Chuột nhắt trắng	1	1/2	1/4	1/7	1/12
Chuột cống trắng	2	1	1/2	1/4	1/7
Thỏ (khỉ, mèo)	4	2	1	3/5	1/3
Chó	7	4	5/3	1	1/2
Người	12	7	3	2	1

2.3. Dạng thuốc dự định dùng cho người là dạng nào, thì khi thực nghiệm cũng phải dùng dạng thuốc đó. Ví dụ, nước hãm, nước sắc, cao lỏng, cao đặc, cao mềm, cao khô, phân đoạn chiết (chiết bằng dung môi gì) hoặc hoạt chất tinh khiết.

- Nếu là hoạt chất tinh khiết, thì liều tính theo g/kg hoặc mg/kg hoạt chất tinh khiết, có nêu rõ là hiệu suất hoạt chất trong dược liệu là bao nhiêu %.
- Nếu là cao mềm, cao khô, hoặc các dạng bào chế (viên nén, viên bao, viên nang...) từ cao mềm, cao khô, thì liều nên tính theo g/kg hoặc mg/kg theo cao mềm, cao khô, có nêu rõ là hiệu suất cao mềm, cao khô chiết được là bao nhiêu % so với dược liệu khô.

- Nếu là nước hầm, nước sắc, cao cồn, cao lỏng, thì nên tính liều quy ra được liều khô.
- 2.4. Đường dùng thuốc cho người dự định là gì (uống, tiêm dưới da, tiêm bắp thịt, tiêm phúc mạc, tiêm tĩnh mạch), cũng phải dùng cho động vật thực nghiệm đường dùng đó, trừ những trường hợp đặc biệt.
- 2.5. Vì là người Việt Nam, nên khi đề cập đến người lớn, ta lấy người đại diện cho đa số là người cao 1,60 m; cân nặng 50 kg và có diện tích bề mặt cơ thể là 1,5 m². Nếu là người có chiều cao và cân nặng khác, ta tính diện tích bề mặt cơ thể theo toán đồ trong tài liệu [2] hoặc dùng "Bảng tính diện tích mặt cơ thể người theo chiều cao và cân nặng".
- 2.6. Phải quyết định xem dùng mô hình thực nghiệm nào để chứng minh tác dụng dược lý định nghiên cứu, và thí nghiệm trên con vật nào (chuột, thỏ, mèo, khỉ, chó...).
- 2.7. Nghiên cứu dược lý và lâm sàng là nghiên cứu trên cơ thể sinh vật và người. Do tính đặc thù của các cá thể sinh vật, nên phương pháp chung nêu ở đây, chỉ đúng cho đa số các trường hợp, và không tránh được các trường hợp ngoại lệ; cũng như một thuốc chữa một bệnh nào đó, không phải bao giờ cũng khỏi 100%, mà có thể có một số trường hợp không khỏi.

III. PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH LIỀU CÓ HIỆU QUẢ CHO MỘT THUỐC MỚI

3.1. Bước 1. Xác định LD₅₀

Phải xác định LD₅₀ của thuốc mới đó theo phương pháp đã ghi trong sách "Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc" [1]. Ví dụ, dựa vào phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc trong tài liệu [1], đã xác định được LD₅₀ của một số thuốc (bảng 2). Chú ý về đường dùng thuốc (uống, tiêm phúc mạc, tiêm tĩnh mạch...) phải dùng đường mà dự kiến sẽ dùng trên người (ngoài ra, có thể dùng thêm các đường dùng khác). Tuy nhiên, trong một số trường hợp, tuy dự định là tiêm tĩnh mạch cho người, nhưng chấp nhận tiêm phúc mạc khi thử trên chuột nhất trắng, vì tiêm tĩnh mạch cho chuột nhất trắng, thao tác rất khó khăn, không đạt được độ chính xác như tiêm phúc mạc.

Bảng 2. Kết quả xác định LD₅₀ của một số thuốc

Số TT	Tên thuốc	Động vật thử	Đường dùng thuốc		LD ₅₀ (mg/kg)
			Dự định cho người	Thử ở động vật	
1	Digitoxin	Mèo	i.v.	i.v.	0,180
2	Methyldigoxin	CNT	uống	uống	7,8
3	Meloxicam	CNT	uống	uống	470
4	Furosemid	CNT	uống	uống	2600
5	Cisplatin	Chuột lang	i.v.	i.p.	9,7
6	Melphalan	CCT	i.v.	i.p.	4,5
7	Vinblastin	CNT	i.v.	i.v.	17
8	Vincristin	CNT	i.v.	i.p.	5,2
9	Cao lá náng	CNT	uống	uống	12430

Ghi chú:

1. Cao lá náng ở đây là cao khô chiết bằng nước từ lá cây náng hoa trắng (*Crinum asiaticum* L.), họ Thủy tiên (Amaryllidaceae). Liều tính theo cao khô, 1g cao khô tương đương 4g dược liệu lá khô.
2. CNT: là chuột nhắt trắng.
3. CCT: là chuột cống trắng.
4. i.v.: là tiêm tĩnh mạch.
5. i.p.: là tiêm phúc mạc.

3.2. Bước 2. Xác định mô hình và động vật thử nghiệm được lý

Căn cứ vào loại thuốc gì mà xác định mô hình thực nghiệm được lý cho thích hợp, và mô hình này sử dụng loại động vật thực nghiệm nào (bảng 3). Các mô hình thực nghiệm ở đây là thử trên con vật thí nghiệm. Nếu thử trên ống nghiệm hoặc trên cơ quan cô lập, thì phải tính toán theo phương pháp khác.

Nói chung, một mô hình thực nghiệm được lý, chỉ nói lên được một khía cạnh tác dụng của thuốc. Vì vậy, trong nghiên cứu được lý, với một thuốc nào đó, thường phải thử trên nhiều mô hình thực nghiệm khác nhau, trong đó có những mô hình nêu được tác dụng chính và có những mô hình có tác dụng bổ trợ.

Bảng 3. Mô hình và động vật thực nghiệm dược lý

Số TT	Tên thuốc	Loại thuốc	Mô hình thực nghiệm	Động vật thử
1	Digitoxin	Trợ tim	Tăng sức co tim (tăng biên độ sóng R trên ECG)	Mèo
2	Methyldigoxin	Trợ tim	Tăng sức co tim (tăng biên độ sóng R trên ECG)	Thỏ
3	Meloxicam	Chống viêm	Tác dụng chống viêm cấp tính, mạn tính	CCT
4	Furosemid	Lợi tiểu	Tác dụng lợi tiểu	CCT
5	Cisplatin	Chữa ung thư	U bàng do tế bào sarcoma-180	CNT
6	Melphalan	Chữa ung thư	U cơ đùi do tế bào sarcoma-180	CNT
7	Vinblastin	Chữa ung thư	Cây bạch cầu bị bệnh dòng lympho-1531	CCT
8	Vincristin	Chữa ung thư	Carcinom bàng Ehrlich	CCT
9	Cao lá náng	Chữa u tuyến tiền liệt	U tuyến tiền liệt do testosterone	CCT 80-100g

3.3. Bước 3. Tính liều an toàn khi thử nghiệm dược lý

Trong sách "Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc" [1] đã nêu rõ, khi đã xác định được LD_{50} , thì liều thử nghiệm dược lý tương đối an toàn bằng $1/10 LD_{50}$ ở cùng một loại động vật và cùng một đường dùng thuốc. Do đó, từ liều LD_{50} đã xác định được ở bảng 2, ta tính ra được liều an toàn khi thử nghiệm dược lý (D_s) bằng $1/10 LD_{50}$. Trong bảng 4, các trị số ở cột 4 bằng $1/10$ các số liệu tương ứng ở cột 6 của bảng 2; các số liệu ở cột 5 được lấy từ cột 5 của bảng 3. Bây giờ, ta xác định các số liệu ở cột 6 của bảng 4.

Trường hợp nếu thử tác dụng dược lý trên loại động vật đã xác định LD_{50} , thì ta dùng ngay liều ở cột 4 của bảng này làm liều an toàn để thử tác dụng dược lý, như trường hợp của digitoxin. Nhưng ở hầu hết các trường hợp, động vật dùng trong thực nghiệm dược lý khác với động vật đã dùng để xác định LD_{50} . Vì vậy, ta phải dùng phép ngoại suy, chuyển từ liều thực nghiệm dược lý an toàn cho con vật đã xác định LD_{50} , sang liều thực nghiệm dược lý an toàn cho con vật trong thí nghiệm dược lý ở cột 6 của bảng 4, bằng cách áp dụng các hệ số ở bảng 1. Sau đây là các trường hợp cụ thể.

Digitoxin

Xác định LD_{50} ở mèo, chuyển sang thực nghiệm được lý cũng thử trên mèo, do đó hệ số là 1, và liều thực nghiệm được lý an toàn ở mèo là 0,018 mg/kg.

Methyldigoxin

Từ chuột nhắt trắng sang thỏ, hệ số là 1/4 (xem bảng 1), nên liều thực nghiệm được lý an toàn cho thỏ là $D_s = 0,78 \times 1/4 = 0,195$ mg/kg.

Meloxicam

Từ chuột nhắt trắng sang chuột cống trắng, ta có hệ số là 1/2 (xem bảng 1), nên liều thực nghiệm được lý an toàn cho chuột cống trắng là $D_s = 47 \times 1/2 = 23,5$ mg/kg.

Furosemid

Cũng từ chuột nhắt trắng sang chuột cống trắng, ta có hệ số 1/2, nên liều thử nghiệm được lý an toàn cho chuột cống trắng là $D_s = 260 \times 1/2 = 130$ mg/kg.

Cisplatin

Từ chuột lang sang chuột nhắt trắng, trong bảng 1 không có. Nhưng trong bảng 1 ta thấy, từ chuột cống trắng sang chuột nhắt trắng, hệ số là 2 và từ thỏ sang chuột nhắt trắng hệ số là 4. Chuột lang có thể trọng là 350 – 500g, nên có hệ số nằm giữa 2 và 4, nhưng gần 2 hơn. Ta chấp nhận ở đây hệ số là 5/2, thì liều thực nghiệm được lý an toàn cho chuột nhắt trắng sẽ là $D_s = 0,97 \times 5/2 = 2,425$ mg/kg.

Melphalan

Từ chuột cống trắng sang chuột nhắt trắng, ta có hệ số 2, nên liều thí nghiệm được lý an toàn ở chuột nhắt trắng là $D_s = 0,45 \times 2 = 0,90$ mg/kg.

Vinblastin

Từ chuột nhắt trắng sang chuột cống trắng, ta có hệ số 1/2, nên liều thực nghiệm được lý an toàn ở chuột cống trắng là $D_s = 1,7 \times 1/2 = 0,85$ mg/kg.

Vincristin

Từ chuột nhắt trắng sang chuột cống trắng, ta có hệ số 1/2, nên liều thực nghiệm được lý ở chuột nhắt trắng là $D_s = 0,52 \times 1/2 = 0,26$ mg/kg.

Cao năng hoa trắng

Trong bảng 1 ta thấy, từ chuột nhắt trắng sang chuột cống trắng có thể trọng

150 – 200g có hệ số là 1/2. Nhưng ở đây, ta dùng chuột cống trắng 80 – 100g, nên hệ số này phải lớn hơn 1/2. Ta áp dụng hệ số 2/3, ta có liều thực nghiệm dược lý an toàn cho chuột cống trắng 80 – 100g là $D_s = 1243 \times 2/3 = 829 \text{ mg/kg}$.

Bảng 4. Liều an toàn khi thử nghiệm dược lý

Số TT	Tên thuốc	Động vật thử LD ₅₀	Trị số D _s (mg/kg)	Động vật thử dược lý	Trị số D _s (mg/kg)
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	Digitoxin	mèo	0,018	mèo	0,018
2	Methyldigoxin	CNT	0,78	thỏ	0,195
3	Meloxicam	CNT	47	CCT	23,5
4	Furosemid	CNT	260	CCT	130
5	Cisplatin	chuột lang	0,97	CNT	2,43
6	Melphalan	CCT	0,45	CNT	0,90
7	Vinblastin	CNT	1,7	CCT	0,85
8	Vicristin	CNT	0,52	CCT	0,26
9	Cao lá náng	CNT	1243	CCT 80-100g	829

3.4. Bước 4. Liều có hiệu quả ở động vật thí nghiệm

Để tính liều có hiệu quả ED₅₀, cần phải tiến hành khá nhiều thí nghiệm. Phương pháp xác định ED₅₀ chính xác được trình bày ở chương 29. Ở đây, ta coi liều thấp nhất gây ra tác dụng có ý nghĩa thống kê trên thực nghiệm là liều có hiệu quả 50% (ED₅₀). Các trị số của cột 4 bảng 5 là liều an toàn D_s khi bắt đầu thử dược lý, được lấy từ cột 6 của bảng 4. Kết quả xác định liều có hiệu quả ED₅₀ được ghi ở cột 5 của bảng 5. Ta xét các trường hợp cụ thể.

Digitoxin

Thử trên mèo, tiêm tĩnh mạch với liều 0,018 mg/kg thấy có tác dụng co bóp cơ tim, được biểu hiện bằng tăng biên độ sóng R trên điện tim đồ. Khi giảm liều còn 0,009 mg/kg, tác dụng không còn rõ. Như vậy, liều có hiệu quả là 0,018 mg/kg.

Methyldigoxin

Cho thỏ uống với liều 0,195 mg/kg, tác dụng biểu hiện quá mạnh. Dùng liều giảm còn 1/2 là 0,100 mg/kg, tác dụng vẫn còn rõ. Nhưng khi giảm liều còn 0,050 mg/kg, thì tác dụng không còn. Như vậy, liều có hiệu quả là 0,100 mg/kg.

Meloxicam

Thử trên chuột cống trắng với liều 23,5 mg/kg, tác dụng chống viêm quá mạnh. Thử với các liều giảm còn 12 mg/kg; 6 mg/kg; 3 mg/kg, thậm chí đến liều 1,5 mg/kg, tác dụng vẫn còn, tuy yếu. Nhưng nếu giảm đến liều 0,75 mg/kg thì tác dụng không còn. Như vậy, liều có hiệu quả là 1,5 mg/kg.

Bảng 5. Liều có hiệu quả khi thử nghiệm dược lý

Số TT	Tên thuốc	Động vật thí nghiệm	Liều an toàn bắt đầu thử dược lý Ds (mg/kg)	Liều có hiệu quả trên thực nghiệm ED ₅₀ (mg/kg)
1	Digitoxin	Mèo	0,018	0,018
2	Methyldigoxin	Thỏ	0,195	0,100
3	Meloxicam	CCT	23,5	1,5
4	Furosemid	CCT	130	8
5	Cisplatin	CNT	2,43	20
6	Melphalan	CNT	0,90	3,6
7	Vinblastin	CCT	0,85	1,7
8	Vicristin	CCT	0,26	0,40
9	Cao lá năng	CCT 80-100g	829	210

Furosemid

Thử với liều 130 mg/kg trên chuột cống trắng thấy tác dụng lợi tiểu quá mạnh. Giảm liều đến các liều 65 mg/kg; 32 mg/kg; 16 mg/kg, thậm chí đến liều 8 mg/kg vẫn còn có tác dụng lợi tiểu rõ. Nhưng khi giảm còn 4 mg/kg thì tác dụng không còn. Như vậy, liều có hiệu quả là 8 mg/kg.

