TÍNH AN TOÀN CỦA VIÊN HOÀN CỨNG LIPID AT TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM

Đào Mạnh Hưng*, Trần Quang Minh, Nguyễn Văn Dũng*****

** Bệnh viện Châm cứu Trung ương.*

*** Đại học Y Hà Nội.*

****Bệnh viện Y học cổ truyền TP Đà Nẵng.*

TÓM TẮT:

Mục tiêu: Đánh giá tính an toàn của viên hoàn cứng "Lipid AT" trên động vật thực nghiệm. **Phương pháp nghiên cứu:** Xác định độc tính cấp của thuốc trên chuột nhắt trắng chủng Swiss bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon và độc tính bán trường diễn tiến hành trên chuột cống trắng chủng Wistar. Kết quả: Không xác định được liều gây chết 50% số động vật thí nghiệm (LD50) của viên hoàn Lipid AT, mặc dù cho chuột uống với thể tích và liều cao nhất có thể là 37,5g viên hoàn Lipid AT/1kg thể trọng chuột. Viên hoàn Lipid AT không thể hiện độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng khi cho uống liều 1,05g/kg thể trọng (liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người) và một lô uống liều 3,15g/kg thể trọng chuột/ngày (cao gấp 3 lần liều lâm sàng dùng cho người) trong 12 tuần liên tục. Tất cả các chỉ số theo dõi về tình trạng chung, cân nặng, chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận đều nằm trong giới hạn bình thường, mô bệnh học gan, thận không có sự khác biệt rõ rệt so với lô chứng. **Kết luận**: Viên hoàn cứng Lipid AT không gây độc tính cấp cho chuột nhắt trắng và không làm thay đổi chức năng tạo máu, chức năng gan, thận của chuột thí nghiệm.

Từ khóa: Viên hoàn cứng Lipid AT, độc tính cấp, độc tính bán trường diễn

SAFETY OF"LIPID AT" SOLID TABLETS IN EXPERIMENTAL ANIMALS

Summary:

Objectives: To evaluate the safety of "Lipid AT" solid tablets in experimental animals. **Methods:** Determine the acute toxicity of the drug in white mice with Swiss strain orally according to the method of Litchfield - Wilcoxon and semi-chronic toxicity conducted on white rats of the Wistar strain. **Results:** The lethal dose of 50% of experimental animals (LD50) of Lipid AT tablets was not determined, although the highest possible volume and dose were given to rats, 37.5g of Lipid AT tablets/1kg (mouse body weight). Lipid AT tablets did not show semi-permanent toxicity in white rats when given an oral dose of 1.05g/kg body weight (a dose equivalent to the dose used in humans) and an oral dose of 3.15g/kg (mouse body weight)per day (3 times the clinical dose for humans) for 12

Chịu trách nhiệm chính: Đào Mạnh Hưng
Điện thoại: 0903.05.02.90 Email:
Ngày nhận bài : 18/2/2022
Ngày chấp nhận đăng :……..

consecutive weeks. All monitoring indexes of general condition, weight, hematopoietic function, liver function, kidney function are within normal limits, histopathology of liver, kidney has no significant difference compared to control batch. **Conclusion:** Lipid AT tablets did not cause acute toxicity to white mice and did not change hematopoietic function, liver function, kidney function of laboratory mice.

Keywords: Lipid AT tablets, acute toxicity, semi-permanent toxicity.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rối loạn lipid máu (RLLPM) là tình trạng mất cân bằng, tăng hoặc giảm một hoặc nhiều thành phần của lipoprotein trong máu. RLLPM đã được chứng minh là một yếu tố nguy cơ của nhiều bệnh tim mạch như bệnh mạch vành (BMV), nhồi máu cơ tim, tai biến mạch máu não vì nó khởi đầu cho quá trình hình thành và phát triển của xơ vữa động mạch (XVĐM) làm lòng mạch hẹp dần hoặc tắc hoàn toàn 1, 2.Bài thuốc "Điều đàm thang" có xuất xứ từ "Tế sinh phương" gia thêm các vị Sơn tra, Trạch tả, Hà thủ ô đỏ, Đan sâm, Sài hồ và Đương quy, bài thuốc đã được sử dụng dưới dạng thuốc sắc điều trị RLLPM tại Bệnh viện YHCT Đà Nẵng đạt hiệu quả cao. Nhằm cung cấp thông tin cho việc đánh giá, phân loại mức độ độc của thuốc, thiết lập mức liều cũng như phạm vi an toàn của thuốc, đánh giá khả năng dung nạp của thuốc khi dùng dài ngày, là điều kiện tiên quyết trước khi thử nghiệm lâm sàng giai đoạn 2, chúng tôi tiến hành đánh giá tính an toàn của viên hoàn Lipid AT trên thực nghiệm với 2 mục tiêu sau:

1. Xác định độc tính cấp của viên hoàn Lipid AT trên thực nghiệm.
2. Xác định độc tính bán trường diễn của viên hoàn Lipid AT trên thực nghiệm.

II. CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

2.1. THUỐC NGHIÊN CỨU

- Thuốc nghiên cứu: Viên hoàn Lipid AT.
- Công thức bào chế cho 01 viên hoàn/ 0,5 gam.

Bảng 2.1. Công thức bào chế cho 01 viên hoàn/ 0,5 gam

STT	Tên dược liệu	ĐVT	Hàm lượng	Tiêu chuẩn dược liệu
1	Bán hạ	Miligam	208,33	DĐVN V
2	Cam thảo	Miligam	86,81	DĐVN V
3	Chỉ thực	Miligam	173,61	DĐVN V
4	Đan sâm	Miligam	260,42	DĐVN V
5	Đảng sâm	Miligam	260,42	DĐVN V
6	Đởm nam tinh	Miligam	208,33	Đạt tiêu chuẩn CP 2015

7	Đương quy	Miligam	347,22	DĐVN V
8	Hà thủ ô	Miligam	434,03	DĐVN V
9	Phục linh	Miligam	260,42	DĐVN V
10	Sài hồ	Miligam	260,42	DĐVN V
11	Sơn tra	Miligam	434,03	DĐVN V
12	Thạch xương bồ	Miligam	173,61	DĐVN V
13	Trạch tả	Miligam	260,42	DĐVN V
14	Trần bì	Miligam	173,61	DĐVN V
15	Trúc nhự	Miligam	52,08	Đạt tiêu chuẩn CP 2015

- Tác dụng: Ích khí hoạt huyết hóa đàm, sơ can lợi đởm.

- Chỉ định: Chứng đàm thấp trong các bệnh lý: rối loạn chuyển hóa lipid, vữa xơ động mạch, gan nhiễm mỡ, béo phì.

- Liều dùng: Ngày 3 lần, mỗi lần 5 viên uống sau ăn.

- Nơi sản xuất: Khoa Dược - Bệnh viện Y học cổ truyền thành phố Đà Nẵng.

- Tình trạng mẫu khi nhận: Mẫu ở dạng viên hoàn đóng trong lọ 60 viên/lọ/hộp, hàm lượng 0,5g/viên.

- Tiêu chuẩn khi kiểm nghiệm:

PH: 3,58 Tỷ trọng ở 200C: 1,023 Độ khúc xạ: 1,304

- Cảm quan khi thử thuốc: Viên viên hoàn Lipid AT có màu nâu, vị hơi ngọt, mùi thơm dược liệu.

2.2. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nghiên cứu độc tính cấp

- Chuột nhắt trắng chủng Swiss do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

- Trọng lượng trung bình mỗi con: 20g ± 2g, không phân biệt về giống.

- Chuột khỏe mạnh, đảm bảo các tiêu chuẩn sinh lý bình thường.

- Chuột nhịn ăn 15 giờ trước khi thí nghiệm, nước uống cung cấp đầy đủ.

2.2.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Chuột cống trắng chủng Wistar, khỏe mạnh, cả hai giống, có trọng lượng trung bình 180 ± 20g do Ban chăn nuôi - Học viện Quân y cung cấp.

Động vật được nuôi trong phòng thí nghiệm 3 - 5 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Nghiên cứu độc tính cấp

2.3.1.1. Phương pháp nghiên cứu

- Thử độc tính cấp và xác định liều thấp nhất gây chết 50% (LD50) bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon theo hướng dẫn của WHO.

- Trước khi tiến hành thí nghiệm, cho chuột nhịn ăn qua đêm. Chuột được chia thành các lô khác nhau, mỗi lô 10 con. Cho chuột uống Lipid AT với liều tăng dần trong cùng một thể tích để xác định liều thấp nhất gây chết 50% chuột và liều cao nhất không gây chết chuột (gây chết 0% chuột).

1.3.1.2. Cách tiến hành

* Điều kiện thử vi khí hậu: Nhiệt độ: 250C ± 20C; Độ ẩm: 70% - 80%

* Mẫu thử: Viên hoàn Lipid AT, được nghiền mịn hòa bằng nước cất theo các tỷ lệ khác nhau cho chuột uống..

