

Đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của chế phẩm CB-02 trên động vật thực nghiệm

Evaluation of acute and sub-chronic toxicity of CB-02 formulation in experimental animals

Hoàng Lan Hiệp^{1,*}, Nguyễn Đình Nhân¹,
Nguyễn Nhật Minh¹ và Nguyễn Hoàng Ngân²

¹Viện Y học Cổ truyền Quân đội,
²Học viện Quân y

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn trên động vật thực nghiệm của chế phẩm CB-02. **Đối tượng và phương pháp:** Đánh giá độc tính cấp được thực hiện theo phương pháp Litchfield-Wilcoxon trên chuột nhắt trắng chủng Swiss. Độc tính bán trường diễn được đánh giá trên chuột cống trắng thuần chủng Wistar theo Hướng dẫn của Bộ Y tế và Tổ chức Y tế Thế giới về đánh giá hiệu lực và an toàn thuốc. **Kết quả:** Chưa xác định được LD50 của chế phẩm CB-02 ở mức liều cao nhất có thể cho chuột uống (17,5g/kg thể trọng). Chế phẩm CB-02 liều 336mg/kg/24giờ và 1680mg/kg/24giờ, uống liên tục trong 90 ngày không làm ảnh hưởng đến tình trạng chung, trọng lượng cơ thể của chuột cống; các chỉ số huyết học: số lượng hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, bạch cầu và tiểu cầu; các chỉ số đánh giá hủy hoại tế bào gan (nồng độ enzym GOT, GPT), chức năng thận (creatinin) và cholesterol toàn phần thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) giữa nhóm sử dụng thuốc và nhóm chứng. Hình ảnh mô bệnh học gan, thận và lách chuột cống đều trong giới hạn bình thường ở các lô nghiên cứu. **Kết luận:** Chế phẩm CB-02 không gây độc tính cấp trên chuột nhắt trắng và không làm thay đổi chức năng tạo máu, hủy hoại tế bào gan, chức năng thận và hình thái gan, thận, lách trên chuột cống trắng thực nghiệm.

Từ khóa: Chế phẩm CB-02, độc tính cấp, độc tính bán trường diễn.

Summary

Objective: To evaluate the acute and sub-chronic toxicity of the CB-02 formulation in experimental animals. **Subject and method:** The acute toxicity of CB-02 formulation was evaluated on Swiss mice by the Litchfield-Wilcoxon's method and the sub-chronic toxicity was evaluated on Wistar white rats according to Vietnam Health Ministry's regulations and WHO guidelines on the effectiveness and safety of the medicine. **Result:** The LD50 of the CB-02 formulation was not identified at the highest dose that mice could drink for 24 hours (17.5g/kg BW). The CB-02 formulation at 336mg/kg per day and 1680mg/kg per day for 90 consecutive days did not affect the body weight and the hematology indicators like red blood cells, hemoglobin, hematocrit white blood cells and platelets; the liver cell destruction assessment indicators (GOT, GPT), kidney functions (creatinin) and cholesterol total; the changes were not statistical significance ($p>0.05$) between the research group and control group. The pathological images of rats' livers and kidneys were within the normal limits. **Conclusion:** The CB-02 formulation did not have acute

Ngày nhận bài: 19/4/2024, ngày chấp nhận đăng: 05/7/2024

*Tác giả liên hệ: hoanghiiep.yhct@gmail.com - Viện Y học Cổ truyền Quân đội

toxicity, did not change the functions of hematopoiesis, and did not destroy the liver cells, the kidney functions, the form of kidney, liver and spleen on experimental white rats.

Keywords: CB-02 formulation, acute toxicity, sub-chronic toxicity.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cùng với sự phát triển của kinh tế, đời sống xã hội, chế độ dinh dưỡng ngày càng phong phú như cũng mất tính cân bằng khiến cho tình trạng rối loạn lipid máu (RLLPM) ngày càng gia tăng. RLLPM là yếu tố quan trọng cho sự hình thành, phát triển bệnh xơ vữa động mạch (VXĐM), là nguyên nhân của bệnh tim do mạch vành và đột quy não đe dọa tính mạng. Theo ước tính của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), mỗi năm có khoảng 17 triệu người tử vong vì các bệnh tim mạch mà đa số là liên quan đến xơ vữa động mạch. Trong đó, đột quy não là nguyên nhân gây tử vong và tàn phế hàng đầu trên toàn thế giới¹. Tại Việt Nam, Theo thống kê của Viện Tim mạch Quốc gia, số bệnh nhân bị bệnh động mạch vành trên tổng số bệnh nhân nhập viện tăng lên theo từng năm (1991: 3%, 1996: 6,1%, 2001: 9,5%), trong đó nhồi máu cơ tim (NMCT) gặp ngày càng nhiều².