Cisplatin

Thử với liều 2,43 mg/kg, không thấy có tác dụng rõ trên u báng thực nghiệm ở chuột nhắt trắng. Liều này là liều tương đối an toàn, nhưng không có tác dụng. Vì vậy phải tăng liều đến 5 mg/kg, rồi 10 mg/kg, nhưng vẫn chưa thấy tác dụng rõ. Tăng đến liều 20 mg/kg, mới thấy có tác dụng, nhưng ở liều này đã thấy chuột có hiện tượng nhiễm độc. Ta được liều có hiệu quả là 20 mg/kg.

Melphalan

Dùng liều 0,9 mg/kg, không thấy biểu hiện độc, nhưng chưa thấy có tác dụng rõ trên u đùi thực nghiệm ở chuột nhất trắng. Tăng lên đến liều 1,8 mg/kg, thấy có tác dụng, nhưng chưa có ý nghĩa. Phải đến liều 3,6 mg/kg mới thấy có tác dụng rõ. Với liều này, chuột đã thấy có biểu hiện độc. Như vậy, liều có hiệu quả là 3,6 mg/kg.

Vinblastin

Dùng liều 0,85 mg/kg, không thấy độc, nhưng tác dụng chưa rõ trên tế bào ung thư bạch cầu đã cấy chủng. Tăng đến liều 1,7 mg/kg, mới thấy tác dụng rõ, nhưng cũng thấy có biểu hiện độc. Như vậy, liều có hiệu quả là 1,7 mg/kg.

Vincristin

Dùng liều 0,26 mg/kg, không thấy chuột cống trắng bị nhiễm độc, có thấy tác dụng trên carcinom nhưng yếu. Ta có thể coi như liều có hiệu quả là 0,26 mg/kg, nhưng hơi gượng ép. Tăng lên liều 0,52 mg/kg, tác dụng rất rõ, nhưng có biểu hiện độc. Ta cũng có thể coi liều có hiệu quả trong trường hợp này là 0,52 mg/kg. Để cho chính xác hơn, trong trường hợp này, ta nên nghiên cứu thêm một liều trung gian là 0,40 mg/kg và thấy cũng có tác dụng rõ. Như vậy, liều có hiệu quả trong trường hợp này là 0,40 mg/kg (nhưng ta cũng có thể lấy liều có hiệu quả là 0,26 mg/kg hoặc 0,52 mg/kg).

Cao lá náng

Dùng liều của cao là 829 mg/kg, thấy tác dụng ức chế u tuyến tiền liệt rất rõ. Giảm liều còn 415 mg/kg, tác dụng vẫn còn khá, thậm chí giảm đến liều còn 210 mg/kg, tác dụng vẫn còn, tuy yếu. Nhưng nếu giảm liều còn 100 mg/kg thì không còn tác dụng. Như vậy, liều có hiệu quả là 210 mg/kg.

IV. XÁC ĐỊNH TÍNH AN TOÀN CỦA THUỐC**4.1. Bước 1. Tính liều có hiệu quả tương đương cho con vật đã thử độc tính cấp**

Liều có hiệu quả tương đương tính cho con vật đã thử độc tính cấp được trình bày ở bảng 6. Trên bảng này, cột 3 và 4 là lấy từ cột 3 và 5 của bảng 5, cột 5 là cột 3 của bảng 2. Bây giờ ta tính các trị số cột 6 của bảng 6, dựa vào các hệ số ở bảng 1.

**Bảng 6. Liều có hiệu quả tương đương
tính cho con vật thử độc tính cấp**

Số TT	Tên thuốc	Liều có hiệu quả trên thực nghiệm		Liều có hiệu quả tương đương tính cho con vật thử độc tính cấp	
		Con vật thử	ED ₅₀ (mg/kg)	Con vật thử	ED ₅₀ (mg/kg)
1	Digitoxin	Mèo	0,018	Mèo	0,018
2	Methyldigoxin	Thỏ	0,100	CNT	0,40
3	Meloxicam	CCT	1,5	CNT	3,0
4	Furosemid	CCT	8	CNT	16
5	Cisplatin	CNT	20	Chuột lang	8
6	Melphalan	CNT	3,6	CCT	1,8
7	Vinblastin	CCT	1,7	CNT	3,4
8	Vicristin	CCT	0,40	CNT	0,8
9	Cao lá náng	CCT 80-100g	210	CNT	315

Ta có:

- Từ mèo sang mèo, hệ số là 1
- Từ thỏ sang chuột nhắt trắng, hệ số là 4
- Từ chuột cống trắng sang chuột nhắt trắng, hệ số là 2
- Từ chuột nhắt trắng sang chuột lang, hệ số là 2/5
- Từ chuột nhắt trắng sang chuột cống trắng, hệ số là 1/2
- Từ chuột cống trắng 80-100g sang chuột nhắt trắng, hệ số là 3/2

4.3. Bước 2. Tính chỉ số điều trị

Chỉ số điều trị được tính dựa vào LD₅₀ và ED₅₀ của cùng một loại động vật và cùng một đường dùng thuốc. Theo tài liệu [1], chỉ số điều trị I₀ được tính theo công thức sau:

$$I_0 = \frac{LD_{50}}{ED_{50}}$$

Ta áp dụng công thức trên để tính chỉ số điều trị cho các thuốc nghiên cứu (bảng 7). Trong bảng 7, các trị số ở cột 3 và 4 được lấy từ cột 5 và 6 của bảng 6. Cột 5 là trị số LD₅₀ được lấy từ cột 6 của bảng 2. Như vậy, trị số của mỗi hàng ở cột 6

(bảng 7) bằng thương số của trị số ở cột 5 chia cho trị số của cột 4 cùng hàng. Từ đó, ta có bảng 7 hoàn chỉnh.

Bảng 7. Chỉ số điều trị của các thuốc nghiên cứu

Số TT	Tên thuốc	Con vật thử	ED ₅₀ (mg/kg)	LD ₅₀ (mg/kg)	I ₀
1	Digitoxin	Mèo	0,018	0,180	10
2	Methyldigoxin	CNT	0,40	7,8	19,5
3	Meloxicam	CNT	3,0	470	157
4	Furosemid	CNT	16	2600	162
5	Cisplatin	Chuột lang	8	9,7	1,2
6	Melphalan	CCT	1,8	4,5	2,5
7	Vinblastin	CNT	3,4	17	5
8	Vicristin	CNT	0,8	5,2	6,5
9	Cao lá náng	CNT	315	12430	40

4.3. Bước 3. Xác định tính an toàn của thuốc

Theo tài liệu [1], chúng ta biết rằng, một thuốc gọi là an toàn bao giờ cũng phải kèm theo điều kiện là với liều dùng là bao nhiêu. Trong trường hợp ta nghiên cứu ở đây, việc bàn luận tính an toàn là trên cơ sở dùng liều có hiệu quả (ED₅₀).

Cũng theo tài liệu [1], nếu chỉ số điều trị lớn hơn 10 ($I_0 > 10$) thì thuốc dùng tương đối an toàn, và nếu I_0 càng lớn hơn 10, thì thuốc càng an toàn. Từ bảng 7, meloxicam và furosemid có trị số I_0 rất lớn (157 và 162), nên là thuốc rất an toàn. Các thuốc methyldigoxin và cao khô lá náng cũng có chỉ số điều trị lớn (19,5 và 40), nên cũng là những thuốc an toàn khi dùng.

Cũng theo tài liệu [1], những thuốc có chỉ số điều trị bằng hoặc nhỏ hơn 10 ($I_0 \leq 10$) chỉ được dùng trong điều trị, nếu:

- Có tác dụng điều trị rõ rệt.
- Chưa tìm được thuốc khác thay thế.
- Khi dùng phải theo dõi chặt chẽ để xử trí kịp thời khi có tai biến

Digitoxin là thuốc có chỉ số điều trị bằng 10 ($I_0 = 10$). Trước đây, chưa có thuốc thay thế, nên được dùng nhiều. Nhưng nay ít dùng vì đã có thuốc có tác dụng, lại có chỉ số điều trị cao hơn. Dù sao, với chỉ số điều trị là 10, digitoxin là một thuốc tương đối an toàn.

Các thuốc chữa ung thư vincristin, vinblastin, đặc biệt là melphalan và cisplatin có chỉ số điều trị rất nhỏ, là những thuốc không an toàn. Nhưng do có tác dụng điều trị rõ rệt trên một số loại ung thư, mà chưa tìm được thuốc khác tốt hơn để thay thế, nên vẫn còn được dùng. Tuy vậy, khi dùng phải hết sức thận trọng và phải có thầy thuốc theo dõi chặt chẽ. Nhất là cisplatin, chỉ số điều trị là 1,2, nếu tiêm nhanh thì chắc chắn gây nguy hại đến tính mạng. Vì vậy, phải pha vào dịch truyền, tiêm truyền chậm kéo dài 6 - 8 giờ, hoặc phải chia liều có hiệu quả ra 4 - 5 ngày liên tiếp. Thực tế, cisplatin chỉ được dùng trong một số loại ung thư đã di căn, và đã trợ với các thuốc chữa ung thư khác.

V. TÍNH LIỀU CÓ HIỆU QUẢ TƯƠNG ĐƯƠNG TRÊN NGƯỜI

Sau khi đã xác định được thuốc có tác dụng được lý và xác định được tính an toàn của thuốc, có thể chuyển sang thử lâm sàng trên người. Để có phương hướng đúng trong việc chọn liều dùng ban đầu trên người, cần phải ngoại suy từ liều có hiệu quả trên động vật thực nghiệm sang liều có hiệu quả tương đương trên người. Trong bảng 8, các trị số ở cột 3 và 4 là liều có hiệu quả trên động vật thực nghiệm được lấy từ cột 3 và 5 của bảng 5. Cột 5 của bảng 8 là liều có hiệu quả tương đương cho người được tính nhờ áp dụng các hệ số có hiệu quả tương đương ghi ở bảng 1.

**Bảng 8. Liều có hiệu quả tương đương trên người
của các thuốc nghiên cứu**

Số TT	Tên thuốc	Liều có hiệu quả trên thực nghiệm		Liều có hiệu quả tương đương trên người		
		Động vật thử	ED ₅₀ (mg/kg)	mg/kg	mg/người 50 kg	mg/m ²
1	Digitoxin	Mèo	0,018	0,006	0,3	
2	Methyldigoxin	Thỏ	0,100	0,033	1,65	
3	Meloxicam	CCT	1,5	0,214	10,7	
4	Furosemid	CCT	8	1,143	57	
5	Cisplatin	CNT	20	1,67	83,5	55,7
6	Melphalan	CNT	3,6	0,3	15	10
7	Vinblastin	CCT	1,7	0,243	12	7,7
8	Vincristin	CCT	0,40	0,057	2,85	1,86
9	Cao lá náng	CCT 80-100g	210	23,3	1165	

Ta thấy:

- Từ thỏ vào mèo (mèo coi như tương đương với thỏ) sang người, hệ số là 1/3.
- Từ chuột cống trắng sang người, hệ số là 1/7
- Từ chuột nhắt trắng sang người, hệ số là 1/12
- Với chuột cống trắng 80 - 100g, ta áp dụng hệ số 1/9.

Từ đó, tính ra các trị số của cột 6 (bảng 8). Trị số ở mỗi hàng là trị số ở cột 5 cùng hàng nhân với 50.

Đối với các thuốc chữa ung thư, có chỉ số điều trị thấp, liều có hiệu quả khá gần với liều độc. Để giảm bớt tai biến khi dùng cho các người có chiều cao và cân nặng khác nhau, nên dùng liều tính theo mg/m^2 diện tích bề mặt cơ thể.

Như trên đã trình bày, với người lớn của Việt Nam có cân nặng là 50 kg và chiều cao là 1,60 m, thì diện tích bề mặt cơ thể là $1,5 \text{ m}^2$ (có thể dùng bảng hoặc dùng toán đồ như trong chương 30 và tài liệu [2]). Cột 7 của bảng 8 là liều tính theo mg/m^2 của một số thuốc chữa ung thư. Trị số ở mỗi hàng là trị số ở cột 6 cùng hàng chia cho 1,5.

Các liều ghi ở cột 5, 6 và 7 là liều đầu tiên để thử nghiệm trên người. Có nhiều nhà nghiên cứu thận trọng hơn, lần đầu tiên chỉ dùng liều bằng nửa liều có hiệu quả tương đương, rồi sau đó, nếu chưa có tác dụng và chưa có độc, mới tăng liều lên dần cho đến liều an toàn và có tác dụng ở người.

VI. TRƯỜNG HỢP XÁC ĐỊNH ĐỘC TÍNH CẤP, NHƯNG KHÔNG TÌM ĐƯỢC LD_{50}

Trong tài liệu [1] đã ghi rõ, có những nghiên cứu độc tính cấp, nhưng lại không xác định được LD_{50} . Có thể gặp hai trường hợp:

1. Đã thử đến liều có động vật thí nghiệm chết, nhưng không có liều nào đạt mức độ chết 100% hoặc gần 100%. Khi đó, tuy không xác định được LD_{50} , nhưng ta vẫn xác định được liều tối đa mà không có con vật nào chết, gọi là liều dưới liều chết (infralethal dose) và được ký hiệu là liều LD_0 .

Trong nghiên cứu, để xác định LD_{50} thì thông thường LD_{50} gấp 2 - 3 lần LD_0 . Vì vậy, liều tương đối an toàn D_s dùng cho thực nghiệm được lý ban đầu được lấy giá trị $1/5 LD_0$ (nếu xác định được LD_{50} thì liều D_s bằng $1/10 LD_{50}$). Sau đó vẫn tiến hành như đã mô tả theo các bước ở trên.

2. Trường hợp tất cả các liều đã thử đều không có con vật nào chết, thì liều lớn nhất đã thử $D_{\max}$ chưa chắc là liều LD_{50} , và liều tương đối an toàn D_s dùng cho thực nghiệm dược lý ban đầu có thể dùng bằng $1/5 D_{\max}$ hoặc lớn hơn $1/5 D_{\max}$ là tùy theo kinh nghiệm của nhà nghiên cứu dược lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Đỗ Trung Đàm* (1996). Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc, NXB Y học, Hà Nội.
2. *Đỗ Trung Đàm* (2001). Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm. Tạp chí Dược học, số 2 và 3.

CHƯƠNG 29

CÁCH XÁC ĐỊNH LIỀU ED_{50}

PGS.TSKH. Đỗ Trung Đàm

I. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Thế nào là liều ED_{50}

Một chất S, nếu không có một tác dụng E nào đó, thì dù dùng với bất cứ liều nào cũng không có tác dụng đó hoặc không có hiệu quả đó. Còn nếu dùng liều quá cao, con vật có thể bị ngộ độc hoặc bị chết. Như vậy, không thể xác định được liều có hiệu quả của chất S đó, hay nói một cách khác là chất S không có hiệu quả hoặc không có tác dụng mà ta định nghiên cứu.