* Tiến hành:

- Cho chuột uống thuốc thử bằng kim cong đầu tù, đưa thẳng vào dạ dày chuột.

- Thể tích thuốc thử cho uống là 0,25ml/10g thể trọng chuột, uống 3 lần, mỗi lần cách nhau 3 giờ (75ml/kg thể trọng trong 24 giờ).

- Liều quy đổi trên thực nghiệm chính thức: 7,5g; 15,0g; 22,5,0g; 30,0g; 37,5g thuốc /kg thể trọng trong 24 giờ.

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

- Tất cả chuột chết được mổ để đánh giá tổn thương đại thể. Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD50 của thuốc thử.

- Sau 72 giờ, mổ 30% số chuột còn sống trong các lô để đánh giá tổn thương đại thể. Tiếp tục theo dõi tình trạng của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống thuốc.

2.3.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

2.3.2.1. Phương pháp

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng Wistar theo đường uống theo hướng dẫn của WHO đối với thuốc Y học cổ truyền.

2.3.2.2. Cách tiến hành

* Chia lô động vật thực nghiệm

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

- Lô chứng: uống nước cất liều 1ml/100g thể trọng chuột.

- Lô trị 1: Uống thuốc liều 1,05g/kg thể trọng tương đương liều dùng trên người (tính theo hệ số 7 trên chuột cống trắng).

- Lô trị 2: Uống thuốc liều 3,15g/kg thể trọng gấp 3 lần liều dùng trên người (tính theo hệ số 7 trên chuột cống trắng).

Chuột cống trắng được uống nước hoặc thuốc thử liên tục trong 12 tuần liền, mỗi ngày một lần vào buổi sáng. Sau 12 tuần uống thuốc, chuột được ngừng uống thuốc, đánh giá khả năng gây ra độc tính của thuốc.

* Các chỉ tiêu theo dõi trước và trong quá trình nghiên cứu (trước, sau 6 tuần và sau 12 tuần uống thuốc):

- Tình trạng chung, thể trọng của chuột.

- Đánh giá chức phận tạo máu thông qua số lượng hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu.

- Đánh giá chức năng gan, thận thông qua định lượng AST, ALT, GGT, Bilirubin, Cholesterol, Ure và Creatinin trong huyết thanh.

Các thông số theo dõi được kiểm tra vào trước lúc uống thuốc, sau 6 tuần uống thuốc, và sau 12 tuần uống thuốc. Xét nghiệm huyết học được tiến hành tại khoa Nghiên cứu thực nghiệm – Viện Y học cổ truyền Quân đội, xét nghiệm sinh hóa được tiến hành tại Bộ môn Sinh lý lao động - Học viện Quân Y.

- Mô bệnh học:

+ Sau 12 tuần uống thuốc, chuột được mổ để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan.

+ Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, thận của 30% số chuột ở mỗi lô và những chuột có tổn thương đại thể về gan, thận.

+ Các xét nghiệm vi thể gan, thận được thực hiện tại Bộ môn Giải phẫu bệnh - Viện 103 - Học viện Quân Y.

Trường hợp mẫu gây độc, sau khi cho chuột uống mẫu thử 12 tuần ngừng cho uống mẫu thử và tiếp tục nuôi chuột thêm 14 ngày (cho ăn uống bình thường). Tại thời điểm sau ngừng mẫu thử 14 ngày tiến hành lấy máu xác định lại các thông số huyết học, sinh hóa như trên để đánh giá khả năng hồi phục của động vật thực nghiệm.

2.4. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn được thực hiện tại Khoa nghiên cứu thực nghiệm – Viện Y học cổ truyền Quân Đội.

Xét nghiệm sinh hóa được tiến hành tại Bộ môn Sinh lý lao động - Học viện Quân Y. Đánh giá hình thái mô học gan, thận chuột được thực hiện tại Bộ môn Giải phẫu bệnh – Viện 103 – Học viện Quân Y.