Y học cổ truyền có nhiều vị thuốc, bài thuốc hay điều trị rối loạn lipid máu hiệu quả và an toàn cao. Chế phẩm CB-02 là kết quả của sự kết hợp 3 vị thuốc nam quý: Thạch học tía, Giảo cổ lam và quả me rừng, trong đó từng vị thuốc có các nghiên cứu đã chứng minh được tác dụng trên tình trạng rối loạn chuyển hóa lipid máu³. Đây là bài thuốc nghiệm phương theo quy định của Bộ Y tế cần đánh giá về độc tính cấp và độc tính bán trường diễn trước khi được ứng dụng rộng rãi trong điều trị. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm: *Đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của chế phẩm CB-02 trên động vật thực nghiệm.*

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng

Chế phẩm CB-02 được bào chế dưới dạng viên nang cứng, đạt tiêu chuẩn cơ sở, bào chế tại Học viện Quân y và sản xuất tại Công ty Cổ phần Dược phẩm Phú Tín. Mỗi viên nang cứng CB-02 chứa 400mg bột cao khô CB-02 tương ứng với các dược liệu bột cao khô me rừng (*Phyllanthus emblica* L.) 224mg, bột cao khô thạch học tía (*Dendrobium*

catenatum Lindl) 86 mg, bột cao khô giảo cổ lam 5 lá (*Gynostemma pentaphyllum*) 90mg. Thuốc được đóng trong lọ PET nâu, đậy kín có màng seal, có hút ẩm silicagel, bảo quản tránh ánh sáng.

Động vật dùng cho nghiên cứu độc tính cấp: 60 con chuột nhắt trắng thuần chủng Swiss, cả hai giống, khỏe mạnh, trọng lượng cơ thể (TLCT) là: 20g ± 2g.

Động vật dùng cho nghiên cứu độc tính bán trường diễn: 30 chuột cống trắng Wistar, thuần chủng, lông trắng, cả hai giống, khỏe mạnh, TLCT là: 180g ± 20g.

Nghiên cứu thực hiện tại Bộ môn Dược Lý - Học viện Quân y, từ tháng 10/2021 - 10/2022.

2.2. Phương pháp

Đánh giá độc tính cấp của chế phẩm CB-02

Nghiên cứu độc tính cấp và xác định LD₅₀ của chế phẩm CB-02 trên chuột nhắt trắng theo phương pháp Litchfield-Wilcoxon^{4, 5}. 60 con chuột nhắt trắng được chia thành 6 lô, mỗi lô 10 con. Cho chuột uống hỗn dịch chế phẩm CB-02 làm 3 lần/24 giờ, mỗi lần cách nhau 3 giờ với thể tích là 0,2ml/chuột/lần. Các lô chuột uống CB-02 với mức liều tăng dần có bước nhảy liều giữa 2 lô liên tiếp là: 2,5g CB-02/kg thể trọng, từ liều thấp nhất là 5,0g/kg thể trọng đến liều cao nhất là 17,5g/kg thể trọng để xác định liều thấp nhất gây chết 100% chuột và liều cao nhất không gây chết chuột.

Cách pha thuốc: Pha liều 5g/kg thể trọng chuột (chuột có trọng lượng khoảng 20g). Tam suất: 20g × 5g/1000g = 0,1g mẫu. Cân 0,1g chế phẩm pha trong 0,6mL nước/chuột, nhân với số chuột cần uống. Tương tự cách tính cho các liều 7,5g/kg, 10g/kg...

Chỉ tiêu theo dõi:

Tình trạng chung của chuột.

Quá trình diễn biến khi có dấu hiệu nhiễm độc (nôn, co giật, kích động, bài tiết...).

Số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc. Các chuột chết được mổ để đánh giá tổn thương đại thể.

Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD_{50} của thuốc thử.

Tiếp tục theo dõi tình trạng của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống thuốc thử^{5, 6}.

Đánh giá độc tính bán trường diễn của chế phẩm CB-02

Nghiên cứu theo quy định của WHO và Bộ Y tế về đánh giá hiệu lực và an toàn thuốc^{7, 8}. Chuột cống được chia thành 3 lô, mỗi lô 10 con.

Lô chứng: Uống nước cất 10ml/kg/24giờ.

Lô trị 1: Uống hỗn dịch cao CB-02 liều 336mg/kg/24giờ (tương đương liều trên lâm sàng).

Lô trị 2: Uống hỗn dịch cao CB-02 liều 1680mg/kg/24giờ (gấp 5 liều trên lâm sàng).

Tất cả chuột cống nghiên cứu được cho uống cùng một thể tích 10ml/kg/24giờ chia 2 lần uống sáng và uống chiều, theo dõi liên tục trong 90 ngày.

Cách pha thuốc: Pha liều 336mg/kg thể trọng chuột (chuột có trọng lượng khoảng 180g). Lượng thuốc: $180g \times 0,336g/1000g = 0,0605g$ mẫu. Cân 0,0605g chế phẩm pha trong $180 \times (10/1000) = 1,8ml$

nước/chuột, nhân với số chuột cần uống. Tương tự cách tính cho các liều 1680mg/kg/24giờ.