Một thuốc D, nếu có tác dụng, ví dụ tác dụng hạ sốt, tác dụng hạ huyết áp, tác dụng cường tim, tác dụng giảm đau..., thông thường, nếu dùng liều rất thấp, thì cũng không có tác dụng. Tăng liều lên dần, thì đến một liều nào đó, sẽ có con vật thể hiện được tác dụng. **Liều lớn nhất** của một thuốc không gây tác dụng trong thí nghiệm ở một loài động vật nào đó, người ta quy ước gọi là ED_0 . Nếu tăng liều thêm thì số con vật thể hiện tác dụng cũng tăng. Đến một liều nào đó, thì 100% con vật đều thể hiện tác dụng. **Liều thấp nhất**, gây ra tác dụng hoặc gây ra hiệu quả ở tất cả các con vật thí nghiệm gọi là ED_{100} . Tuy nhiên cũng có một số thuốc khi tăng liều lên, số con vật thể hiện tác dụng vẫn không được 100%, nhưng nếu tăng liều hơn nữa lại gây độc, thậm chí gây chết động vật thí nghiệm. Đó thường là những thuốc mà liều có hiệu quả (hoặc liều có tác dụng) gần với liều độc và liều chết.

Người ta quy ước gọi ED_{50} là liều có hiệu quả (effective dose) ở 50% con vật thí nghiệm.

1.2. Như thế nào gọi là có hiệu quả (hoặc có tác dụng)

Để xác định được liều ED_{50} , trong mỗi trường hợp, phải quy định như thế nào là có hiệu quả. Trong thí nghiệm hạ sốt chẳng hạn, ta quy định, ví dụ, nhiệt độ cơ thể

giảm $0,8^{\circ}\text{C}$ trở lên là có hiệu quả, thì những con vật thí nghiệm mà nhiệt độ giảm dưới $0,8^{\circ}\text{C}$ được coi là không có tác dụng hoặc không có hiệu quả. Trong trường hợp thí nghiệm nghiên cứu tác dụng hạ huyết áp chẳng hạn, nếu quy định huyết áp hạ 20 mm Hg trở lên mới coi là có hiệu quả (có tác dụng), thì những trường hợp thí nghiệm, huyết áp giảm dưới 20 mm Hg được coi là không có hiệu quả (không có tác dụng).

1.3. Nguyên tắc xác định ED_{50}

- Xác định ED_{50} là tìm liều có hiệu quả ở 50% số con vật thí nghiệm.
- Các con vật được chia thành nhiều lô tương tự nhau.
- Mỗi lô dùng một liều tính theo kg thể trọng. Các lô khác nhau dùng liều khác nhau chất định nghiên cứu.
- Đánh giá theo nguyên tắc "có hoặc không" (có hiệu quả hoặc không có hiệu quả) ở mỗi lô.

1.4. Số lượng con vật cho mỗi lô

Số lượng tối thiểu các thí nghiệm cho mỗi lô vẫn chưa thống nhất. Theo chúng tôi, số lượng tối thiểu các thí nghiệm cho mỗi lô là 6. Tất nhiên, số thí nghiệm cho mỗi lô càng nhiều thì thí nghiệm càng chính xác. Số thí nghiệm ở mỗi lô nên bằng nhau, nhưng cũng có thể không bằng nhau.

1.5. Số lô thí nghiệm

Số lô thí nghiệm ít nhất là 4, trong đó có một lô dùng liều ED_0 và một lô dùng liều ED_{100} . Giữa 2 lô trên, phải có ít nhất 2 lô nữa, dùng 2 liều khác nhau trong khoảng ED_0 và ED_{100} . Trường hợp không xác định được liều ED_{100} thì có thể dùng liều có hiệu quả từ 70% trở lên cũng được.

1.6. Bước nhảy liều

Bước nhảy liều (khoảng cách giữa 2 liều kế tiếp nhau) thường dùng hơn kém nhau 1,5 lần. Liều lớn bằng khoảng 1,5 lần liều nhỏ kế sát, hoặc liều nhỏ bằng khoảng 70% liều lớn kế sát.

1.7. Thăm dò liều ban đầu

Đây là bước rất quan trọng, cũng như trường hợp thăm dò liều khi xác định độc tính cấp. Nếu không thăm dò mà làm ngay, thì dễ xảy ra 3 - 4 lô thí nghiệm đều có tác dụng 100% hoặc đều không có tác dụng. Như vậy, rất tốn kém mà vẫn không thu được kết quả.

Để thăm dò, dùng 2 thí nghiệm với một liều lượng nào đó. Nếu kết quả cả 2 thí nghiệm đều có tác dụng, thì thăm dò 2 thí nghiệm khác với liều giảm đi 2 lần (liều bằng nửa liều lần trước). Nếu cả 2 thí nghiệm đều không có tác dụng, thì thăm dò 2 thí nghiệm khác với liều gấp đôi.

Thăm dò như vậy, cho đến khi thấy một liều làm một thí nghiệm có tác dụng và một thí nghiệm không có tác dụng, thì lấy liều đó làm liều cơ sở, rồi dùng một số liều lớn hơn theo cấp số nhân, có công bội 1,5; cho đến một liều gây tác dụng ở tất cả các thí nghiệm (ED_{100}) hoặc bắt đầu gây độc cho con vật. Đồng thời, dùng một số liều nhỏ hơn theo cấp số nhân có công bội là khoảng 0,7 (liều nhỏ bằng khoảng 70% liều lớn kế sát), cho đến một liều mà tất cả các con vật đều không có tác dụng (ED_0).

Cũng có trường hợp dùng một liều cho 2 thí nghiệm thấy đều có tác dụng, khi giảm liều đi còn một nửa, cả 2 thí nghiệm lại đều không có tác dụng. Trong trường hợp này, ta lấy liều có tác dụng làm liều cơ sở, rồi tiến hành như trên.

II. CÁCH XÁC ĐỊNH ED_{50}

Ta lấy 2 ví dụ.

2.1. Ví dụ 1. Xác định ED_{50} về tác dụng chống loạn nhịp tim của propranolol tiêm tĩnh mạch trên mô hình gây loạn nhịp tim bằng $BaCl_2$ ở thỏ

2.1.1. Mô hình thực nghiệm

Trong thí nghiệm này, gây loạn nhịp tim cho thỏ bằng dung dịch $BaCl_2$ 2% tiêm tĩnh mạch vành tại liều 4 mg/kg thì sau 10 giây đến 1 phút, loạn nhịp tim sẽ xuất hiện và kéo dài trung bình 26 phút. Sau khi tiêm $BaCl_2$ được 2 phút, nếu tiêm tĩnh mạch propranolol, loạn nhịp tim sẽ giảm hoặc mất đi, vì propranolol là thuốc chống loạn nhịp tim.

Tùy theo liều propranolol, loạn nhịp tim có thể không bị ảnh hưởng, có thể giảm, có thể mất đi trong một thời gian, có thể mất hoàn toàn hoặc nếu dùng liều quá lớn có thể gây độc và chết động vật thí nghiệm. Sở dĩ có trường hợp sau khi tiêm propranolol, loạn nhịp tim mất đi được mấy phút, rồi loạn nhịp tim lại trở lại, vì propranolol làm mất loạn nhịp tim, nhưng do ta dùng liều thấp, nên tác dụng làm mất loạn nhịp tim của propranolol chỉ kéo dài được mấy phút, sau đó không còn có tác dụng nữa, trong khi tác dụng gây loạn nhịp tim của $BaCl_2$ vẫn còn, do đó loạn nhịp tim lại xuất hiện trở lại.

2.1.2. Quy định như thế nào là propranolol có tác dụng chống loạn nhịp tim

Ta có thể quy định, chỉ những trường hợp mất loạn nhịp tim hoàn toàn mới được coi như có tác dụng chống loạn nhịp tim. Nhưng như vậy, ta phải dùng liều khá cao và không phù hợp với thực tế, vì ở đây ta chỉ dùng thuốc một lần, trong khi trong điều trị, ta phải dùng thuốc nhiều lần trong ngày và phải dùng nhiều ngày. Vì vậy, ở đây, ta quy định là sau khi dùng propranolol, nếu loạn nhịp tim mất đi trong thời gian 2 phút trở lên, thì coi như thí nghiệm có tác dụng.

2.1.3. Thăm dò liều ban đầu

Trong thí nghiệm này, ví dụ, lần đầu tiên, ta thử 2 thí nghiệm trên thỏ với liều propranolol là 0,5 mg/kg đều không thấy có tác dụng. Ta tăng liều lên gấp đôi, dùng liều 1 mg/kg cho 2 thí nghiệm, cũng đều không có tác dụng. Tiếp đó, ta lại dùng liều gấp đôi nữa là 2 mg/kg cho 2 thí nghiệm, thấy 1 thí nghiệm không có tác dụng và 1 thí nghiệm ức chế được loạn nhịp tim 3 phút chẳng hạn. Theo quy định ở trên, thì nếu thuốc làm mất loạn nhịp tim được 2 phút trở lên là có tác dụng. Như vậy, liều 2 mg/kg cho kết quả là 1 thí nghiệm có tác dụng, 1 thí nghiệm không có tác dụng, nên ta lấy liều 2 mg/kg làm cơ sở, rồi tiến hành 8 thí nghiệm, thấy 5 có tác dụng chẳng hạn. Ghi kết quả vào bảng 1.

Tiếp đó, dùng liều gấp 1,5 lần liều 2 mg/kg tức là liều 3 mg/kg, thử trên 8 thí nghiệm, ta được 7 thí nghiệm có tác dụng. Tăng liều lên gấp 1,5 lần nữa, ta được liều 4,5 mg/kg, cũng thử trên 8 thí nghiệm. Thấy cả 8 thí nghiệm đều có tác dụng, ta có $ED_{100} = 4,5$ mg/kg. Do đó, không cần phải thí nghiệm với liều tăng thêm hơn nữa. Ghi các kết quả vào bảng 1.

Sau đó, cũng vẫn lấy liều 2 mg/kg làm cơ sở, dùng liều thấp bằng 70% liều này, tức là liều 1,4 mg/kg, thử với 8 thí nghiệm, thấy 3 trường hợp có tác dụng. Giảm liều tiếp nữa, ta được liều 0,98 mg/kg ($1,4 \times 70\%$), ta quy tròn, dùng liều 1 mg/kg, thử trên 8 thí nghiệm, thấy tất cả các thí nghiệm đều không có tác dụng, nên $ED_0 = 1$ mg/kg. Ghi các kết quả thu được vào bảng 1. Như vậy, ta có bảng 1 như sau:

Bảng 1. Tác dụng chống loạn nhịp tim của propranolol trên loạn nhịp tim do $BaCl_2$ ở thỏ

Lô	Liều propranolol (mg/kg)	Số thí nghiệm đã tiến hành	Số thí nghiệm có tác dụng
1	1	8	0
2	1,4	8	3
3	2	8	5
4	3	8	7
5	4,5	8	8

2.1.4. Tính ED_{50}

Sau khi đã có bảng trên, ta dễ dàng tính ED_{50} theo các cách tính khác nhau, như phương pháp Behrens, phương pháp Spearman-Kärber, phương pháp Behrens-Kärber, phương pháp Reed-Muench, phương pháp Bliss, phương pháp Miller-Tainter, phương pháp Thompson, phương pháp Lipschich, phương pháp Litchfield-Wilcoxon, phương pháp Perchin, phương pháp Behrens-Schlosser, giống hệt như cách tính LD_{50} (xem sách "Đỗ Trung Đàm, 1996". Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc, Nxb Y học).

Sau đây, xin trình bày một cách tính ED_{50} mà theo chúng tôi là đơn giản nhất, đó là phương pháp Behrens-Kärber. Ở đây, chúng tôi chỉ tính trị số của ED_{50} , chứ không tính sai số chuẩn của ED_{50} . Theo phương pháp Behrens-Kärber, ta lập bảng 2 như sau:

Bảng 2. Tính ED_{50} của propranolol theo phương pháp Behrens-Kärber

Lô	Liều (mg/kg)	Số thí nghiệm (n)	Số có tác dụng	Hiệu 2 liều kế tiếp (d)	Số trung bình có tác dụng ở 2 liều kế tiếp (a)	Tích số ad
1	1	8	0	-	-	-
2	1,4	8	3	0,4	1,5	0,6
3	2	8	5	0,6	4	2,4
4	3	8	7	1	6	6
5	4,5	8	8	1,5	7,5	11,25

$$\Sigma ad = 20,25$$

ED_{50} được tính theo công thức sau:

$$ED_{50} = ED_{100} = - \frac{\Sigma ad}{n}$$

$$ED_{50} = 4,5 - 2,53 = 1,97 \text{ mg/kg}$$

2.1.5. Kết luận

Vậy, liều có hiệu quả chống loạn nhịp tim 50% của propranolol trên mô hình gây loạn nhịp tim bằng $BaCl_2$ ở thỏ là $ED_{50} = 1,97 \text{ mg/kg}$.

2.2. Ví dụ 2: Xác định ED_{50} tác dụng hạ glucose huyết của glibenclamid trên mô hình gây tăng glucose huyết bằng alloxan ở chuột cống trắng

2.2.1. Mô hình thực nghiệm

Dùng chuột cống trắng khỏe mạnh, không phân biệt đực cái, cân nặng 130 - 200g. Gây tăng glucose huyết bằng cách tiêm trong màng bụng dung dịch alloxan monohydrat 10%, pha trong nước muối sinh lý, liều 150 mg/kg. Sau 7 ngày, glucose huyết tăng lên từ khoảng 4,3 mmol/lít (77,4 mg/dl) là trạng thái glucose huyết bình thường, lên 11,0 mmol/lít (198 mmol/dl) hoặc hơn. Dùng glibenclamid thì glucose huyết sẽ giảm vì glibenclamid là thuốc làm hạ glucose huyết. Tùy theo liều glibenclamid, glucose huyết ở chuột cống trắng có thể không bị ảnh hưởng, có thể giảm ít hoặc nhiều; còn nếu dùng liều quá cao sẽ gây tụt glucose huyết có thể dẫn đến chết.

2.2.2. Quy định thế nào là glibenclamid có tác dụng hạ glucose huyết

Tùy theo người nghiên cứu, có thể quy định glucose huyết hạ 1,0 mmol/lít (18 mg/dl) là có tác dụng; nhưng cũng có thể quy định glucose huyết phải hạ 1,5 hoặc 2,0 mmol/lít mới có hiệu quả tác dụng. Tuy nhiên, điều này phải xuất phát từ thực tế. Nếu tính trung bình khi glucose huyết hạ 1,0 mmol/lít, nhưng sự hạ đó đã có ý nghĩa thống kê, thì nên quy định hạ 1,0 mmol/lít là có hiệu quả. Nếu quy định hạ 1,5 hoặc 2,0 mmol/lít mới có hiệu quả, sẽ rất khó đạt đến mức có hiệu quả 100% (ED_{100}).

Trong mô hình này, khi glucose huyết hạ 1,0 mmol/lít (18 mg/dl), ta có thể coi như thuốc có hiệu quả, vì alloxan gây tăng glucose huyết rất mạnh, và vì thuốc hạ glucose huyết phải dùng nhiều ngày, trong khi ở đây, ta dùng có 1 lần. Mặt khác, thực tế, nếu thử một liều nào đó trên nhiều con chuột, glucose huyết trung bình hạ được 1,0 mmol/lít (18 mmol/dl), thì so với trước khi dùng thuốc, nếu tính toán, sẽ thấy sự khác nhau có ý nghĩa thống kê.

Tóm lại, trong thí nghiệm này, ta quy định là sau khi tiêm alloxan được 7 ngày, ta định lượng glucose huyết, rồi dùng glibenclamid, và sau khi dùng glibenclamid được 2 giờ, ta lại lấy máu định lượng glucose huyết. Nếu glucose huyết sau khi dùng glibenclamid hạ được từ 1,0 mmol/lít (18 mg/dl) trở lên, thì coi như trong thí nghiệm, thuốc có hiệu quả tác dụng.