2.5. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU

Các số liệu nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê y học, sử dụng phần mềm SPSS 18.0. Số liệu được trình bày dưới dạng ± SD. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

III. KẾT QUẢ

3.1. ĐỘC TÍNH CẤP

* Kết quả thực nghiệm:

Bảng 3.1. Kết quả thực nghiệm

Nhóm chuột (Lô)	Liều dùng (g/kg chuột)	Số chuột thí nghiệm	Tỷ lệ chuột chết (%)	Dấu hiệu bất thường khác
1	Đối chứng	10	0	Không
2	37,5	10	0	Không
3	30,0	10	0	Không
4	22,5	10	0	Không
5	15,0	10	0	Không
6	7,5	10	0	Không

*** Liều thực nghiệm:**

- Liều thấp nhất cho chuột uống trong thực nghiệm trong 24 giờ: 0,075g viên hoàn Lipid AT cho 10g thể trọng chuột

tương đương với 7,5g viên hoàn Lipid AT/1kg thể trọng chuột (gấp 4,6 lần liều dự kiến dùng trên người).

- Liều cao nhất có khả năng cho chuột uống trong thực nghiệm trong 24giờ: 0,375g viên hoàn Lipid AT cho 10g thể trọng chuột tương đương với 37,5g viên hoàn Lipid AT /1kg thể trọng chuột (gấp 22,7 lần liều dự kiến dùng trên người).

*** Diễn biến thực nghiệm:**

- Sau khi uống thuốc thử, các nhóm chuột hoạt động bình thường.

- Các biểu hiện sinh lý: bình thường.

- Không nhận thấy biểu hiện ngộ độc nào trên chuột thí nghiệm trong thời gian theo dõi.

- Sau 72 giờ, các nhóm chuột thí nghiệm đều không có chuột chết. Mổ 30% số chuột còn sống trong các lô: tim, gan, thận, phổi tươi nhuận; dạ dày, ruột hết thuốc.

- Sau 07 ngày, ở các lô thí nghiệm đều không có chuột chết, các biểu hiện sinh lý bình thường

3.2. ĐỘC TÍNH BÁN TRƯỜNG DIỄN

3.2.1. Tình trạng chung và sự thay đổi trọng lượng của chuột

3.2.1.1. Tình trạng chung

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

3.2.1.2. Sự thay đổi trọng lượng chuột

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến trọng lượng chuột

Thời gian	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Trước uống thuốc	175,10 ± 4,80	175,30 ± 3,90	174,30 ± 4,50	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
Sau 6 tuần uống thuốc	198,90 ± 6,00	197,80 ± 5,80	194,60 ± 9,60	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	< 0,01	< 0,01	< 0,01	
Sau 12 tuần uống thuốc	227,90 ± 6,10	225,80 ± 9,20	223,20 ± 12,1	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	< 0,01	< 0,01	< 0,01	

Nhận xét: Kết quả bảng 2.2 cho thấy: sau 6 tuần và 12 tuần uống viên hoàn Lipid AT, trọng lượng chuột ở cả 3 lô (lô chứng và 2 lô trị) đều tăng so với trước khi uống thuốc ($p<0,01$). Không có sự khác biệt về mức độ gia tăng trọng lượng chuột giữa lô chứng và các lô dùng thuốc thử tại cùng thời điểm ($p>0,05$).

3.2.2. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến chức năng tạo máu

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến số lượng hồng cầu trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Số lượng hồng cầu (T/l)			p
	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Trước uống thuốc	8,36 ± 0,88	8,29 ± 0,47	8,63 ± 1,19	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05$
Sau 6 tuần uống thuốc	8,91 ± 0,24	8,37 ± 1,83	8,71 ± 0,99	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 12 tuần uống thuốc	8,94 ± 0,39	9,07 ± 1,47	9,06 ± 0,70	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Hàm lượng huyết sắc tố (g/dl)			p
	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Trước uống thuốc	14,73 ± 1,42	14,14 ± 1,33	14,15 ± 1,15	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05$
Sau 6 tuần uống thuốc	15,16 ± 1,59	14,55 ± 2,21	14,60 ± 0,88	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 12 tuần uống thuốc	15,43 ± 0,61	15,05 ± 2,22	15,08 ± 1,14	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Kết quả ở các bảng 2.3; 2.4 cho thấy sau 6 tuần và 12 tuần uống viên hoàn Lipid AT, số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố ở cả lô trị 1 (uống thuốc liều 1,05g/kg thể trọng tương đương liều dùng trên người và lô trị 2 (uống thuốc liều 3,15g/kg thể trọng gấp 3 lần liều dùng trên người) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước, sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến Hematocrit trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Hematocrit (%)			p
	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Trước uống thuốc	41,76 ± 5,08	38,68 ± 4,18	39,31 ± 4,54	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3}$ > 0,05
Sau 6 tuần uống thuốc	43,10 ± 3,22	38,93 ± 5,86	41,62 ± 3,41	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3}$ > 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 12 tuần uống thuốc	43,80 ± 1,75	39,80 ± 7,80	42,65 ± 3,66	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3}$ > 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến thể tích trung bình hồng cầu (MCV) trong máu chuột cống trắng