Các chỉ tiêu theo dõi:

Theo dõi tình trạng chung, trọng lượng cơ thể của chuột cống;

Đánh giá chỉ số huyết học: Hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, bạch cầu và tiểu cầu;

Đánh giá chỉ số sinh hóa: GOT, GPT, creatinin, cholesterol toàn phần;

Mô bệnh học: Quan sát hình ảnh (HA) đại thể và vi thể gan, lách và thận chuột cống sau 90 ngày nghiên cứu.

Thời điểm xét nghiệm: Lấy máu xét nghiệm các chỉ số huyết học và sinh hóa tại 4 thời điểm: Bắt đầu nghiên cứu (D0), sau 30 ngày (D30), 60 ngày (D60) và 90 ngày (D90) uống thuốc.

Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý theo các phương pháp thống kê y sinh học bằng phần mềm SPSS 16.0 với biến liên tục và không liên tục sử dụng kiểm định T-Test. Số liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

III. KẾT QUẢ

3.1. Độc tính cấp

Bảng 1. Độc tính cấp theo đường uống của chế phẩm CB-02 (n = 10, $\bar{X} \pm SD$)

Lô chuột	Số chuột	Liều SD (g/kg TLCT)	Số chuột chết		
			Sau 24 giờ	Sau 72 giờ	Sau 7 ngày
Lô 1	10	5,0	0	0	0
Lô 2	10	7,5	0	0	0
Lô 3	10	10,0	0	0	0
Lô 4	10	12,5	0	0	0
Lô 5	10	15,0	0	0	0
Lô 6	10	17,5	0	0	0

Sau 3 lần uống thuốc, chuột vẫn hoạt động, vận động và ăn uống bình thường; đồng tử mắt chuột bình thường; không có biểu hiện của khó thở hay tím tái; chuột đi ngoài phân khuôn, một số chuột có đi ngoài phân nát, nhưng sau đó nhanh chóng trở lại bình thường.

Chuột nhắt trắng được uống thuốc thử với mức liều khác nhau, từ liều thấp nhất 5g CB-02/kg thể trọng đến liều cao nhất 17,5g CB-02/kg thể trọng, là liều tối đa có thể dùng được bằng đường uống để đánh giá độc tính cấp của thuốc thử, nhưng không có chuột nào chết.

Tiếp tục theo dõi chuột trong 7 ngày sau uống thuốc, không thấy xuất hiện triệu chứng bất thường nào, không có chuột nào chết.

3.2. Độc tính bán trường diễn

3.2.1. Ảnh hưởng đến tình trạng chung và trọng lượng cơ thể chuột cống

Tình trạng chung

Chuột cống trắng được theo dõi hàng ngày về tình trạng chung gồm hoạt động, ăn uống, tình trạng lông, da, niêm mạc, chất tiết. Các chuột ở cả lô chứng và các lô dùng thuốc thử đều hoạt động bình thường. Chuột lông mượt, da niêm mạc bình thường, ăn uống bình thường, phân thành khuôn. Không thấy biểu hiện gì đặc biệt trong suốt thời gian nghiên cứu.

Trọng lượng cơ thể của chuột cống

Bảng 2. Ảnh hưởng của viên nang CB-02 đối với TLCT của chuột cống (n = 10, $\bar{X} \pm SD$)

Thời điểm XN	Trọng lượng chuột g ($\bar{X} \pm SD$)			P giữa các lô
	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
D ₀ (a)	168,42 ± 5,12	168,56 ± 5,19	169,52 ± 5,37	p ₂₋₁ >0,05 p ₃₋₁ >0,05 p ₃₋₂ >0,05
D ₃₀ (b)	193,52 ± 5,24	195,08 ± 5,88	192,72 ± 6,31	
D ₆₀ (c)	209,32 ± 5,99	207,47 ± 9,19	208,12 ± 8,99	
D ₉₀ (c)	219,53 ± 9,45	219,19 ± 9,49	221,63 ± 10,12	
p trong cùng lô	p _{b,c,d-a} <0,01, p _{c,d-b} <0,01, p _{c-d} <0,01			-

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

3.2.2. Ảnh hưởng của chế phẩm CB-02 đối với một số chỉ tiêu huyết học của chuột

Bảng 3. Ảnh hưởng của chế phẩm CB-02 lên chỉ số huyết học của chuột (n = 10, $\bar{X} \pm SD$)