2.2.3. Thăm dò liều ban đầu

Ví dụ, lần thứ nhất, ta dùng glibenclamid cho 2 thí nghiệm với liều 25 mg/kg, thấy cả 2 thí nghiệm, glucose huyết đều giảm hơn 1,0 mmol/lít. Ta phải thăm dò lần 2 với 2 thí nghiệm, dùng liều bằng một nửa, tức là 12,5 mg/kg, lại thấy cả 2 thí nghiệm, glucose huyết đều giảm lớn hơn 1,0 mmol/lít. Tiếp tục giảm liều xuống còn

2.2. Ví dụ 2: Xác định ED_{50} tác dụng hạ glucose huyết của glibenclamid trên mô hình gây tăng glucose huyết bằng alloxan ở chuột cống trắng

2.2.1. Mô hình thực nghiệm

Dùng chuột cống trắng khỏe mạnh, không phân biệt đực cái, cân nặng 130 - 200g. Gây tăng glucose huyết bằng cách tiêm trong màng bụng dung dịch alloxan monohydrat 10%, pha trong nước muối sinh lý, liều 150 mg/kg. Sau 7 ngày, glucose huyết tăng lên từ khoảng 4,3 mmol/lít (77,4 mg/dl) là trạng thái glucose huyết bình thường, lên 11,0 mmol/lít (198 mmol/dl) hoặc hơn. Dùng glibenclamid thì glucose huyết sẽ giảm vì glibenclamid là thuốc làm hạ glucose huyết. Tùy theo liều glibenclamid, glucose huyết ở chuột cống trắng có thể không bị ảnh hưởng, có thể giảm ít hoặc nhiều; còn nếu dùng liều quá cao sẽ gây tụt glucose huyết có thể dẫn đến chết.

2.2.2. Quy định thế nào là glibenclamid có tác dụng hạ glucose huyết

Tùy theo người nghiên cứu, có thể quy định glucose huyết hạ 1,0 mmol/lít (18 mg/dl) là có tác dụng; nhưng cũng có thể quy định glucose huyết phải hạ 1,5 hoặc 2,0 mmol/lít mới có hiệu quả tác dụng. Tuy nhiên, điều này phải xuất phát từ thực tế. Nếu tính trung bình khi glucose huyết hạ 1,0 mmol/lít, nhưng sự hạ đó đã có ý nghĩa thống kê, thì nên quy định hạ 1,0 mmol/lít là có hiệu quả. Nếu quy định hạ 1,5 hoặc 2,0 mmol/lít mới có hiệu quả, sẽ rất khó đạt đến mức có hiệu quả 100% (ED_{100}).

Trong mô hình này, khi glucose huyết hạ 1,0 mmol/lít (18 mg/dl), ta có thể coi như thuốc có hiệu quả, vì alloxan gây tăng glucose huyết rất mạnh, và vì thuốc hạ glucose huyết phải dùng nhiều ngày, trong khi ở đây, ta dùng có 1 lần. Mặt khác, thực tế, nếu thử một liều nào đó trên nhiều con chuột, glucose huyết trung bình hạ được 1,0 mmol/lít (18 mmol/dl), thì so với trước khi dùng thuốc, nếu tính toán, sẽ thấy sự khác nhau có ý nghĩa thống kê.

Tóm lại, trong thí nghiệm này, ta quy định là sau khi tiêm alloxan được 7 ngày, ta định lượng glucose huyết, rồi dùng glibenclamid, và sau khi dùng glibenclamid được 2 giờ, ta lại lấy máu định lượng glucose huyết. Nếu glucose huyết sau khi dùng glibenclamid hạ được từ 1,0 mmol/lít (18 mg/dl) trở lên, thì coi như trong thí nghiệm, thuốc có hiệu quả tác dụng.

2.2.3. Thăm dò liều ban đầu

Ví dụ, lần thứ nhất, ta dùng glibenclamid cho 2 thí nghiệm với liều 25 mg/kg, thấy cả 2 thí nghiệm, glucose huyết đều giảm hơn 1,0 mmol/lít. Ta phải thăm dò lần 2 với 2 thí nghiệm, dùng liều bằng một nửa, tức là 12,5 mg/kg, lại thấy cả 2 thí nghiệm, glucose huyết đều giảm lớn hơn 1,0 mmol/lít. Tiếp tục giảm liều xuống còn

2.1.4. Tính ED_{50}

Sau khi đã có bảng trên, ta dễ dàng tính ED_{50} theo các cách tính khác nhau, như phương pháp Behrens, phương pháp Spearman-Kärber, phương pháp Behrens-Kärber, phương pháp Reed-Muench, phương pháp Bliss, phương pháp Miller-Tainter, phương pháp Thompson, phương pháp Lipschich, phương pháp Litchfield-Wilcoxon, phương pháp Perchin, phương pháp Behrens-Schlosser, giống hệt như cách tính LD_{50} (xem sách "Đỗ Trung Đàm, 1996". Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc, Nxb Y học).

Sau đây, xin trình bày một cách tính ED_{50} mà theo chúng tôi là đơn giản nhất, đó là phương pháp Behrens-Kärber. Ở đây, chúng tôi chỉ tính trị số của ED_{50} , chứ không tính sai số chuẩn của ED_{50} . Theo phương pháp Behrens-Kärber, ta lập bảng 2 như sau:

Bảng 2. Tính ED_{50} của propranolol theo phương pháp Behrens-Kärber

Lô	Liều (mg/kg)	Số thí nghiệm (n)	Số có tác dụng	Hiệu 2 liều kế tiếp (d)	Số trung bình có tác dụng ở 2 liều kế tiếp (a)	Tích số ad
1	1	8	0	-	-	-
2	1,4	8	3	0,4	1,5	0,6
3	2	8	5	0,6	4	2,4
4	3	8	7	1	6	6
5	4,5	8	8	1,5	7,5	11,25

$$\Sigma ad = 20,25$$

ED_{50} được tính theo công thức sau:

$$ED_{50} = ED_{100} - \frac{\sum ad}{n}$$

$$ED_{50} = 4,5 - 2,53 = 1,97 \text{ mg/kg}$$

2.1.5. Kết luận

Vậy, liều có hiệu quả chống loạn nhịp tim 50% của propranolol trên mô hình gây loạn nhịp tim bằng $BaCl_2$ ở thỏ là $ED_{50} = 1,97 \text{ mg/kg}$.

một nửa, tức là 6,25 mg/kg, ta lấy tròn là 6 mg/kg cho 2 thí nghiệm, thấy kết quả như sau:

– Trong thí nghiệm thứ nhất, glucose huyết 7 ngày sau alloxan là 13,32 mmol/lít, và glucose huyết 2 giờ sau glibenclamid là 11,77 mmol/lít. Tính ra, glucose huyết giảm 1,55 mmol/lít. Do đó, trong thí nghiệm này, glibenclamid có hiệu quả tác dụng.

– Trong thí nghiệm thứ 2, glucose huyết 7 ngày sau alloxan là 12,05 mmol/lít, và glucose huyết 2 giờ sau glibenclamid là 11,07 mmol/lít. Tính ra, glucose huyết hạ 0,98 mmol/lít, thấp hơn quy định 0,02 mmol/lít. Do đó, trong thí nghiệm này, glibenclamid không có hiệu quả tác dụng.

Như vậy, thử với liều 6 mg/kg cho 2 thí nghiệm, thấy 1 thí nghiệm có hiệu quả và 1 thí nghiệm không có hiệu quả, nên ta lấy liều 6 mg/kg là liều cơ sở.

Liều 6 mg/kg là liều cơ sở, ta đã thử được 2 thí nghiệm. Ta thử thêm với liều này 4 thí nghiệm nữa, thấy có 3 thí nghiệm có tác dụng và 1 thí nghiệm không có tác dụng. Như vậy, với liều 6 mg/kg, thử 6 thí nghiệm, có 4 thí nghiệm có hiệu quả tác dụng. Ghi kết quả vào bảng 3.

Tăng liều lên 1,5 lần thành 9 mg/kg, thử 6 thí nghiệm, thấy 5 thí nghiệm có hiệu quả tác dụng. Tăng tiếp liều lên 1,5 lần nữa, ta được liều 13,5 mg/kg, thử 6 thí nghiệm, thấy cả 6 thí nghiệm đều có hiệu quả tác dụng. Ta có $ED_{100} = 13,5$ mg/kg. Ghi kết quả vào bảng 3.

Tiếp đó, cũng lấy liều 6 mg/kg làm liều cơ sở, dùng liều thấp bằng 70%, ta được liều 4,2 mg/kg, thử 6 thí nghiệm, thấy 2 thí nghiệm có hiệu quả tác dụng. Giảm tiếp liều còn bằng 70%, ta được liều 2,98 mg/kg, lấy tròn là 3 mg/kg, thử 6 thí nghiệm, thấy không có thí nghiệm nào có hiệu quả tác dụng. Ta có liều $ED_0 = 3$ mg/kg. Ghi các kết quả thu được vào bảng 3.

Từ các kết quả thu được trong thực nghiệm, ta có bảng 3 như sau:

Bảng 3. Tác dụng hạ glucose huyết của glibenclamid trên tăng glucose huyết do alloxan ở chuột cống trắng

Lô	Liều glibenclamid (mg/kg)	Số thí nghiệm đã tiến hành	Số thí nghiệm có tác dụng
1	3	6	0
2	4,2	6	2
3	6	6	4
4	9	6	5
5	13,5	6	6

2.2.4. Tính ED_{50}

Như trên đã trình bày, có nhiều cách tính ED_{50} . Chúng tôi xin trình bày ở đây cách tính mà chúng tôi cho là đơn giản nhất. Đó là phương pháp Behrens-Karber. Vì ở đây, chỉ có ý định tính trị số của ED_{50} chứ không tính sai số chuẩn của ED_{50} , nên ta lập bảng 4 như sau:

Bảng 4. Tính ED_{50} của glibenclamid theo phương pháp Behrens-Karber

Lô	Liều (mg/kg)	Số thí nghiệm (n)	Số có tác dụng	Hiệu 2 liều kế tiếp (d)	Số trung bình có tác dụng ở 2 liều kế tiếp (a)	Tích số ad
1	3	6	0	-	-	-
2	4,2	6	2	1,2	1	1,2
3	6	6	4	1,8	3	5,4
4	9	6	5	3	4,5	13,5
5	13,5	6	6	4,5	5,5	24,75

$$\Sigma ad = 44,85$$

ED_{50} được tính theo công thức sau:

$$ED_{50} = ED_{100} - \frac{\Sigma ad}{n}$$

Do đó: $ED_{50} = 13,5 - 7,48 = 6,02 \text{ mg/kg.}$

2.2.5. Kết luận

Liều có hiệu quả hạ glucose huyết 50% của glibenclamid trên mô hình gây tăng glucose huyết bằng alloxan ở chuột cống trắng là $ED_{50} = 6,02 \text{ mg/kg.}$

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đỗ Trung Dàm (1996), Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc, NXB Y học, Hà Nội.

CHƯƠNG 30

**PHƯƠNG PHÁP NGOẠI SUY
LIỀU CÓ HIỆU QUẢ TƯƠNG ĐƯƠNG
GIỮA NGƯỜI VÀ ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM***PGS.TSKH. Đỗ Trung Đàm*

Một thuốc trước khi được sử dụng, phải nghiên cứu trên động vật thí nghiệm, nhưng kết quả lại phải đưa vào sử dụng trên người. Một trong những điều kiện quan trọng là phải xác định liều có tác dụng tối ưu dùng cho người (có hiệu quả nhất, nhưng lại không độc). Vì vậy, phép ngoại suy từ các kết quả thí nghiệm với động vật chuyển sang người có một ý nghĩa rất quan trọng.

Trong nghiên cứu thực nghiệm cũng như trong thực hành, người ta biết rõ liều dùng có hiệu quả trên người bao giờ cũng thấp hơn trên động vật thí nghiệm, nếu tính liều cho 1 kg cân nặng. Những nghiên cứu được lý thực nghiệm cũng cho thấy, thông thường ở những con vật nhỏ, liều có hiệu quả tính theo một đơn vị cân nặng, cao hơn ở những con vật lớn.

Vậy đâu là nguyên nhân của những khác biệt trên? Tìm ra nguyên nhân sẽ giúp ta ngoại suy được liều có hiệu quả tương đương từ động vật thí nghiệm sang người, đồng thời cũng ngoại suy được liều có hiệu quả tương đương từ con vật này sang con vật khác.

I. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN LIỀU CÓ HIỆU QUẢ TƯƠNG ĐƯƠNG GIỮA CÁC LOÀI ĐỘNG VẬT**1.1. Sự chuyển hóa thuốc**

Yếu tố đầu tiên người ta nghĩ đến là sự chuyển hóa thuốc. Thuốc biến hóa càng nhanh thì liều dùng phải càng lớn mới đạt được hiệu quả và đặc biệt là đạt được khoảng thời gian tác dụng có ý nghĩa.

Mối tương quan giữa hiệu quả tác dụng được chứng minh trong thí nghiệm với meperidin. Chế phẩm này là một thuốc giảm đau gây ngủ có hiệu quả ở người, nhưng có hiệu quả kém ở chó, vì thuốc bị chuyển hóa nhanh trong cơ thể chó. Ví dụ, trong cơ thể người, 1 giờ, thuốc bị chuyển hóa 17% liều dùng, còn ở chó là 70%. Chuột nhắt trắng có khối lượng nhỏ hơn, sự biến hóa meperidin còn diễn ra với tốc độ lớn hơn nhiều. Cũng như vậy, phenylbutazon là thuốc biến đổi chậm trong cơ thể người, nhưng chuyển hóa nhanh trong cơ thể thỏ, chuột lang và chó, đặc biệt là chuyển hóa rất mạnh trong cơ thể chuột nhắt trắng.

Thông số phản ánh sự biến đổi của thuốc là nửa đời chuyển hóa (metabolism half-life) của thuốc trong huyết tương. Brodie (1962) đã xác định nửa đời chuyển hóa của thuốc, tức là thời gian cần để thuốc trong huyết tương biến hóa mất đi một nửa của hexobarbital (bảng 1).

Bảng 1. Nửa đời chuyển hóa, thời gian tác dụng và nồng độ gây ngủ của hexobarbital ở các loài động vật khác nhau (theo Brodie, 1962)

Loài động vật	Khối lượng trung bình (kg)	Nửa đời chuyển hóa (phút)	Thời gian tác dụng (phút)	Nồng độ trong máu lúc tỉnh (mg/l)
Chuột nhắt trắng	0,02	19	12	89
Chuột cống trắng	0,2	60	49	64
Thỏ	2	140	90	57
Chó	10	260	315	19
Người	70	360	-	20

Qua bảng 1, ta thấy, nói chung, động vật có khối lượng càng nhỏ, thì nửa đời chuyển hóa càng nhỏ, tức là tốc độ biến hóa thuốc càng lớn.

1.2. Nồng độ tối thiểu có hiệu quả trong huyết tương

Đây cũng là một nguyên nhân rất quan trọng. Chúng ta biết rõ rằng, ở động vật nào mà nồng độ tối thiểu của thuốc có hiệu quả trong huyết tương càng lớn, thì càng phải dùng liều cao hơn mới đạt được nồng độ có hiệu quả đó.