Thời gian	MCV (fl)			p
	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Trước uống thuốc	49,20 ± 1,66	48,14 ± 2,43	47,79 ± 3,69	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3}$ > 0,05
Sau 6 tuần uống thuốc	49,49 ± 1,09	47,08 ± 5,67	48,36 ± 1,95	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3}$ > 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 12 tuần uống thuốc	49,21 ± 0,88	46,72 ± 4,63	48,09 ± 2,26	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3}$ > 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Kết quả ở các bảng 2.5; 2.6 cho thấy sau 6 tuần và 12 tuần uống viên hoàn Lipid AT, hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu ở cả lô trị 1 (uống thuốc liều 1,05g/kg thể trọng tương đương liều dùng trên người) và lô trị 2 (uống thuốc liều 3,15g/kg thể trọng gấp 3 lần liều dùng trên người) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước, sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến số lượng bạch cầu trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Số lượng bạch cầu (G/l)			p
	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Trước uống thuốc	9,32 ± 1,83	10,32 ± 2,77	10,65 ± 1,76	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
Sau 6 tuần uống thuốc	9,60 ± 1,03	10,80 ± 2,19	10,52 ± 1,36	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 12 tuần uống thuốc	9,34 ± 1,09	10,29 ± 2,67	10,21 ± 1,69	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến công thức bạch cầu trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Công thức bạch cầu (%)	Lô chuột			p
		Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Trước uống thuốc	Lympho	63,12 ± 7,50	61,08 ± 6,77	62,05± 7,52	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
	Trung tính	30,01 ± 6,85	33,37 ± 7,06	34,66 ± 7,30	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
Sau 6 tuần uống thuốc	Lympho	60,28 ± 5,85	57,87 ± 8,93	62,49 ± 7,82	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
	Trung tính	31,93 ± 5,70	34,25 ± 8,26	30,74 ± 5,78	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
p (trước – sau)		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 12 tuần uống thuốc	Lympho	59,71 ± 8,45	55,50 ± 8,41	59,58 ± 8,95	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
	Trung tính	34,42 ± 4,66	36,85 ± 7,81	32,75 ± 7,91	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
p (trước – sau)		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến số lượng tiểu cầu trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Số lượng tiểu cầu (G/l)			p
	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Trước uống thuốc	423,10 ± 66,43	391,90 ± 62,10	407,20 ± 81,88	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05$
Sau 6 tuần uống thuốc	426,50 ± 87,14	400,00 ± 80,17	381,00 ± 84,15	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 12 tuần uống thuốc	401,60 ± 82,90	427,40 ± 76,68	428,90 ± 74,00	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Kết quả ở các bảng 2.7; 2.8; 2.9 cho thấy sau 6 tuần và 12 tuần uống viên hoàn Lipid AT, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu ở cả lô trị 1(uống thuốc liều 1,05g/kg thể trọng tương đương liều dùng trên người và lô trị 2(uống thuốc liều 3,15g/kg thể trọng gấp 3 lần liều dùng trên người) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước, sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

3.2.3. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến chức năng gan

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến hoạt độ AST (GOT) trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Hoạt độ AST (U/l)			p
	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Trước uống thuốc	175,57 ± 39,20	186,01 ± 41,01	194,74 ± 41,92	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05$
Sau 6 tuần uống thuốc	191,88 ± 35,20	188,92 ± 33,62	198,72 ± 38,21	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 12 tuần uống thuốc	175,04 ± 40,63	171,36 ± 28,08	171,00 ± 27,92	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến hoạt độ ALT (GPT) trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Hoạt độ ALT (U/l)			p
	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Trước uống thuốc	63,65 ± 9,63	64,70 ± 10,30	61,27 ± 8,26	P_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05
Sau 6 tuần uống thuốc	59,00 ± 7,04	58,01 ± 7,49	57,21 ± 4,20	P_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 12 tuần uống thuốc	55,71 ± 9,78	61,03 ± 10,73	61,01 ± 7,71	P_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến hoạt độ Protein toàn phần trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Protein toàn phần (g/l)			p
	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Trước uống thuốc	109,66 ± 9,05	113,10 ± 4,38	114,40 ± 4,70	P_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05
Sau 6 tuần uống thuốc	117,70 ±16,79	117,60 ± 16,34	117,00 ± 16,61	P_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 12 tuần uống thuốc	108,90 ± 13,67	114,10 ± 14,41	110,50 ± 12,43	P_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3} > 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Kết quả ở các bảng 2.10; 2.11; 2.12 cho thấy sau 6 tuần và 12 tuần uống viên hoàn Lipid AT, các xét nghiệm đánh giá chức năng gan (hoạt độ GOT, GPT, Protein toàn phần) trong máu chuột ở cả cả lô trị 1 (uống thuốc liều 1,05g/kg thể trọng tương đương liều dùng trên người) và lô trị 2 (uống thuốc liều 3,15g/kg thể trọng gấp 3 lần liều dùng trên người) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước, sau khi uống thuốc thử (p > 0,05).