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	P giữa các lô
Hồng cầu chuột T/l ($\bar{X} \pm SD$)				
D ₀ (a)	7,26 ± 0,99	7,09 ± 0,81	7,11 ± 0,62	p ₂₋₁ >0,05 p ₃₋₂ >0,05 p ₃₋₁ >0,05
D ₃₀ (b)	7,15 ± 0,56	7,11 ± 0,73	7,16 ± 0,51	
D ₆₀ (c)	7,13 ± 0,86	7,23 ± 1,13	7,25 ± 0,94	
D ₉₀ (c)	7,19 ± 0,67	7,05 ± 0,81	7,14 ± 0,76	
p trong cùng lô	p _{b,c,d-a} >0,05, p _{c,d-b} >0,05, p _{d-c} >0,05			-
Huyết sắc tố chuột g/dl ($\bar{X} \pm SD$)				
D ₀ (a)	13,16 ± 1,75	12,79 ± 1,11	12,85 ± 1,70	p ₂₋₁ >0,05 p ₃₋₂ >0,05 p ₃₋₁ >0,05
D ₃₀ (b)	12,98 ± 1,39	13,08 ± 1,06	12,99 ± 1,27	
D ₆₀ (c)	13,03 ± 1,73	13,10 ± 1,49	12,95 ± 2,00	
D ₉₀ (c)	13,08 ± 1,66	12,63 ± 1,39	13,09 ± 2,08	
p trong cùng lô	p _{b,c,d-a} >0,05, p _{c,d-b} >0,05, p _{d-c} >0,05			-

Hematocrit I/I (X ± SD)				
D ₀ (a)	32,84 ± 5,28	32,93 ± 2,75	32,97 ± 2,79	<i>p</i> ₂₋₁ >0,05 <i>p</i> ₃₋₂ >0,05 <i>p</i> ₃₋₁ >0,05
D ₃₀ (b)	32,66 ± 3,53	31,38 ± 2,93	32,62 ± 2,30	
D ₆₀ (c)	32,91 ± 2,87	32,31 ± 2,56	31,47 ± 2,70	
D ₉₀ (c)	32,51 ± 3,01	31,86 ± 2,04	33,43 ± 3,31	
<i>p</i> _{trong cùng lô}	<i>p</i> _{b,c,d-a} >0,05, <i>p</i> _{c,d-b} >0,05, <i>p</i> _{d-c} >0,05			-
Số lượng bạch cầu (G/I) (X ± SD)				
D ₀ (a)	6,99 ± 1,34	6,75 ± 2,47	6,79 ± 2,79	<i>p</i> ₂₋₁ >0,05 <i>p</i> ₃₋₂ >0,05 <i>p</i> ₃₋₁ >0,05
D ₃₀ (b)	6,83 ± 2,85	6,93 ± 2,20	6,85 ± 2,84	
D ₆₀ (c)	6,85 ± 2,50	6,86 ± 1,39	6,75 ± 3,14	
D ₉₀ (c)	6,79 ± 2,01	6,61 ± 1,44	6,92 ± 0,94	
<i>p</i> _{trong cùng lô}	<i>p</i> _{b,c,d-a} >0,05, <i>p</i> _{c,d-b} >0,05, <i>p</i> _{d-c} >0,05			-
Số lượng tiểu cầu (G/I) (X ± SD)				
D ₀ (a)	513,60 ± 193,11	489,10 ± 155,38	494,60 ± 116,68	<i>p</i> ₂₋₁ >0,05 <i>p</i> ₃₋₂ >0,05 <i>p</i> ₃₋₁ >0,05
D ₃₀ (b)	542,90 ± 146,37	485,70 ± 115,70	487,80 ± 94,59	
D ₆₀ (c)	496,10 ± 160,52	465,40 ± 136,05	479,90 ± 127,00	
D ₉₀ (c)	486,50 ± 92,44	483,40 ± 105,18	524,90 ± 109,18	
<i>p</i> _{trong cùng lô}	<i>p</i> _{b,c,d-a} >0,05, <i>p</i> _{c,d-b} >0,05, <i>p</i> _{d-c} >0,05			-

So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm và so sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, chỉ số huyết học (số lượng hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu) thay đổi không có ý nghĩa thống kê (*p*>0,05). Chế phẩm CB-02 với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa gây thay đổi về chỉ tiêu huyết học của chuột.

3.2.3. Ảnh hưởng của chế phẩm CB-02 đối với một số chỉ tiêu sinh hóa của chuột

Bảng 4. Ảnh hưởng của chế phẩm CB-02 đối với một số chỉ tiêu sinh hóa (n = 10, X ± SD)