Brodie (1962) đã xác định nồng độ hexobarbital trong huyết tương của con vật lúc bắt đầu tỉnh sau khi ngủ. Nồng độ này, rõ ràng là nồng độ tối thiểu có hiệu quả gây ngủ của hexobarbital trong huyết tương (bảng 1). Bảng 1 cho thấy, ở các con vật nhỏ, nồng độ hexobarbital trong huyết tương lúc con vật bắt đầu tỉnh lớn hơn ở các con vật lớn. Tuy nhiên, ở đây có ngoại lệ là nồng độ hexobarbital lúc tỉnh ở chó lại thấp hơn ở người.

1.3. Thời gian có hiệu quả tác dụng

Thời gian có hiệu quả tác dụng (ví dụ như trường hợp hexobarbital) là thời gian mà con vật ngủ. Thời gian này thường phụ thuộc vào liều dùng. Nếu liều càng cao thì thời gian có hiệu quả tác dụng thường lớn, và nếu quá cao, con vật sẽ chết. Bảng 1 cũng cho ta thấy, với một liều vừa đủ gây ngủ, thì thời gian có hiệu quả tác dụng ở con vật nhỏ ngắn hơn ở con vật lớn.

1.4. Sự hô hấp tế bào

Như trên đã nêu, nói chung, ở những con vật nhỏ, chuyển hóa thuốc thường lớn. Sự chuyển hóa này có liên quan với mức độ trao đổi chất và cũng liên quan đến sự hô hấp của các mô. Kreds (1950) đã xác định hoạt động hô hấp ở một số mô của những động vật khác nhau trong thí nghiệm lát cắt *in vitro* thông qua nhu cầu sử dụng oxy (ml/kg/giờ) tính theo trọng lượng khô của các mô (bảng 2).

Bảng 2. Hoạt động hô hấp ở các mô của các động vật khác nhau trong thí nghiệm trên lát cắt *in vitro* (Kreds, 1950)

Loài động vật	Cân nặng (kg)	Nhu cầu oxy (mg/kg/giờ) theo khối lượng khô				
		Não	Vỏ thượng thận	Gan	Lách	Phổi
Chuột nhắt	0,02	32,9	46,1	23,1	16,9	12,0
Chuột cống	0,21	26,3	38,2	17,2	12,7	8,6
Chuột lang	0,51	27,3	31,8	13,0	11,6	8,5
Thỏ	2,0	28,2	34,5	11,6	14,2	8,0
Mèo	2,7	26,9	22,7	13,2	8,4	3,9
Chó	15,9	21,2	27,0	11,7	6,6	4,9
Cừu	49	19,7	27,5	8,5	6,9	5,4
Bò	420	17,2	23,5	8,2	4,4	4,3
Ngựa	625	15,7	21,7	5,4	4,2	4,4

Qua bảng 2, ta thấy, trừ một số ngoại lệ, còn nói chung, hô hấp tế bào của các mô khác nhau như não, vỏ thượng thận, gan, lách, phổi đều có khuynh hướng giảm đi ở các con vật càng lớn.

Bảng 2 cũng cho thấy, nhu cầu oxy của vỏ thượng thận là cao nhất trong số 5 cơ quan nghiên cứu. Sau đó, đến não, rồi gan, và cuối cùng là lách và phổi.

1.5. Tỷ khối (theo %) của nội tạng so với cơ thể

Khi đánh giá sự hô hấp tế bào đối với chuyển hóa thuốc, nếu chỉ tính cường độ trao đổi chất thông qua nhu cầu oxy của một đơn vị khối lượng nội tạng thì chưa đủ, mà còn phải xét đến tỷ khối nội tạng so với khối lượng cơ thể (bảng 3), vì một loài động vật có cơ quan, ví dụ, gan chẳng hạn, có hoạt động hô hấp cao, cũng tức là có nhu cầu oxy cao tính theo một đơn vị khối lượng của gan, nếu tỷ khối gan, so với cơ thể lại cao, thì hoạt động hô hấp tính theo một đơn vị khối lượng cơ thể sẽ lớn.

Bảng 3. Tỷ khối (theo %) của một số nội tạng so với cơ thể ở một số động vật và người

Loài động vật	Lách	Gan	Thận
Chuột nhắt trắng	0,5	5,5	1,7
Chuột cống trắng	0,3	3,4	1,1
Mèo	0,3	3,6	1,0
Chó	0,25	2,8	0,3
Người	0,2	2,4	0,4

Bảng 3 cũng cho thấy, trừ một vài ngoại lệ, nói chung, động vật càng nhỏ thì tỷ khối của nội tạng so với cân nặng cơ thể càng lớn.

1.6. Sự sinh nhiệt

Nếu xuất phát từ những điều kiện thiết yếu của sự chuyển hóa thì khi xác định liều có hiệu quả tương đương của thuốc đối với các loài động vật khác nhau, rõ ràng là phải tính toán diện các thông số đặc trưng, một mặt là cường độ trao đổi chất liên quan đến tính đặc hiệu của chúng, mặt khác là khối lượng cơ thể.

Trong số những cái chung nhất, chỉ số toàn diện của sự trao đổi chất, trước hết là chuyển hóa cơ bản, được tính theo sự tiêu hao năng lượng trên chức phận sinh lý quan trọng của sự sống và các quá trình hóa sinh trong điều kiện nghỉ hoàn toàn, nhiệt độ thích hợp và không ăn uống gì. Độ lớn của nó phụ thuộc vào tính đặc hiệu của loài, tuổi con vật và liên quan với khối lượng cơ thể.

Nói chung, chuyển hóa cơ bản ở loài có vú tính theo khối lượng cơ thể có thể được biểu thị bằng công thức sau đây của Brodie và Proctor (1932) và của Kleiber (1952):

$$H = aW^{0,73}$$

trong đó: H : sự sinh nhiệt;

W : khối lượng cơ thể;

a : hệ số đặc trưng cho một loài động vật.

Vì số mũ của khối lượng cơ thể nhỏ hơn 1, nên nếu tính trên một đơn vị khối lượng, thì số lượng trao đổi chất (cũng là chuyển hóa cơ bản hoặc sự sinh nhiệt) ở con vật lớn và người thấp hơn, còn con vật nhỏ thì chuyển hóa cơ bản cao hơn.

1.7. Đặc trưng của ty thể

Khi nghiên cứu sự phụ thuộc $H = aW^{0,73}$ về sự sinh nhiệt (cũng là sinh năng lượng tế bào), Smith (1956) đã thấy có sự liên quan giữa khối lượng cơ thể và một số thông số về chức năng và hình thái của ty thể, là bộ phận cấu trúc dưới tế bào, trực tiếp đảm bảo phần năng lượng của cơ thể do sự oxy hóa trong tế bào.

Về vấn đề này, tác giả đã nghiên cứu tổ chức gan của 4 loài động vật là chuột cống trắng, thỏ, cừu và bê (bảng 4), vì gan là cơ quan chủ yếu đảm nhận nhiệm vụ chuyển hóa thuốc.

Bảng 4. Một số đặc trưng ty thể của gan 4 loài động vật (Smith, 1956)

Đặc điểm ty thể	Chuột cống	Thỏ	Cừu	Bê
Khối lượng gan (kg)	0,01	0,064	0,636	6,07
Lượng ty thể trong 1g gan ($\times 10^9$)	89	47	50	38
Tổng số ty thể trong gan ($\times 10^{11}$)	9,4	30	313	2376
Khối lượng 1 ty thể ($\text{mg} \times 10^{-9}$)	3,6	3,9	4,7	5,4
Diện tích mặt ngoài 1 ty thể (μm^2)	10,8	11,8	13,2	14,5
Nhu cầu oxy 1 ty thể ($\text{ml/giờ} \times 10^{-12}$)	19,6	14,7	15,2	15,4

Bảng 4 cho thấy, đối với 4 thông số là khối lượng gan, tổng số ty thể có trong gan, khối lượng 1 ty thể và diện tích mặt ngoài của một ty thể, thì con vật càng to, có trị số càng lớn. Nhưng vì liều lượng thuốc, chúng ta thường tính theo một đơn vị khối lượng cơ thể, nên ở đây, số lượng và kích thước ty thể cũng phải tính theo một đơn vị khối lượng cơ thể của con vật, thì mới phản ánh đúng được sự chuyển hóa thuốc cũng như sự hô hấp tế bào. Đặc biệt ở đây, chúng ta thấy, nếu tính số lượng ty thể trong 1g gan, thì những con vật càng nhỏ, số lượng ty thể càng lớn.

1.8. Cytocrom C

Màng ty thể chứa hệ enzym hô hấp tế bào, đảm bảo cho quá trình oxy hóa. Chính ở màng ty thể, xảy ra phản ứng oxy hóa của chu trình tricarboxylic và oxy hóa acid béo.

Sự phụ thuộc giữa khối lượng cơ thể và tỷ lệ cytocrom C trong một số cơ quan của một số loài động vật đã được Rosenthal và Drabkin xác định từ năm 1943 (bảng 5).

Bảng 5. Nồng độ cytocrom C trong một số mô của một số động vật và người (Rosenthal và Drabkin, 1943)

Tổ chức mô	Loài động vật	Hàm lượng cytocrom C (mg/kg mô khô)
Vỏ thượng thận	Chuột nhắt trắng	1105
	Thỏ	354
	Chó	302
	Người	45
Vỏ đại não	Chuột nhắt trắng	479
	Thỏ	252
Gan	Chuột nhắt trắng	525
	Thỏ	125
	Ngựa	24
Phổi	Thỏ	45
	Người	9

Bảng trên cho thấy, ở cùng một loại cơ quan, con vật càng nhỏ thì hàm lượng cytocrom C càng cao.

Hệ cytocrom chiếm vị trí then chốt trong mạch hô hấp và do đó hoạt động của các enzym này có thể được dùng làm chỉ số đặc trưng cho cường độ của quá trình oxy hóa. Hàm lượng succinat-oxydase và malat-dehydrogenase cũng tăng lên khi chuyển từ loài động vật lớn đến loài động vật nhỏ hơn.

1.9. Khối lượng của thận

Đối với hầu hết các thuốc, con đường thải trừ chủ yếu là qua thận. Thận càng lớn, hoạt động càng mạnh thì tốc độ loại trừ thuốc khỏi cơ thể càng nhanh và hiệu

quả tác dụng của thuốc càng giảm. Do đó, thận cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến liều có hiệu quả tương đương giữa các con vật.

Trong khi nghiên cứu vấn đề này, Adolph (1949) đã xác định rằng, đối với các loại động vật có vú khác nhau, khối lượng thận W_r (r là từ chữ rein tiếng Pháp có nghĩa là thận) là một hàm số của khối lượng cơ thể và được biểu thị bằng công thức cũng giống như công thức xác định sự sinh nhiệt theo khối lượng cơ thể, chỉ khác ở số mũ của W.

$$W_r = a_r \cdot W^{0,85}$$

trong đó: W_r : khối lượng của thận ;

W: khối lượng cơ thể ;

a_r : hệ số của thận đặc trưng cho một loài động vật.

Khi khối lượng cơ thể tăng lên (ở những con vật lớn), ví dụ tăng 10 lần chẳng hạn, thì khối lượng thận cũng tăng, nhưng không tăng được 10 lần (vì số mũ của khối lượng cơ thể nhỏ hơn 1). Do đó, nếu tính tỷ khối của thận so với khối lượng cơ thể, thì ở con vật lớn sẽ giảm đi so với ở con vật nhỏ. Đó là lý do tại sao mà chuyển hóa thuốc ở những con vật nhỏ mạnh hơn (nếu tính theo một đơn vị khối lượng cơ thể), và do đó, liều có hiệu quả tương đương phải lớn hơn.

1.10. Diện tích bề mặt cơ thể

Trên đây là một số yếu tố có ảnh hưởng đến liều có hiệu quả tương đương giữa các loài động vật khác nhau. Tuy nhiên, trong thực tế, mỗi phương pháp đều có những khó khăn nhất định trong việc áp dụng. Vì thế, người ta đã áp dụng một phương pháp tiện lợi hơn là tính liều có hiệu quả tương đương dựa vào diện tích bề mặt cơ thể của các loài động vật khác nhau.

Diện tích bề mặt cơ thể ở động vật có vú có liên quan chặt chẽ với chuyển hóa cơ bản. Trong khi việc hình thành năng lượng tính theo 1 kg khối lượng ở các động vật có vú có độ lớn khác nhau, thì sự sinh nhiệt tính theo một đơn vị diện tích bề mặt cơ thể lại cho kết quả khá giống nhau đối với những động vật khác nhau. Nói cách khác, diện tích bề mặt cơ thể và sự sinh nhiệt của cơ thể là hàm số của nhau đối với khối lượng cơ thể và không phụ thuộc vào loài động vật. Sự sinh nhiệt này phản ánh sự trao đổi chất, sự hô hấp tế bào và cũng phản ánh sự chuyển hóa thuốc, nên liều có hiệu quả tương đương của thuốc tính theo diện tích bề mặt cơ thể có mối tương quan về lượng tương tự nhau và thực tế là đồng nhất không chỉ với các loài động vật khác nhau, mà cả cho người nữa (Berger, 1949; Noordwijk, 1964).

Berger (1949) đã làm thí nghiệm về tác dụng giãn cơ của mephenesin trên 4 loài động vật và trên người. Xác định liều có hiệu quả tác dụng tương đương làm liệt cơ vân hoàn toàn, ông thấy ở chuột nhắt trắng là 200 mg/kg, ở chuột cống trắng là 110 mg/kg, ở thỏ là 50 mg/kg; ở chó là 30 mg/kg và ở người là 17 mg/kg. Như vậy, liều có hiệu quả tác dụng tương đương của mephenesin ở các con vật khác nhau và ở người, nếu tính theo một đơn vị khối lượng cơ thể, thì rất khác nhau.

Ông đã tiến hành cân khối lượng cơ thể và đo diện tích bề mặt cơ thể của từng loài động vật và người, rồi từ đó, xác định liều có hiệu quả tác dụng tương đương tính theo 1 đơn vị diện tích bề mặt cơ thể và đã thu được kết quả trong bảng 6.

Bảng 6. Liều có hiệu quả tương đương của mephenesin đối với một số loài động vật và người (Berger, 1949)

Chỉ số	Chuột nhắt trắng	Chuột cống trắng	Thỏ	Chó	Người
Liều có hiệu quả tương đương tính theo 1 đơn vị khối lượng cơ thể (mg/kg)	200	110	50	30	17
Khối lượng cơ thể (kg)	0,02	0,20	2,0	10,0	60
Diện tích cơ thể (cm ²)	66	336	1600	4670	16000
Liều có hiệu quả tương đương tính theo 1 đơn vị diện tích cơ thể (mg/cm ²)	0,061	0,065	0,062	0,064	0,064

Bảng 6 cho thấy, nếu liều lượng được biểu thị theo 1 kg khối lượng cơ thể thì liều có hiệu quả tương đương tính từ con vật nhỏ đến lớn và rồi đến người giảm đi (con vật càng lớn thì liều có hiệu quả tương đương càng nhỏ). Ví dụ, ở chuột nhắt trắng, liều mephenesin có hiệu quả tương đương, nếu tính theo 1 kg khối lượng cơ thể, gấp gần 12 lần liều ở người. Tuy nhiên, nếu tính liều lượng theo 1 đơn vị diện tích bề mặt cơ thể, thì liều có hiệu quả tương đương của mephenesin ở chuột nhắt trắng có độ lớn xấp xỉ và thực tế giống như ở người. Lumb (1964) cũng thu được những kết quả tương tự đối với 3 loại thuốc giãn cơ khác là d-tubocurarin, succinylcholin và galanin.