3.2.4. Ảnh hưởng thuốc viên hoàn Lipid AT đến chức năng thận

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của viên hoàn Lipid AT đến hàm lượng Creatinin trong máu chuột cống trắng

Thời gian	*Creatinin (µmol/L)*			p
	Lô chứng (1)	*Lô trị 1 (2)*	*Lô trị 2 (3)*	
Trước uống thuốc	88,82 ± 9,38	91,07 ± 7,35	91,03 ± 8,32	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
Sau 6 tuần uống thuốc	86,16 ± 6,41	86,19 ± 8,43	88,80 ± 12,77	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 12 tuần uống thuốc	88,74 ± 7,33	90,71 ± 9,86	91,25 ± 9,56	$p_{1-2;}\ p_{1-3;}\ p_{2-3} > 0,05$
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Kết quả ở bảng 2.13 cho thấy sau 6 tuần và 12 tuần uống viên hoàn Lipid AT, ở cả lô trị 1 (uống thuốc liều 1,05g/kg thể trọng tương đương liều dùng trên người và lô trị 2 (uống thuốc liều 3,15g/kg thể trọng gấp 3 lần liều dùng trên người) nồng độ Creatinin toàn phần trong máu chuột không có sự thay đổi khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước, sau uống thuốc thử (p > 0,05).

3.2.5. Kết quả mô bệnh học

3.2.5.1. Đại thể

Trên tất cả các chuột thực nghiệm (cả lô chứng và 2 lô trị), không quan sát thấy có thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan tim, phổi, gan, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá của chuột cống.

* Hình ảnh đại thể thận chuột cống trắng thực nghiệm



Ảnh 3.1. Hình ảnh đại thể thận chuột cống trắng lô đối chứng (06)



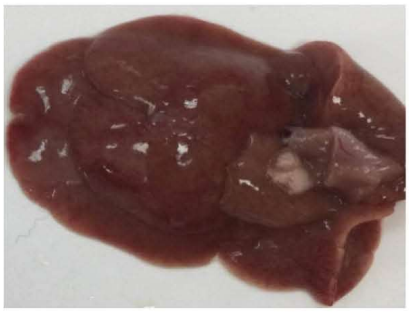
Ảnh 3.2. Hình ảnh đại thể thận chuột cống trắng lô trị 1 (17)



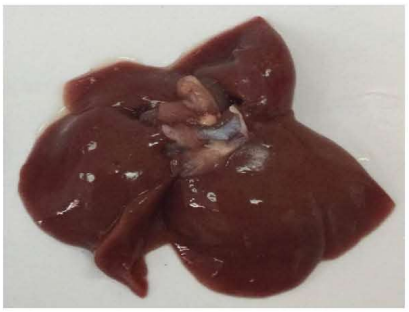
Ảnh 3.3. Hình ảnh đại thể thận chuột cống trắng lô trị 2 (25)

Nhận xét: Không thấy sự khác biệt hình ảnh đại thể thận ở các chuột tại các lô đối chứng uống nước cất, lô trị 1 và lô trị 2 uống viên hoàn Lipid AT với liều có tác dụng tương đương trên người (tính theo hệ số 7) và liều gấp 3 lần liều điều trị trên người. Bề mặt thận nhẵn, bóng đều, màu nâu đỏ đồng nhất, không thấy xuất huyết, đàn hồi khi ấn.