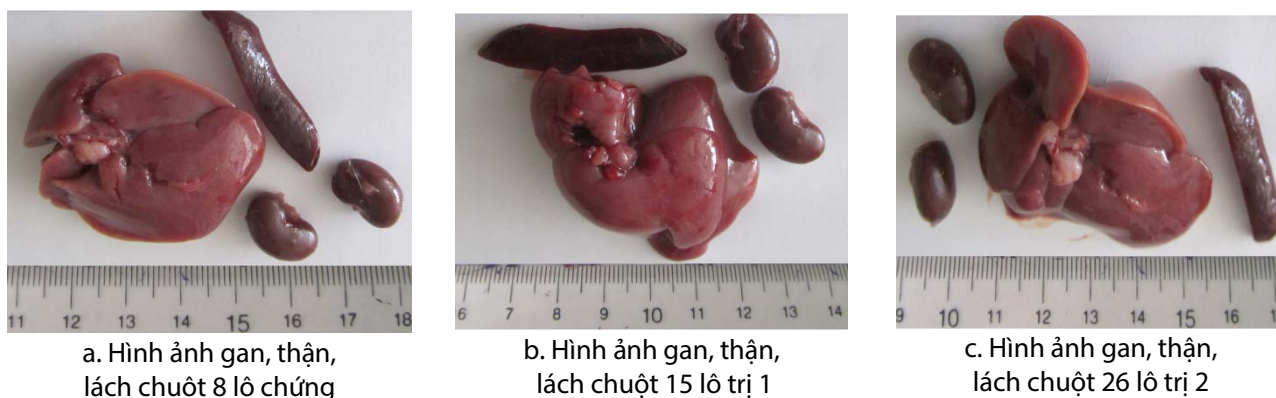
Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	<i>p</i> _{giữa các lô}
Hoạt độ GOT (UI/I)				
D ₀ (a)	102,29 ± 29,50	100,32 ± 16,18	91,80 ± 19,96	<i>p</i> ₂₋₁ >0,05 <i>p</i> ₃₋₂ >0,05 <i>p</i> ₃₋₁ >0,05
D ₃₀ (b)	100,05 ± 28,97	96,43 ± 19,79	94,71 ± 17,10	
D ₆₀ (c)	101,97 ± 23,92	97,45 ± 15,54	93,52 ± 18,83	
D ₉₀ (c)	100,18 ± 17,99	97,29 ± 12,98	96,24 ± 15,37	
<i>p</i> _{trong cùng lô}	<i>p</i> _{b,c,d-a} >0,05, <i>p</i> _{c,d-b} >0,05, <i>p</i> _{d-c} >0,05			-
Hoạt độ GPT (UI/I)				
D ₀ (a)	75,02 ± 19,38	85,10 ± 24,28	72,56 ± 19,52	<i>p</i> ₂₋₁ >0,05 <i>p</i> ₃₋₂ >0,05 <i>p</i> ₃₋₁ >0,05
D ₃₀ (b)	80,02 ± 16,84	82,16 ± 19,86	77,95 ± 12,71	
D ₆₀ (c)	74,19 ± 20,85	77,98 ± 12,03	71,25 ± 17,96	
D ₉₀ (c)	68,54 ± 16,25	68,87 ± 17,45	77,64 ± 14,88	
<i>p</i> _{trong cùng lô}	<i>p</i> _{b,c,d-a} >0,05, <i>p</i> _{c,d-b} >0,05, <i>p</i> _{d-c} >0,05			-
Creatinin (µmol/l)				

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	P _{giữa các lô}
D ₀ (a)	81,24 ± 9,52	86,13 ± 11,57	85,37 ± 13,97	<i>p</i> ₂₋₁ > 0,05 <i>p</i> ₃₋₂ > 0,05 <i>p</i> ₃₋₁ > 0,05
D ₃₀ (b)	85,23 ± 9,04	84,23 ± 11,53	87,17 ± 12,77	
D ₆₀ (c)	84,77 ± 12,61	82,77 ± 10,29	81,12 ± 13,60	
D ₉₀ (c)	84,85 ± 11,03	86,40 ± 12,47	81,90 ± 12,44	
P _{trong cùng lô}	<i>p</i> _{b,c,d-a} > 0,05, <i>p</i> _{c,d-b} > 0,05, <i>p</i> _{d-c} > 0,05			-
Cholesterol toàn phần (mmol/l)				
D ₀ (a)	1,97 ± 0,34	2,13 ± 0,47	2,10 ± 0,64	<i>p</i> ₂₋₁ > 0,05 <i>p</i> ₃₋₂ > 0,05 <i>p</i> ₃₋₁ > 0,05
D ₃₀ (b)	1,89 ± 0,38	2,06 ± 0,42	2,07 ± 0,49	
D ₆₀ (c)	1,86 ± 0,56	2,03 ± 0,39	1,97 ± 0,29	
D ₉₀ (c)	1,96 ± 0,39	1,88 ± 0,32	1,98 ± 0,27	
P _{trong cùng lô}	<i>p</i> _{b,c,d-a} > 0,05, <i>p</i> _{c,d-b} > 0,05, <i>p</i> _{d-c} > 0,05			-

So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm và so sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, chỉ số sinh hóa máu chuột (hoạt độ enzym GOT, GPT, creatinin) thay đổi không có ý nghĩa thống kê (*p* > 0,05). Chỉ số cholesterol máu đều cho thấy ở 2 lô dùng thuốc thử có xu hướng giảm theo thời gian dùng thuốc, tuy nhiên sự thay đổi theo thời gian trong cùng lô và với lô chứng sinh lý khác biệt không có ý nghĩa thống kê (*p* > 0,05).

3.2.4. Kết quả mô bệnh học tạng của chuột thí nghiệm

Đại thể: Quan sát đại thể bằng mắt thường dưới kính lúp có độ phóng đại 25 lần, chúng tôi thấy: Màu sắc, hình thái của gan, lách và thận ở hai lô chuột cống dùng viên nang CB-02 có màu nâu đỏ thẫm đồng đều, bề mặt nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết, có đàn hồi khi ấn xuống, không khác biệt so với hình ảnh gan, lách, thận của chuột ở lô chứng (Hình 1).