II. NGOẠI SUY LIẾU CÓ HIỆU QUẢ TƯƠNG ĐƯƠNG GIỮA NGƯỜI VÀ ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM

Dựa vào bảng 6 và nhiều thực nghiệm khác, ta có thể ngoại suy liều có hiệu quả tương đương từ một loài động vật này sang loài động vật khác hoặc sang người và ngược lại theo bảng 7.

Bảng 7. Hệ số ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa các loài động vật và người

Từ \ Sang	Chuột nhắt trắng	Chuột cống trắng	Thỏ	Chó	Người
Chuột nhắt trắng	1	0,55	0,25	0,15	0,085
Chuột cống trắng	1,82	1	0,45	0,27	0,15
Thỏ	4	2,20	1	0,60	0,34
Chó	6,67	3,67	1,67	1	0,57
Người	11,76	6,47	2,94	1,76	1

Áp dụng 1. Liều có hiệu quả (ví dụ có tác dụng hạ sốt) của thuốc A ở chuột cống trắng là 15 mg/kg. Tính liều có hiệu quả tương đương của thuốc A ở người?

Ta lấy ở cột bên trái, hàng chuột cống trắng, đối chiếu sang người, ta được hệ số 0,15. Vậy liều có hiệu quả hạ sốt tương đương của thuốc này ở người là:

$$15 \text{ mg/kg} \times 0,15 = 2,25 \text{ mg/kg}$$

Nếu người nặng 60 kg thì liều dùng cần để hạ sốt là:

$$2,25 \text{ mg/kg} \times 60 \text{ kg} = 135 \text{ mg}$$

Áp dụng 2: Liều dùng có hiệu quả (ví dụ có tác dụng giảm đau) của thuốc B (ví dụ analgin) ở người là 500 mg. Tính liều có hiệu quả tương đương của thuốc B ở chuột nhắt trắng? (Ví dụ khi nghiên cứu một thuốc xem có tác dụng giảm đau hay không và muốn dùng analgin làm thuốc tham chiếu để so sánh với thuốc nghiên cứu, thì phải tính xem dùng liều analgin là bao nhiêu cho nghiên cứu thực nghiệm ở động vật).

Liều dùng có hiệu quả giảm đau của thuốc B ở người là 500 mg. Ta coi như người cân nặng là 50 kg, thì liều dùng có hiệu quả giảm đau ở người tính cho 1 kg cân nặng là 10 mg/kg.

Trên bảng 7, ở cột bên trái ta lấy hàng người (hàng dưới cùng), đối chiếu sang chuột nhắt trắng, ta được hệ số 11,76. Vậy liều có hiệu quả giảm đau tương đương ở chuột nhắt trắng của thuốc B là:

$$10 \text{ mg/kg} \times 11,76 = 117,6 \text{ mg/kg}$$

Nếu chuột nhắt trắng cân nặng 20 g, thì liều dùng cho một con chuột là:

$$\frac{117,6 \text{ mg/kg} \times 20}{1000} = 2,352 \text{ mg}$$

Để cho gọn, người ta thường áp dụng các hệ số ngoại suy như ở bảng 8.

Bảng 8. Hệ số rút gọn liều có hiệu quả tương đương giữa người và một số loài động vật

Từ \ Sang	Chuột nhắt trắng	Chuột cống trắng	Thỏ	Chó	Người
Chuột nhắt trắng	1	1/2	1/4	1/6	1/12
Chuột cống trắng	2	1	1/2	1/4	1/7
Thỏ	4	2	1	3/5	1/3
Chó	7	4	5/3	1	1/2
Người	12	7	3	2	1

Trên thực tế, các hệ số ngoại suy của thỏ có thể áp dụng cho khỉ, vì chúng có kích thước tương tự nhau (xem bảng 9).

Sau đây là một số số liệu trung bình về khối lượng cơ thể cân được và diện tích bề mặt cơ thể đo được của một số động vật thí nghiệm và người để chúng ta tham khảo (bảng 9).

Bảng 9. Khối lượng và diện tích cơ thể của một số động vật và người

Loài động vật	Khối lượng cơ thể (kg)	Diện tích cơ thể (cm²)
Chuột nhắt trắng	0,018	60
Chuột nhắt trắng	0,020	66
Chuột cống trắng	0,150	250
Chuột cống trắng	0,200	336
Thỏ	2,0	1600

Bảng 9 (tiếp theo)

Loài động vật	Khối lượng cơ thể (kg)	Diện tích cơ thể (cm ²)
Khỉ	3,0	2400
Chó	8,0	4000
Chó	10,0	4670
Trẻ em	20,0	8000
Người lớn	60,0	16000
Người lớn	70,0	17000

Việc ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm, cũng như giữa các loài động vật với nhau là đúng trong hầu hết các trường hợp. Tuy nhiên, đây là lĩnh vực nghiên cứu trên cơ thể sinh vật, nên không thể tránh được các ngoại lệ. Vì vậy, trong khi vận dụng, cần phải cảnh giác với những trường hợp ngoại lệ này.

III. XÁC ĐỊNH DIỆN TÍCH BỀ MẶT CƠ THỂ CỦA NGƯỜI

Như đã phân tích ở trên và trong thực hành lâm sàng, cách tính liều dùng theo diện tích bề mặt cơ thể là phương pháp tính chính xác, và khi tính liều theo diện tích bề mặt cơ thể thì bất kỳ là người cao to hoặc lùn bé, kể cả trẻ em đều chỉ dùng một liều duy nhất giống nhau.

Nhưng đối với những thuốc thông thường, nếu liều độc cách xa liều dùng, người ta vẫn tính liều theo tuổi hoặc theo cân nặng. Tuy nhiên đối với những thuốc mà liều độc gần với liều có hiệu quả như thuốc chữa ung thư chẳng hạn, thì phải tính liều theo diện tích bề mặt cơ thể.

Việc đo diện tích bề mặt cơ thể là việc làm tương đối khó khăn, nhưng người ta đã xây dựng được những công thức, những bảng tính hoặc những toán đồ để tính diện tích bề mặt cơ thể người, dựa vào khối lượng cơ thể và chiều cao là các thông số dễ cân đo. Sau đây là một số phương pháp:

3.1. Xác định diện tích bề mặt cơ thể người bằng công thức

Diện tích bề mặt cơ thể người theo cân nặng và chiều cao có thể tính theo công thức của Dubois (Arch. Intern. med., 1916, 17, 863) như sau:

$$S = a.W^{0,425} \cdot H^{0,725}$$

trong đó: S: diện tích bề mặt cơ thể, tính theo cm^2 ;
 a: hằng số đối với mỗi loài động vật. Với người, $a = 71,84$;
 W: khối lượng cơ thể, tính bằng kilogam ;
 H: chiều cao, tính bằng cm.

Ví dụ: Tính diện tích bề mặt cơ thể của một người có chiều cao là 170 cm và cân nặng là 60 kg.

Theo cách tính thông thường, ta phải logarit hóa cả 2 vế của phương trình trên, ta được:

$$\log S = \log 71,84 + 0,425 \log 60 + 0,725 \log 170$$

Từ đó, ta sẽ tính được $\log S$ là bao nhiêu. Sau đó, tra bảng antilog, ta sẽ được S là bao nhiêu.

Trong ví dụ trên, ta có:

$$\begin{aligned} \log S &= 1,85637 + 0,425 \times 1,77815 + 0,725 \times 2,23045 \\ &= 1,85637 + 0,75571 + 1,61708 \\ &= 4,22916 \end{aligned}$$

Tra bảng antilog, ta sẽ được $S = 16950 \text{ cm}^2 = 1,695 \text{ m}^2$.

Ta cũng có thể tính S bằng thước tính logarit, bằng máy tính hoặc máy vi tính (một số loại máy tính, máy vi tính có cài đặt chương trình logarit).

3.2. Xác định diện tích bề mặt cơ thể bằng bảng

Có thể xác định diện tích bề mặt cơ thể người bằng bảng 10.

Cách tra bảng

Đối chiếu hàng dọc là cân nặng với hàng ngang là chiều cao sẽ cho số liệu diện tích bề mặt cơ thể tính ra m^2 . Một người có cân nặng là 60 kg và chiều cao là 1,70 m sẽ có diện tích bề mặt cơ thể là $1,70 \text{ m}^2$.

Bảng 11. Bảng tính diện tích bề mặt cơ thể người (m²)

(Người cao từ 135 đến 195 cm)

Chiều cao (cm) Cân nặng (kg)	135 140 145 150 155	160 165 170 175 180	185 190 195
10			
12,5			
15			
17,5			
20	0,90		
22,5	0,95 0,97 1,00		
25	0,99 1,02 1,04 1,07		
27,5	1,03 1,06 1,08 1,11 1,14	1,16	
30	1,07 1,10 1,13 1,15 1,18	1,21 1,24	
32,5	1,11 1,14 1,16 1,19 1,22	1,25 1,28 1,31	
35	1,14 1,17 1,20 1,23 1,26	1,29 1,32 1,35	
37,5	1,17 1,21 1,24 1,27 1,30	1,33 1,36 1,39 1,42	
40	1,21 1,24 1,27 1,30 1,33	1,37 1,40 1,43 1,46	
42,5	1,24 1,27 1,30 1,34 1,37	1,40 1,43 1,46 1,50 1,53	
45	1,27 1,30 1,34 1,37 1,40	1,44 1,47 1,50 1,53 1,56	
47,5	1,30 1,33 1,37 1,40 1,44	1,47 1,50 1,53 1,57 1,60	1,63
50	1,33 1,36 1,40 1,43 1,47	1,50 1,54 1,57 1,60 1,64	1,67 1,70
52,5	1,36 1,39 1,43 1,46 1,50	1,53 1,57 1,60 1,64 1,67	1,70 1,74 1,77
55	1,38 1,42 1,46 1,49 1,53	1,56 1,60 1,63 1,67 1,70	1,74 1,77 1,80
57,5	1,45 1,48 1,52 1,56	1,59 1,63 1,66 1,70 1,74	1,77 1,80 1,84
60	1,47 1,51 1,55 1,59	1,62 1,66 1,70 1,73 1,77	1,80 1,84 1,87
62,5	1,54 1,58 1,61	1,65 1,69 1,72 1,76 1,79	1,83 1,87 1,91
65	1,56 1,60 1,64	1,68 1,72 1,75 1,79 1,82	1,86 1,90 1,94
67,5	1,63 1,67	1,71 1,74 1,78 1,82 1,86	1,90 1,93 1,97
70	1,65 1,69	1,73 1,77 1,81 1,85 1,89	1,92 1,96 2,00
72,5	1,72	1,76 1,80 1,84 1,88 1,91	1,95 1,99 2,03
75	1,74	1,78 1,82 1,86 1,90 1,94	1,98 2,02 2,06
77,5		1,81 1,85 1,89 1,93 1,97	2,01 2,05 2,09
80		1,83 1,87 1,92 1,96 2,00	2,04 2,08 2,12
82,5		1,90 1,94 1,98 2,02	2,06 2,10 2,14
85		1,96 2,01 2,05	2,09 2,13 2,17
87,5		1,99 2,03 2,07	2,12 2,26 2,20

Bảng 11 (tiếp theo)

Chiều cao (cm) Cân nặng (kg)	135 140 145 150 155	160 165 170 175 180	185 190 195
90		2,06 2,10	2,14 2,18 2,22
92,5		2,08 2,12	2,17 2,21 2,25
95		2,15	2,19 2,23 2,28
97,5		2,17	2,22 2,26 2,30
100			2,24 2,28 2,33
102,5			2,26 2,31 2,35
105			2,33 2,38
107,5			2,40

3.3. Xác định bề mặt cơ thể bằng toán đồ

Trong phương pháp dùng toán đồ, để cho kết quả tính được chính xác hơn, người ta đã xây dựng 2 toán đồ, một cho trẻ nhỏ và một cho trẻ lớn và người lớn (toán đồ 1 và toán đồ 2).

Ví dụ 1: Tính diện tích bề mặt cơ thể của một người lớn cao 1,70 m, cân nặng 60 kg.

Trường hợp này, ta phải dùng toán đồ 2. Lấy một thước thẳng (tốt nhất là lấy một thước nhựa trong), đặt mép thước vào điểm 170 cm ở cột bên trái và điểm 60 kg ở cột bên phải. Mép thước cắt cột giữa ở điểm 1,69. Như vậy, người đó có diện tích bề mặt cơ thể là 1,69 m².

Ví dụ 2: Tính diện tích bề mặt cơ thể của một trẻ nhỏ cao 65 cm, cân nặng 6 kg.

Trường hợp này, ta phải dùng toán đồ 1. Cũng lấy một thước thẳng, đặt mép thước vào điểm 65 cm ở cột bên trái, và điểm 6 kg ở cột bên phải. Mép thước cắt cột giữa ở điểm 0,31. Như vậy, em bé đó có diện tích bề mặt cơ thể là 0,31 m².

Ví dụ liều dùng một lần của cisplatin là 80 mg/m², thì liều dùng cho người có diện tích bề mặt cơ thể 1,69 m² là:

$$80 \text{ mg/m}^2 \times 1,69 \text{ m}^2 = 135,2 \text{ mg}$$

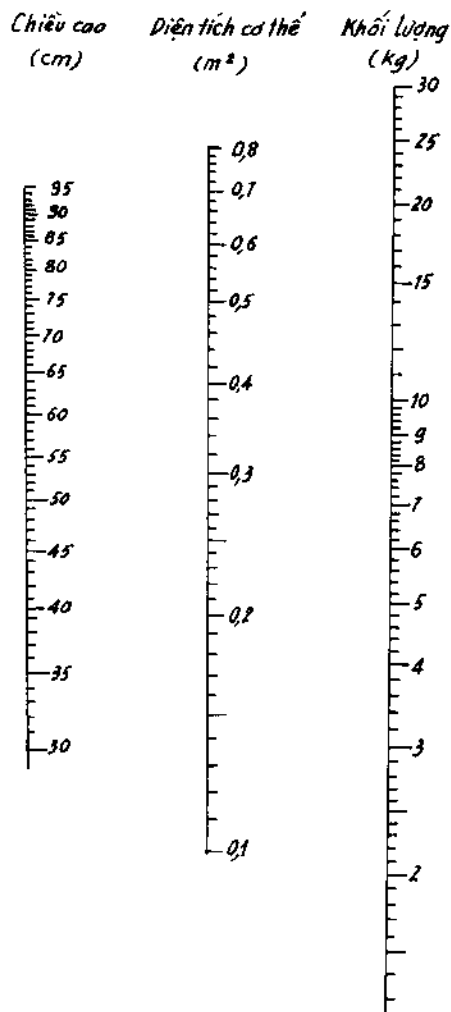
và liều cho em bé có diện tích bề mặt cơ thể 0,31 m² là:

$$80 \text{ mg/m}^2 \times 0,31 \text{ m}^2 = 24,8 \text{ mg.}$$

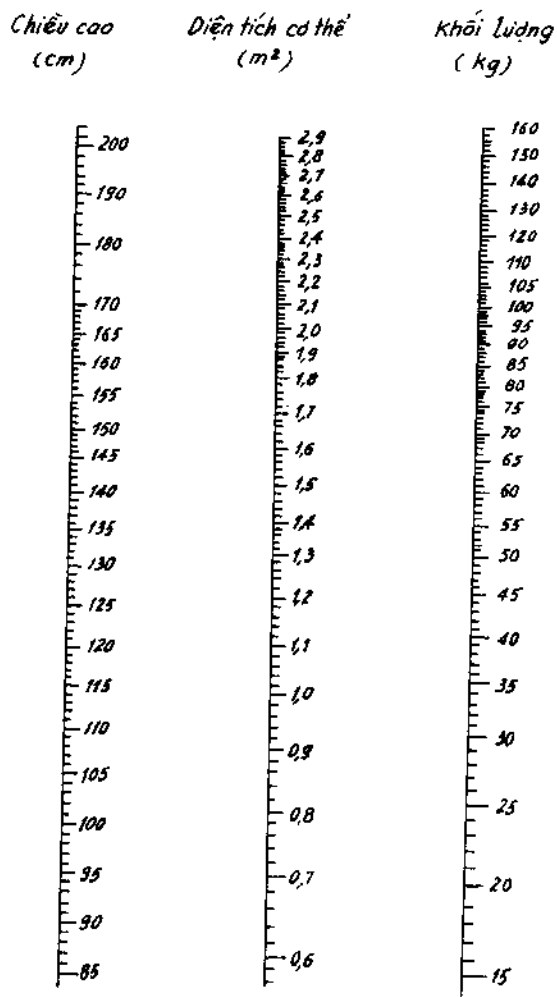
Trong thực hành sử dụng thuốc, nếu ta tính liều theo tuổi chẳng hạn, thường

phải ghi chi tiết liều cho người lớn là bao nhiêu, liều của trẻ em 1-2 tuổi là bao nhiêu, 3-5 tuổi, 6-9 tuổi, 10-15 tuổi... là bao nhiêu. Còn khi hướng dẫn liều dùng theo diện tích bề mặt cơ thể, thì chỉ có 1 liều chung cho tất cả các lứa tuổi, mà lại đạt được độ chính xác cao hơn nhiều.