* Hình ảnh đại thể gan chuột cống trắng thực nghiệm



Ảnh 3.4. Hình ảnh đại thể gan chuột cống trắng lô đối chứng (06)



Ảnh 3.5. Hình ảnh đại thể gan chuột cống trắng lô trị 1 (17)



Ảnh 3.6. Hình ảnh đại thể gan chuột cống trắng lô trị 2 (25)

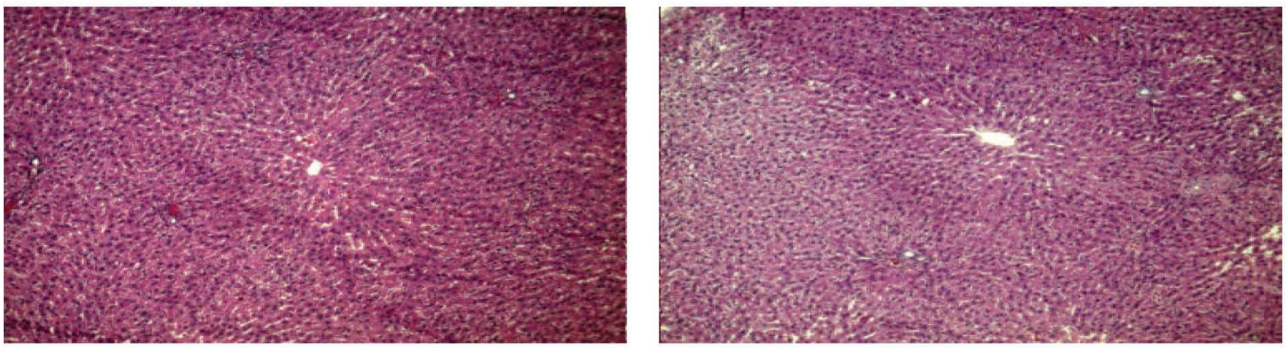
Nhận xét: Không thấy sự khác biệt hình ảnh đại thể gan ở các chuột tại các lô đối chứng uống nước cất, lô trị 1 và lô trị 2 uống viên hoàn Lipid AT với liều có tác dụng tương đương trên người (tính theo hệ số 7) và liều gấp 3 lần liều điều trị trên người. Bề mặt gan nhẵn, bóng đều, màu nâu đỏ đồng nhất, không có u cục, không xuất huyết, đàn hồi khi ấn.

3.2.5.2. Vi thể

* Hình thái vi thể gan

+ Lô chứng: Dưới kính hiển vi độ phóng đại 200 nhận thấy, một số tế bào gan bị thoái hóa hạt, một vài tế bào thoái hóa rỗ, tĩnh mạch trung tâm và các xoang mạch nan hoa xung huyết, khoảng cửa còn rõ cấu trúc.

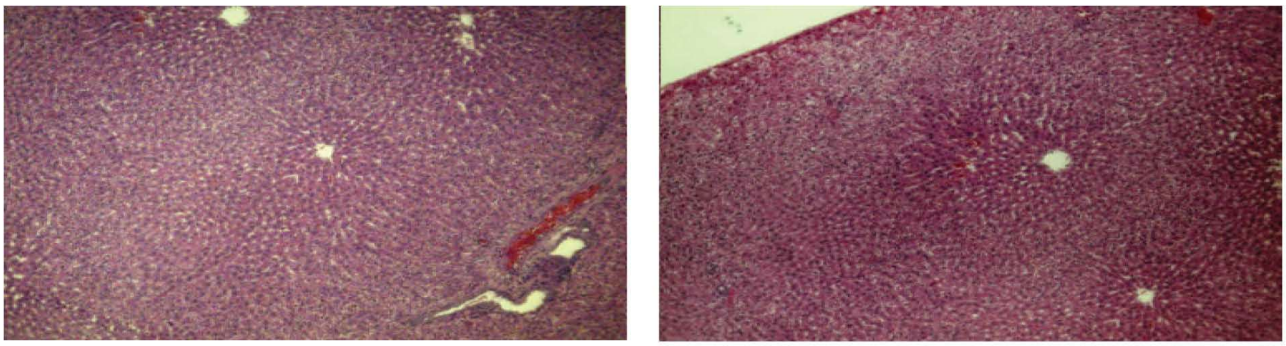
Kết luận: hình ảnh gan bình thường.



Ảnh 3.7. Hình thái vi thể gan chuột cống (số 05) lô chứng (HE x 200)

+ Lô trị 1: Dưới kính hiển vi độ phóng đại 200 lần nhận thấy, một số tế bào gan bị thoái hóa hạt, một vài tế bào thoái hóa rỗ, tĩnh mạch trung tâm và các xoang mạch nan hoa xung huyết nhẹ, khoảng cửa còn rõ cấu trúc.