Hình 1. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột sử dụng chế phẩm CB-02

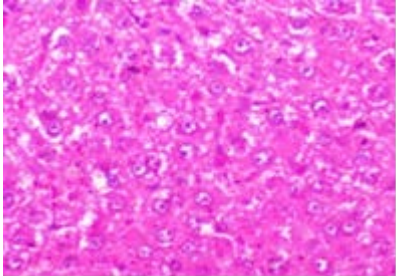
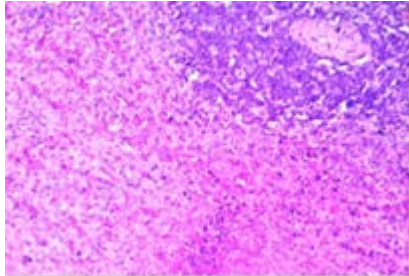
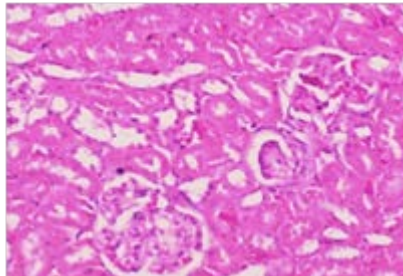
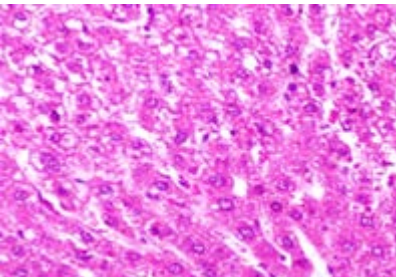
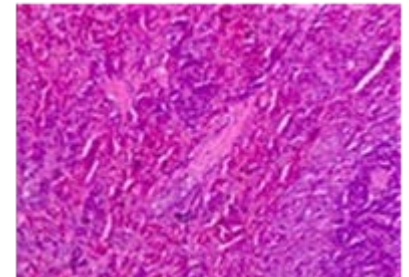
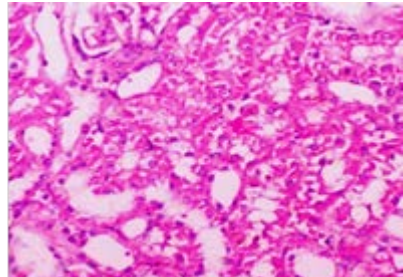
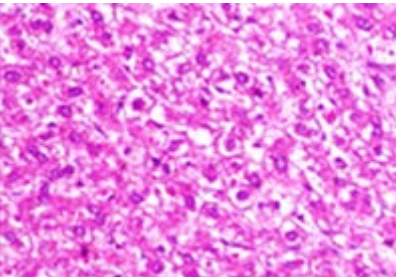
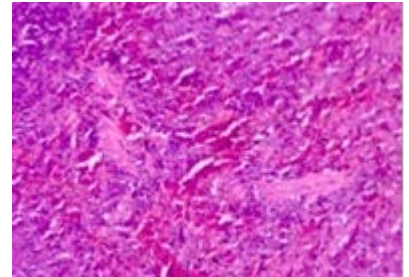
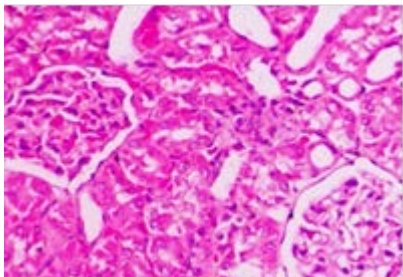
Vi thể: Kết quả mô bệnh học gan, lách, thận ở 30% số chuột ở các lô cho thấy:

HA vi thể gan: Ở các lô đều thấy: Các bè gan, tiểu thùy gan và tế bào gan bình thường, không có hình ảnh thoái hóa hoặc viêm, tĩnh mạch trung tâm không giãn, không xung huyết.

HA vi thể lách: Tại tất cả các lô: Vùng tủy trắng bắt màu xanh thẫm, tập trung các nang lympho lớn; vùng tủy đỏ màu xanh đỏ với các xoang nang chứa nhiều hồng cầu và các đại thực bào. Không có xuất huyết, hoại tử.

HA vi thể thận: Ở tất cả các lô đều thấy: Cấu trúc nhu mô thận bình thường, các mao mạch trong tiểu cầu và khe thận bình thường. Các tế bào biểu mô ống thận bình thường.