Toán đồ 1 để tính diện tích cơ thể trẻ nhỏ



Toán đồ 2 để tính diện tích cơ thể trẻ lớn và người lớn



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Trung Đàm (2001), Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm. Tạp chí Dược học, số 2, trang 7-9.
2. Đỗ Trung Đàm (2001), Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm (tiếp theo). Tạp chí Dược học, số 3, trang 8-9.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

(Các chương 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 23)

1. Adams S. S. (1960) Analgesic - Antipyretics, *J. Pharm. Pharmacol.*, 12-251.
2. Addy M. E. và cộng sự (1986), *J. Ethnopharmacol.*, 18 (1), 13-20.
3. Ahlquist R. P. (1948), *Amer. J. Physiol.*, 153, 586.
4. Aida K. và cộng sự (1990), *Planta Medica*, 56, 254-258.
5. Akhtar A. H. và cộng sự (1996), *Fitoterapia*, 67 (3), 195-199.
6. Aladina Z., Sharkov L. (1968), *Biol. Abstr.*, 49, 93156.
7. Anand K. K. và cộng sự (1989), *J. Ethnopharmacol.*, 27, 121-127.
8. Anderson T. E., Bowman R. D. (1969), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130, 665.
9. Armitage A. K. và cộng sự (1961), *Brit. J. Pharmacol.*, 16, 59.
10. Arnold A. và cộng sự (1959), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 102, 184.
11. Asada S. và cộng sự (1962), *Jap. Circ. J.*, 26, 849.
12. Astwood E. B (1938), *Endocrinology*, 23, 25.
13. Atal C. K và cộng sự (1986), *J. Ethnopharmacol.*, 18 (2), 133-141
14. Bae E. A và cộng sự (1999), *Planta Medica*, 65: 442-443
15. Barnhart J. W. và cộng sự (1969), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 130, 1161.
16. Beaver W. T, Riker W. F (1962), *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 138, 48.
17. Becker B. A., Mc Carthy L. E. (1960) *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, 126, 307.
18. Belogortseva N. I. và cộng sự (2000), *Planta Medica*, 66, 217-220.
19. Bennet D. R và cộng sự (1958), *J. Pharmacol. Exptl. Ther.*, 122, 489.
20. Bennett G. và cộng sự (1957), *Lancet* ii, 218.
21. Berger F. M và cộng sự (1969), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 132, 293.
22. Bevan J. A. (1960), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 129, 417.
23. Bevans M. và cộng sự (1951), *Arch. Pathol.*, 51, 278.
24. Bhardwaj K. R. (1984), Trong: *The use of pharmacological techniques for the evaluation of natural products* (Editors: B. N. Dhawan, R. C. Srimal, Lucknow, 1984.
25. Bhattacharya S. K. (1995), *Fitoterapia*, 66 (4), 328-332.
26. Bhattacharya S. K. và cộng sự (1995), *Fitoterapia*, 66 (3), 216-222.
27. Bickerton R. K. (1963), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 142, 99.
28. Bickerton và cộng sự (1962), *J. Pharm. Sci.*, 51, 837.
29. Bickerton và cộng sự (1966), *Arch. Inter. Pharmacodyn.*, 161, 431.
30. Billingham R. E. (1961), Trong: *"Transplantation of tissues and Cells"* (R. E. Billingham và W. K. Silvers, eds), pp. 1-26, Wistar Institute Press, Philadelphia, Pennsylvania.
31. Billingham R. E., Medawar P. B. (1951), *J. Exp. Biol*, 28, 385.
32. Black J. W và cộng sự (1965), *Brit. J. Pharmacol.*, 25, 577.
33. Blackman J. G và cộng sự (1956) *Brit. J. Pharmacol.*, 11, 282.
34. Bollag W. (1963), *Experientia*, 19, 304.
35. Born G. V. R., Cross M. J. (1963), *J. Physiol.*, 168, 178-195.
36. Bowman W. C., Hall M. T. (1970), *Brit. J. Pharmacol.*, 38, 399.
37. Boyd E. M. (1954), *Pharmacol. Rev.*, 6, 521-542.

38. Brekhman I. I. (1951), trong: "Mater. K izureniu stimuliruiushikh i toniziruiushikh sredstv kornia jenshenia i limonnika", Vladivostok, 1, 56.
39. Broom W. A., Clark A. J. (1923), J. Pharmacol. Exp. Ther., 22, 59.
40. Brown A. M. (1968), J. Physiol., 198, 311.
41. Brown D. M., Quinton R. M. (1957) Brit. J. Pharmacol., 12-53.
42. Brown G. L., Gillespie J. S. (1957), J. Physiol., 138, 81.
43. Brubaker A. N và cộng sự (1986), J. Med. Chem., 29, 1094.
44. Brugger J. (1945), Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 3, 177.
45. Buichanan R. L., và cộng sự (1969), J. Med. Chem., 12 (6), 1001.
46. Bulbring E. (1946) Brit. J. Pharmacol., 1: 38.
47. Burgen A. S. V, Iversen L.L. (1965), Brit. J. Pharmacol., 25. 34.
48. Burgen A. S. V. (1949) British J. Pharmacol. 4, 185.
49. Caligaris L. và cộng sự (1968), Acta Endocrinol. (Copenhagen), 59, 177.
50. Calne D. B., Leibowitz S. (1963), Nature, 197, 1309.
51. Cano E. và cộng sự (1990), Planta Medica, 56 (1). 24-26.
52. Capasso A. và cộng sự (1997), Planta Medica, 63, 326-328.
53. Castillo J.C., de Beer E. K. (1947), J. Pharmacol. Exper. Therap., 90, 104.
54. Chang I. (1998), Dự án "Hợp tác nghiên cứu sàng lọc với Viện Dược liệu".
55. Charlier R. (1961), Coronary Vasodilators, Macmillan (Pergamon) New York.
56. Charlier R. và cộng sự (1961), Arch. Intern. Pharmacodynamie, 134, 306.
57. Chen J. Y. P và cộng sự (1960), J. Pharmacol. Exptl. Therap., 128, 384.
58. Cheymol J. và cộng sự (1965), Comptes rendus des seances de la Société de Biologie, 159 (2), 361.
59. Cho C. H và cộng sự (2000), Planta Medica, 66, 348-351.
60. Cleugh J. và cộng sự (1961) Brit. J. Pharmacol., 17, 144.
61. Cross C. E., Oblath R. W. (1962), Amer. J. Physiol., 202, 616.
62. Daware M. B và cộng sự (2000), Planta Medica, 66 231-236.
63. de Elio F. J (1948) Brit. J. Pharmacol, 3, 108.
64. De Gues J. P. và cộng sự (1956) Arch. Intern. Pharmacodynamie, 106, 113.
65. de Jong D. K. và cộng sự (1955), Arch. Intern. Pharmacodynamie, 103, 100.
66. de la Lande I. S., Harvey J. A. (1965), J. Pharm. Pharmacol., 17, 589.
67. Dische Z., Shettles L. B. (1948), J. Biol. Chem, 175, 595.
68. Eckenhoff J. E. và cộng sự (1947), Amer. J. Physiol., 148, 582-596.
69. Edge N. D. (1953) Brit. J. Pharmacol., 8, 10.
70. Edwards B. K. và cộng sự (1960) J. Pharm. Pharmacol., 12, 179.
71. Ellis G. P. và cộng sự (1963), J. M. Chem., 6, 115.
72. Ellman G. L. (1959), Arch. Biochem. Biophys., 82, 70.
73. Elson L. A., Morgan W. T. J., (1933), Biochemical J., 27, 1824.
74. Faizi S. và cộng sự (1998), 64, 225-228.
75. Finkleman B. (1930), J. Physiol., 70, 145.
76. Florey H. và cộng sự., (1932), Brit. J. Exp. Pathol., 13, 269.
77. Foster R. W. (1960), J. Pharm. Pharmacol., 12, 189.
78. Frantz I. D., Hinkelman B. T (1955), J. Exp. Med., 101, 225.
79. Franzone J. S. và cộng sự., (1989), Eur. J. Pharmacol., 165, 269-277.
80. Fukushima H., Nakatani H. (1969), J. Atheroscler. Res., 9, 65.
81. Fukushima N. và cộng sự (1969a), J. Atheroscler. Res., 9, 57.
82. Fukushima N. và cộng sự (1969b), Yakugaku Zasshi, 89 (6), 875.
83. Fulton W. F. M. (1965), The Coronary Arteries, Thomas, Springfield, Illinois.

84. Furchgott R. F. (1968), Trong "Importance of fundamental principles in Drug Evaluation" (D. H. Tedeschi, R. E. Tedeschi, editors), pp: 277-297, Raven Press, New York.
85. Furchgott R. F., (1954), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **111**, 265.
86. Furchgott R. F., (1960), Trong: "Methods in Medical Research" (H. D. Brunner, editors), Vol.8, pp. 177-186, Yearbook Med. Publ, Chicago, Illinois.
87. Furchgott R. F., (1967), Trong "Pharmacologic techniques in Drug evaluation" (P. E. Siegler, J. H. Moyers, editors), Vol.2, pp. 256-266, Yearbook Med. Publ., Chicago, Illinois.
88. Furchgott R. F., Bradakom S. (1953), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **108**, 129.
89. Gaddum và cộng sự., (1949), *J. Physiol. (London)* **108**, 467.
90. Garrattini S. và cộng sự., (1959), *Experientia*, **15**, 33.
91. Ghosh M. N., Schild H. G (1958), *Brit. J. Pharmacol.*, **13**, 54.
92. Gleitz J. và cộng sự (1997), *Planta Medica*, **63** (1), 27-30.
93. Godhwani S. và cộng sự (1987), *J. Ethnopharmacol.*, **21** (2), 153-163.
94. Goldblatt H. và cộng sự (1934), *J. Exp. Med.*, **59**, 347.
95. Graham J. D. P. (1962), Trong "Progress in Medicinal Chemistry" (G. P. Ellis, G. B. West, eds.), Vol.II, pp. 132-177, Butterworth, London.
96. Greenblatt R. (1966), "Ovulation", Lippincott, Philadelphia, Pennsylvania.
97. Greenwald G. S. (1961), *Endocrinology*, **69**, 1068.
98. Gregg D. E. (1950), *Coronary circulation in Health and Disease*, Henry Kimpton, London.
99. Gutmann I., Bergmeyer H. U. (1974), Trong: *Methods of enzymatic analysis*, Vol.4 (Bergmeyer H. U., Edit.), pp. 1791-1794, Academic Press, New York.
100. Haines R. F. và cộng sự (1967), *Proc. Fed., Amer. Soc. Exp. Biol.*, **26**, 934.
101. Harman D. (1969), *J. Atheroscl. Res.*, **10**, 77.
102. Hawkins R. W. và cộng sự (1965), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **118**, 399.
103. Hayman S., Kinoshita J. H. (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 877.
104. Herbert V. và cộng sự (1965), *J. Clin. Endocrinol.*, **25**, 1375-84.
105. Hersherberger L. G. và cộng sự (1953), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **83**, 175.
106. Herxheimer H. (1952), *J. Physiol. (London)*, **117**, 251.
107. Herxheimer H., Stresesemann E. (1960), *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, **125**, 265.
108. Hiền Trần Lưu Vân (2005), *Tạp chí Dược liệu*, **10** (2).
109. Howard A. N. và cộng sự (1967), *Progr. Biochem. Pharmacol.*, **2**, 117.
110. Hsu F. L và cộng sự (1997), *Planta Medica*, **63**, 323-325.
111. Hudson L., Hay F. C. (1980), *Practical Immunology*, 2 nd edn., Blackwell Scientific Publication, London, U. K., pp. 73-92.
112. Huff J. W., Gilfillan J. L. (1960), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **103**, 41.
113. Hugget A. St. G., Nixon D. A. (1957), *Lancet* **i**, 368-370.
114. Jamieson D. (1962), *Brit. J. Pharmacol.*, **19**, 286.
115. Janssen P. A. J., Jageneau A. (1957), *J. Pharm. Pharmacol.*, **9**, 381.
116. Jerne N. K. và cộng sự (1963), Trong "Cell-Bound Antibodies" (B. Amos và H. Koprowski, eds), pp. 109-125. Wistar Institute Press, Philadelphia, Pennsylvania.
117. Kadatz R (1969), *Arch. Keislaufforsch.*, **58**, 263.
118. Kadatz R. (1966), *Methods in Drug evaluation* (Mantegazza, P., Piccini F., editors), *Proc. Int. Symp.*, Milan, p. 120-133, North-Holland Publ., Amsterdam.