Như vậy, chế phẩm CB-02 dùng đường uống với liều 336mg/kg/24giờ và 1680mg/kg/24giờ liên tục trong 90 ngày đã không gây tổn thương trên gan, thận, lách của chuột. Kết quả mô bệnh học gan, lách, thận của các chuột đại diện ở các lô nghiên cứu sau 90 ngày uống thuốc được thể hiện ở hình 2 dưới đây:

Hình ảnh vi thể gan (HE; X400)	Hình ảnh vi thể lách (HE; X400)	Hình ảnh vi thể thận (HE; X100)
		
Chuột 1 lô chứng	Chuột 8 lô chứng	Chuột 4 lô chứng
		
Chuột 15 lô trị 1	Chuột 12 lô trị 1	Chuột 18 lô trị 1
		
Chuột 22 lô trị 2	Chuột 26 lô trị 2	Chuột 28 lô trị 2

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

IV. BÀN LUẬN

Trong đánh giá độc tính cấp, xác định liều dùng của thuốc trên động vật thực nghiệm, chúng tôi dựa vào nguyên tắc ngoại suy liều với hệ số ngoại suy cho chuột nhất trắng swiss là 12⁷. Như vậy, với liều dùng trên lâm sàng 6 viên nang CB-02 hàm lượng 400mg

(tương đương 2400mg viên nang/người/24 giờ. Tức là khoảng 48mg cao/kg TLCT người/24giờ), liều ngoại suy trên chuột nhất trắng sẽ là 576mg/kg/24 giờ. Các lô chuột được thử nghiệm được uống chế phẩm CB-02 từ: 5g/kg/24 giờ đến 17,5g/kg/24 giờ, tức là cao hơn từ 8,68 lần đến 30,38 lần liều sử dụng trên lâm sàng dự kiến. Kết quả, các chuột vẫn khỏe mạnh, lông mượt, mắt trong, ăn uống và hoạt động bình

thường, không có chuột nào chết. Tiếp tục theo dõi trong 72 giờ và 7 ngày tiếp theo nhưng không có chuột chết. Vì vậy, chưa xác định được LD₅₀ trên chuột nhắt trắng theo đường uống. Theo hướng dẫn của WHO, chế phẩm CB-02 được sử dụng với liều dùng trên lâm sàng là an toàn.

Như vậy, kết quả nghiên cứu chế phẩm CB-02 cho thấy hầu như không có độc tính trên động vật thực nghiệm. Kết quả này phần nào có thể được lý giải từ thành phần của chế phẩm. Trong CB-02 đều là những dược liệu hầu như không có độc tính, chỉ có thạch học tía là được báo cáo có thể hiện độc tính LD50 trên chuột nhắt trắng dùng đường uống là 59,3g dược liệu khô/kg TLCT chuột⁹. Liều dùng của Thạch học tía trong viên nang dự định sử dụng cho người là 0,124g/kg TLCT người/24 giờ, quy đổi ra liều trên chuột nhắt là 1,5g/kg, nhỏ hơn 1/50 so với liều LD50 được báo cáo. Trong đánh giá độc tính cấp liều sử dụng của thạch học tía cho chuột nhắt trắng swiss trong các lô là từ 0,96g/kg TLCT/24 giờ đến 3,34g/kg TLCT/24giờ nhỏ hơn 17,7 lần so với liều LD50 đã công bố, cho nên trong thí nghiệm của chúng tôi không xác định được liều LD50 là hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu trước đó của Nguyễn Thị Duyên và Vũ Thị Anh (2017)⁹.

Trong đánh giá độc tính bán trường diễn, cho chuột uống viên nang cứng CB-02 liên tục trong 90 ngày, theo quy định của Bộ Y tế, WHO, thời gian nghiên cứu độc tính của thuốc tối thiểu gấp đôi thời gian dùng trên lâm sàng^{10, 6}. Viên nang CB-02 được chỉ định dùng trên lâm sàng 30 ngày, nên chúng tôi theo dõi độc tính trong 90 ngày nhằm đảm bảo sự chặt chẽ của nghiên cứu. Để xác định liều dùng của thuốc trên động vật thực nghiệm, chúng tôi dựa vào nguyên tắc ngoại suy liều với hệ số ngoại suy trên chuột cống trắng là 7⁷. Như vậy, với liều dùng trên lâm sàng là 48mg cao/kg TLCT người/24 giờ, liều ngoại suy trên chuột cống trắng sẽ là 336mg/kg/24giờ. Trong nghiên cứu, chuột cống trắng được chia thành 3 lô: Lô chứng, lô trị 1 (liều 336mg/kg/24 giờ tương đương liều dùng trên lâm sàng), lô trị 2 (liều 1680mg/kg/24 giờ gấp 5 liều dùng tương đương trên lâm sàng). Chuột cống được theo dõi trong 90 ngày liên tục và được đánh giá

tình trạng chung, thể trọng, chỉ số huyết học trước thí nghiệm, sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày thí nghiệm.

Kết quả cho thấy, tình trạng chung của chuột cống ở tất cả các lô sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày đều bình thường. Trọng lượng chuột cống ở cả 3 lô sau 90 ngày thí nghiệm đều tăng so với trước khi nghiên cứu ($p < 0,05$), sự gia tăng trọng lượng không có sự khác biệt giữa các lô trị 1, lô trị 2 so với lô chứng ($p > 0,05$). Chế phẩm CB-02 không làm ảnh hưởng tới tình trạng chung và thể trọng chuột cống.

Đánh giá ảnh hưởng của thuốc tới cơ quan tạo máu thực sự quan trọng do đây là những tế bào có khả năng nhiễm độc tính sớm nhất do sự nhân lên nhanh chóng trong cơ thể. Các kết quả cho thấy số lượng hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, số lượng bạch cầu, tiểu cầu ở lô chuột cống uống viên nang CB-02 liều 336mg/kg/24 giờ và liều 1680mg/kg/24 giờ sau 90 ngày thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) và không thấy có sự khác biệt với lô chứng ($p > 0,05$). Như vậy, chế phẩm CB-02 không ảnh hưởng đến chức năng tạo máu của chuột cống trắng.

Về đánh giá mức độ tổn thương gan được phản ánh thông qua các chỉ số GOT, GPT. Tuy nhiên, nồng độ GOT, GPT trong máu chuột cống ở 2 lô uống viên nang CB-02 liều 336mg/kg/24 giờ và liều 1680mg/kg/24 giờ sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày cho thấy không có sự khác biệt so với trước khi uống thuốc và so với lô chứng ($p > 0,05$).

Xét nghiệm creatinin được dùng để đánh giá, theo dõi chức năng thận cũng như đánh giá ảnh hưởng của thuốc lên thận. Kết quả cho thấy sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống viên nang CB-02, nồng độ creatinin trong máu chuột ở 2 lô trị 1 và lô trị 2 với liều 336mg/kg/24giờ và liều 1680mg/kg/24giờ thay đổi không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so với trước khi uống thuốc thử. Điều này chứng tỏ chế phẩm CB-02 không ảnh hưởng đến chức năng thận của chuột cống.

Đánh giá về kết quả cholesterol máu, chế phẩm CB-02 không làm giảm cholesterol máu trên chuột bình thường, điều này liên quan đến tính an toàn của thuốc thử.

Vậy, chế phẩm CB-02 không gây tăng men gan, không ảnh hưởng tới chức năng thận, Cholesterol máu, do đó viên nang CB-02 an toàn khi sử dụng liều 336mg/kg/24 giờ và liều 1680mg/kg/24 giờ trong thời gian dài.

Các dược liệu trong viên nang đều được dùng với liều khuyến cáo giúp cho thuốc an toàn trong quá trình sử dụng.

V. KẾT LUẬN

Độc tính cấp: Chưa xác định được LD₅₀ của chế phẩm CB-02 theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống là 17,5g/kg thể trọng mà không gây chết chuột nào, không có biểu hiện nào của độc tính cấp. Như vậy, chế phẩm CB-02 bảo đảm tính an toàn trong đánh giá độc tính cấp đường uống ở chuột nhắt trắng.

Độc tính bán trường diễn: Chế phẩm CB-02 không ảnh hưởng đến thể trạng, cân nặng, các chỉ số huyết học (hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, bạch cầu, tiểu cầu) và các chỉ số sinh hóa (GOT, GPT, creatinin, cholesterol) khi cho chuột cống trắng uống liều 336mg/kg/24 giờ và liều 1680mg/kg/24 giờ liên tục trong 90 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO (2002) *Chapter 4: Quantifying selected major risks to health*. The World Health Report - Reducing risks, Promoting Healthy Life: 47-97.
2. Võ Quảng (2000) *Bệnh động mạch vành tại Việt Nam*. Tạp chí Tim mạch học, 21/2000, 445.
3. Đỗ Tất Lợi (2009) *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, tr. 695-696.
4. Đỗ Trung Đàm (2014) *Phương pháp Litchfield Wilcoxon*. Phương pháp xác định độc tính của thuốc. Nhà xuất bản Y học, tr. 101-112.
5. Viện Dược liệu (2006) *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo*. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, tr. 355-376.
6. World Health Organization (2000) *Working group on the safety and efficacy of herbal medicine*. Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization.
7. Bộ Y tế, Cục Khoa học công nghệ và đào tạo (2015) *Quyết định về việc ban hành dược liệu chuyên môn, Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu., số 141/QĐ-K2ĐT*.
8. OECD (2002) *Drug safety Evaluation I: Acute and sub-chronic toxicity assesment*. USA Academy Press.
9. Nguyễn Thị Duyên, Vũ Thị Anh (2017) *Nghiên cứu thành phần hóa học và đánh giá độc tính cấp của thạch học tía*. Tạp chí Khoa học và công nghệ, Số 166(06), tr. 165-168.
10. Bộ Y tế (2015) *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh nội tiết - chuyển hóa*. Nhà xuất bản Y học, tr. 208-219.
11. Nguyễn Thế Khánh, Phạm Tử Dương (2001) *Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng*. Nhà Xuất bản Y học.
12. Vũ Đình Vinh (2001) *Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hóa*. Nhà xuất bản Y học, tr. 115-287.