119. Kamboj V. P. (1984), Trong: The use of pharmacological techniques for the evaluation of natural products (B. N. Dhawan, R. C. Srimal, editors), UNESCO, Lucknow, India.
120. Karp D. và cộng sự (1960), *Brit. J. Pharmacol.*, **15**, 333.
121. Kattus A. A., Gregg D. E. (1959), *Circ. Res.*, **7**, 628.
122. Kattus A. A., Gregg D. E. (1959), *Circ. Res.*, **7**, 628.
123. Katz và cộng sự (1935), *Amer. J. Physiol.*, **76**, 713.
124. Kaverina. N. (1965), *Pharmacology of the Coronary Circulation*, Macmillan (Pergamon), New York.
125. Kemp A. và cộng sự (1954), *British Med. J.*, **56**, 646-648.
126. Kim H. S và cộng sự (1990), *Planta Medica*, **56** (2), 158-163.
127. Kim Y. S và cộng sự (1998), *Thrombosis research*, 1998, **91**, 33-8.
128. Kobayashi Y. và cộng sự (2001), *Planta Medica*, **67**, 628-633.
129. Koster R., Anderson N. (1959), *Fed. Proc.*, **18**, 412.
130. Kato K. và cộng sự (1983), *Endocrinology*, **113**, 195-199.
131. Kraus A. L. và cộng sự (1967), *Progr. Biochem. Pharmacol.*, **2**, 73.
132. Krebs H. A và cộng sự (1963), *Biochem. Journal*, **86**, 22-27.
133. Kritchevsky D. (1964), Trong "Lipid Pharmacology (R. Paoletti, ed.), trang: 63-113, Academic Press, New York.
134. Kritchevsky D. và cộng sự (1969), *Proc-Soc-Exp. Biol. Med*, **132**, 303.
135. Kritchevsky D., Tepper S. A., (1968), *J. Atheroscler. Res.*, **8** (2), 357.
136. Kuo S. C. và cộng sự (1990), *Planta Medica*, **56** (2), 164-167.
137. Lăng (Lê Văn) (2000) Nghiên cứu hiện đại hoá bài thuốc đông dược tiêu phong, nhuận gan". Số 40, Đề tài KHCN cấp Nhà nước, trang 11-14.
138. Lahlou S. và cộng sự (2000), *Planta Medica*, **66**, 138-143.
139. Langendorff (1895), *Pflügers Arch. ges. Physiol*, **190**, 280.
140. Leon A. S., Bloor C. M. (1968), *J. Appl. Physiol*, **24**, 485.
141. Lerner L. J., Bianchi A. (1963), *Acta Endocrinol.*, **44**, 389.
142. Lewis J. E., Miller J. W. (1966), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **154**, 46.
143. Lichius J. J và cộng sự (1999), *Planta Medica*, **65**, 666-668.
144. Linder E., Seeman T. (1967), *Angiologica*, **4**, 225.
145. Lindner A. và cộng sự (1953), *Schweiz. Med. Wochenschr*, **83**, 360.
146. Lish. P. M. và cộng sự (1960), *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, **129**, 77.
147. Litchfield J. T. and Wilcoxon F. (1949), *J. Pharmacol. Exptl. Therapy*, **96**, 99.
148. Lowry O. H. và cộng sự (1951), Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol Chemistry*, **193**, 265-275.
149. Lumb G. D., Hardy L. B. (1963), *Circulation*, **27** (Part 2), 717.
150. Lusting B., Langer A. (1931), *Biochemical z.*, **242**, 329.
151. Lutwak - Mann C. (1955), *J. Endocrinol.*, **13**, 26.
152. Mackay I. R., Burnet F. M. (1963), "Autoimmune Diseases. Pathogenesis, Chemistry, and Therapy", Thomas, Springfield, Illinois.
153. Malmros H., Sternby N. H. (1968), *Progr. Biochem. Pharmacol.* **4**, 482.
154. Markley K. và cộng sự (1967), *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **32**, 482.
155. Mc Cormack. C. E., Meyer R. K. (1963), *Gen. Comp. Endocrinol.*, **3**, 300.
156. Mc Curdy và cộng sự (1969), *Amer. Surg.*, **35** (6), 431.
157. Mc Ginty D. A. và cộng sự (1939), *Endocrinology*, **24**, 839.
158. Mc Keon W. B., Jr. (1963), *Arch. Intern. Pharmacodynamic*, **141**, 565.
159. Mc Phail M. K., (1934), *J. Physiol.*, **83**, 145.

160. Meesmann W., Bachmann G. W (1966), *Arznei. Forsch.*, **16**, 501.
161. Meier R. (1950), *Ann., N. Y. Acad. Sci.*, **50**, 1161.
162. Melville K. J., Varma D. R. (1962), *Can. Med. Ass. J.*, **86**, 1014.
163. Miller L. C., Tainter M. L. (1944), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **57**, 261.
164. Miura T. và cộng sự (1997), *Planta Medica*, **63**, 320-322.
165. Miyake T., Pincus G. (1958), *Endocrinology*, **63**, 816.
166. Morawitz P., Zahn A. (1912), *Zentralbl. Physiol.*, **26**, 465.
167. Morrison B., Paton W. D. M. (1953), *Brit. Med. J.*, **1**, 1299.
168. Nakamara F. và cộng sự (1969), *Chem. Abstr.*, **70**, 112.
169. Nathan H. C. và cộng sự (1961), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **107**, 796.
170. Newbould B. B. (1963), *Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant*, *Brit. J. Pharmacol.*, **21**, 127.
171. Nityanand S. (1984), Trong: *The use of pharmacological techniques for the evaluation of natural products*, (Editors: Dhawan B.N., Srimal R. C.), UNESCO, Lucknow, India.
172. Nmila R. (2000), *Planta Medica*, **66**, 418-423.
173. Ogawa Y., Pincus G. (1960), *Endocrinology*, **67**, 551.
174. Ogawa Y., Pincus G. (1961), *Endocrinology*, **68**, 680.
175. Oser B. L. (1965), Trong *"Hawks Physiological Chemistry"*, 14th Ed., Mc Graw Hill, New York, 1131.
176. Paget C. J. và cộng sự (1969), *J. Med. Chem.*, **12**, 1010.
177. Paoletti R., Fumagalli R. (1964), *Pharmacometrics*, **2**, 875.
178. Papaccio G. và cộng sự (1991), *Int. J. Pancreatol.*, **10**, 253.
179. Perry W. L. M. và cộng sự (1968), *Pharmacological experiments on isolated preparations*, E. & S. Livingstone, Edinburgh and London, 1968: 38, 120.
180. Phi Phi Phan Thị (1988), *Revue Pharmaceutique du Vietnam*, Editions medicales, pp. 42-48.
181. Pincus G. và cộng sự (1957), *Endocrinology*, **61**, 528.
182. Preziosi P. (1958), *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, **115**, 62.
183. Rayford C. R. và cộng sự (1959), *J. Appl. Physiol.*, **14**, 817.
184. Rees J. R. (1969), *Brit. Heart. J.*, **31**, 1.
185. Rigges B. C., Stadie W. C (1933), *J. Biol. Chem.*, **150**, 463.
186. Robert. A., Nezamis J. E. (1957), *The granuloma pouch as a routine assay for antiphlogistic compounds*, *Acta Endocrinol.* **25**, 105.
187. Rothlin E., Burgger J. (1945), *Helv. Physiol. Pharmacol., Acta* **3**, 519.
188. Saunders F. J., Elton R. L. (1959), Trong: *Recent Progress in the Endocrinology of Reproduction* (C. W. Lloyd, ed.), p.227. Academic Press, New York.
189. Sawyer C. H. (1952), *Fed. Soc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, **11**, 138.
190. Schaper W. (1967), *The Collateral Circulation in the Canine Coronary System*, Habilitation No 1060, Koninklijke Biblioteek, Brussels.
191. Schaper W. và cộng sự (1963), *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **245**, 383.
192. Schmidt H. D., Schmier J. (1966a), *Arzneim. Forsch.*, **16**, 1058.
193. Schmidt H. D., Schmier J. (1967), *Arzneim. Forsch.*, **17**, 861.
194. Schoepke H. G., Shideman F. E (1961), *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **133**, 171.
195. Schwartz H. J., Leskowitz S. (1969), *J. Immunol.*, **103**, 87.
196. Scow R. O. (1957), *Endocrinology*, **60**, 359.
197. Segaloff A. (1962), Trong: *Methods in Hormone Research*, Vol. II (R. I. Dorfman, ed.), p. 603-608, Academic Press, New York.

198. Shay H. và cộng sự (1945), *Gastroenterology*, **5**, 43.
199. Shen Z và cộng sự (2000), *Planta Medica*, **66**, 287-289.
200. Shipley E. G. (1965), *Steroids*, **5**, 699.
201. Shin K. H. và cộng sự (1993), *Fitoterapia*, **64** (2), 130-133.
202. Shipley E. G., (1962), Trong "Methods in Hormone Research" (R. I. Dorfman, ed.), Vol. II, p. 179, Academic Press, New York.
203. Shipley R. E., Tilden J. H. (1947), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **64**, 453.
204. Simpson C. F., Harms R. H. (1969), *J. Atheroscler. Res.*, **10**, 63.
205. Sinh, Phạm Xuân (1994), *Tạp chí Dược học*, **34** (3):10-11.
206. Smith W. G. (1961), Trong "Progress in Medicinal Chemistry (G. P. Ellis and G. B. West, eds.), Vol. I, pp. 1-34, Butterworth, London.
207. Souza Brito A. R. M. và cộng sự (1968), *Planta Medica*, **64**, 126-129.
208. Spector W. G., Willoughby D. A (1959), The demonstration of the role of mediators in turpentine pleurisy in rats by experimental suppression in the inflammatory changes, *J. Pathol. Bacteriol*, **77**, 1.
209. Spector W. G., Willoughby D. A. (1958), Experimental suppression of the early inflammatory phenomena of turpentine pleurisy in rats, *Nature*, **181**, 708.
210. Stavitsky A. B. (1954), *J. Immunol.*, **72**, 360.
211. Steinberg D., (1962), *Adv. Pharmacol.*, **1**, 59.
212. Stewart P. B., Cohen V. (1969), *Science*, **164**, 1082.
213. Stone C. A và cộng sự (1961), *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **131**, 73.
214. Stone C. A. và cộng sự (1958), *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, **117**, 419.
215. Stone C. A., Loew E. R. (1952), *J. Pharmacol.*, **106**, 226.
216. Stucki J. C. (1958), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **99**, 500.
217. Suzuki Y. và cộng sự (2001), *Planta Medica*, **67**, 807-810.
218. Tamosi G. và cộng sự (1968), *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 1789.
219. Tanaka K. và cộng sự (1997), *Planta Medica*, **63**, 465-466.
220. Tawata M. và cộng sự (1990), *Planta Medica*, **56**, 259-263.
221. Tennent D. M. và cộng sự (1960), *J. Lipid Res.*, **1** (5), 469.
222. Tennent D. M. và cộng sự (1961), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **108**, 214.
223. Teotino U. M. và cộng sự (1963), *J. Med. Chem.*, **6**, 248.
224. Thanh (Phạm Văn) (2001), Nghiên cứu thuốc điều trị đái đường từ quả cây mướp đắng (*Momordica Charantia* L.). Luận án Tiến sĩ Dược học, trang 50.
225. Thuillier J. và cộng sự (1968), *Chimie et pharmacologie de la clofezone*, *Chim. Therap.*, **3**, 53-67.
226. Trendelenburg U. (1959), *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, **18**, 1001.
227. Trendelenburg U. (1968), Trong "Importance of fundamental principles in Drug Evaluation (D. H. Tedeschi., R. E. Tedeschi, editors), pp: 203-216, Raven Press, New York.
228. Trendelnburg U. (1966), *Pharmacol. Rev.* **15**, 629.
229. Turk J. L. (1964), *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **24**, 191.
230. Turova A. D. và cộng sự (1954), *Lekarstvennie sredstva rastitelnogo prois-khojdenia*, *Medgiz*.
231. Tutwiler G. F., Brentzel H. J (1980), *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1421-1427.
232. Umbreit W. W. và cộng sự (1957), *Manometric techniques*, Burgess Publishing Co., Minneapolis, U.S.A., 1-17.
233. Upadhyay S. và cộng sự (1990), *Proceedings of the Royal Society of London, B*, **1990**, 242, 175-179. Cited by Daware M. B. *Planta Medica*, **2000**, **66**, 231-236.

234. Van Dyke H. B., Hastings A. B. (1928), *Am. J. Physiol.*, **83**, 563.
235. Van Proosdij - Hartzema E. G. và cộng sự (1958), *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, **115**, 332.
236. Van Rossum J. M., Ariens E. J. (1959), *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, **118**, 418.
237. van Rossum J. M., Mugic M. (1965), *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **155**, 418.
238. van Rossum J. M., van de Brink F. G. (1963), *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **143**, 240.
239. Varley H. và cộng sự (1980), *Practical Clinical Biochemistry*, William Heinemann Medical Books Ltd., London, Vol.1, 673-674.
240. Velardo J. T., Hisaw F. L. (1951), *Endocrinology*, **49**, 732.
241. Vineberg A. M. và cộng sự (1962), *Can. Med. Ass. J.*, **87**, 336.
242. Wang L. C. H và cộng sự (2000), *Planta Medica*, **66**, 144-147.
243. Ward J. R., Jones R. S. (1962) The role of adjuvant composition and its route of administration in the production of rat polyarthritis, *Arthritis and Rheumat.*, **5**, 125.
244. Ward R., Russell, S. J. (1962), The pathogenesis of mycoplasmal (PPLO) arthritis in rats, *Arthritis and Rheumat.*, **5**, 2.
245. Warren J. R., Marshall B. J. (1983), *Lancet* **1**, 1273 - 1275.
246. Welihinda J. và cộng sự (1986), *J. Ethnopharmacol.*, **27**, 247-255.
247. West J. W. và cộng sự (1962a), *Circ-Res.*, **10**, 35.
248. Widdicombe J. G. (1964), Trong: *Evaluation of drug activities; Pharmacometrics*, Vol.2 (Eds. D. R. Laurence, A. L. Bacharach, London and New York, Academic Press), 523-533.
249. Wiesinger D., (1964), Trong: *Nonsteroidal anti - inflammatory drugs*, Intern Symposium - Congress Series. no. 82. (Excerpta Medica, Amsterdam), 221.
250. Wilhelmi G. (1949), über die pharmakologischen Eigenschaften von Irgapyrin einem neuen Präparat aus der Pyrazolreihe, *Schweiz. Med. Wochschr.* **79**, 577.
251. Winbury M. (1964), Trong: *Advances in Pharmacology*, Vol.3, Academic Press, New York, 1-82.
252. Wingzler R. J. và cộng sự (1948), *J. Clin. Investigation*, **27**, 609.
253. Winter C. A và cộng sự (1962), Carrageenin - induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti - inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 544-547.
254. Wissler R. W. (1968), *Progr. Biochem. Pharmacol.*, **4**, 378.
255. Wissler R. W. và cộng sự (1954), *A. M. A. Arch. Pathol.*, **57**, 333.
256. Witkin L. B. và cộng sự (1961), *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **133**, 400.
257. Wohl A. J., Hausler L. M., Roth F. E. (1967), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **158**, 531.
258. Wyrobek J. A., Bruce W. R. (1978), Trong: *Chemical Mutagens. Principle and Methods for their Detection*. Hollaender A., de Serres F. J., Vol.8., Plenum Press, New York, 257-285.
259. Yoshinori N. (2005) Dự án "Hợp tác nghiên cứu sàng lọc với Viện Dược liệu".
260. Yun-Choi H. S. và cộng sự (2001), *Planta Medica*, **67**, 619-622.

Chịu trách nhiệm xuất bản: PGS. TS. TÔ ĐĂNG HẢI
Biên tập và sửa bài: ThS. NGUYỄN HUY TIẾN
CN. ĐẶNG QUANG CHUNG
Trình bày bìa: HƯƠNG LAN

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
70 Trần Hưng Đạo - Hà Nội

In 300 cuốn, khổ 19x27cm, tại Nhà in Hà Nội.
Giấy phép xuất bản số: 136-2006/CXB/444-06/KHKT. Cấp ngày 23/03/2006.
Số in: 118/2. In xong và nộp lưu chiểu tháng 4 năm 2006.

206089



8 935048 960899

Giá: 135.000^d