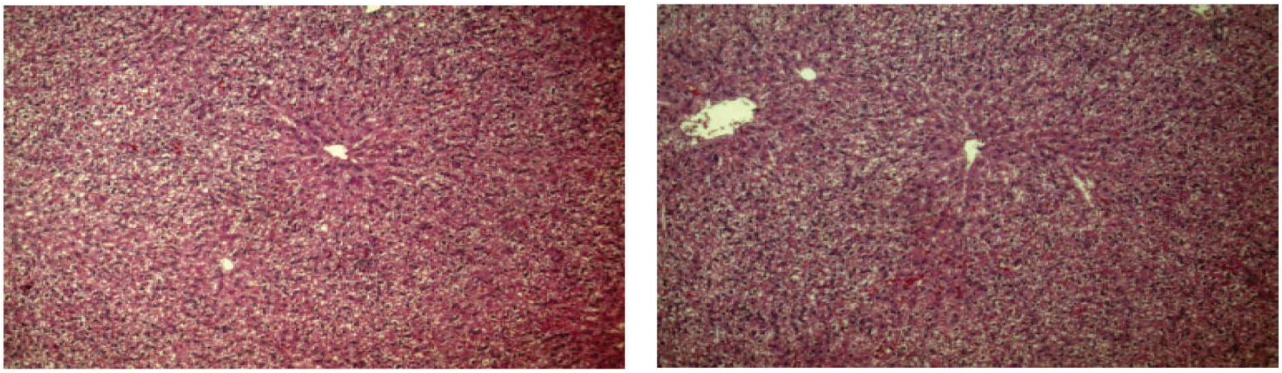
Kết luận: hình ảnh gan bình thường.



Ảnh 3.8. Hình thái vi thể gan chuột cống (số 19) lô trị 1 (HE x 200)

+ Lô trị 2: Dưới kính hiển vi độ phóng đại 200 đến 400 lần nhận thấy, một số tế bào gan bị thoái hóa hạt, tĩnh mạch trung tâm và các xoang mạch nan hoa xung huyết nhẹ, khoảng cửa còn rõ cấu trúc.

Kết luận: hình ảnh gan bình thường.



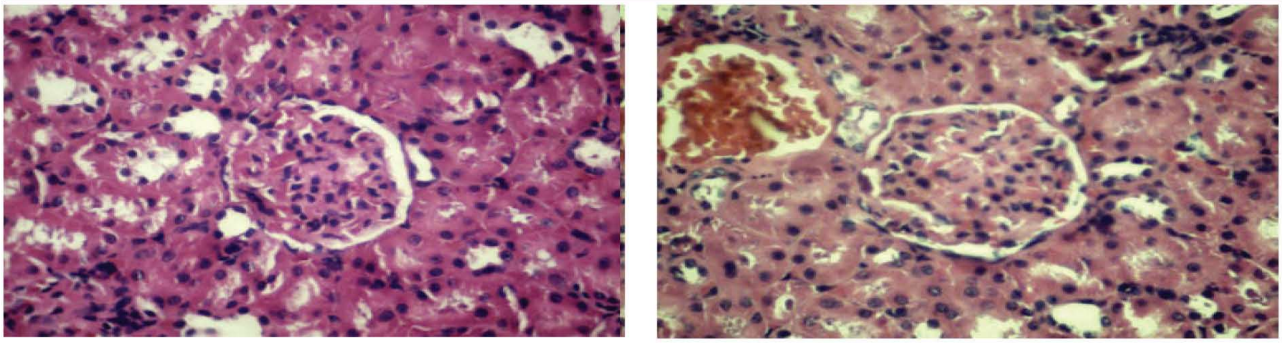
Ảnh 3.9. Hình thái vi thể gan chuột cống (số 21) lô trị 2 (HE x 200)

Nhận xét: Hình ảnh vi thể gan lô trị 1 và lô trị 2, chưa nhận thấy khác biệt so với lô đối chứng.

* Hình thái vi thể thận

+ Lô chứng: Dưới kính hiển vi độ phóng đại 400 lần nhận thấy, các cầu thận nở to, các cuộn mạch xung huyết nhẹ, lòng chứa hồng cầu, khoang Bowman chứa dịch trong. Biểu mô ống thận thoái hóa hạt, các ống thận chứa nước tiểu trong. Mô kẽ có các mạch máu xung huyết.

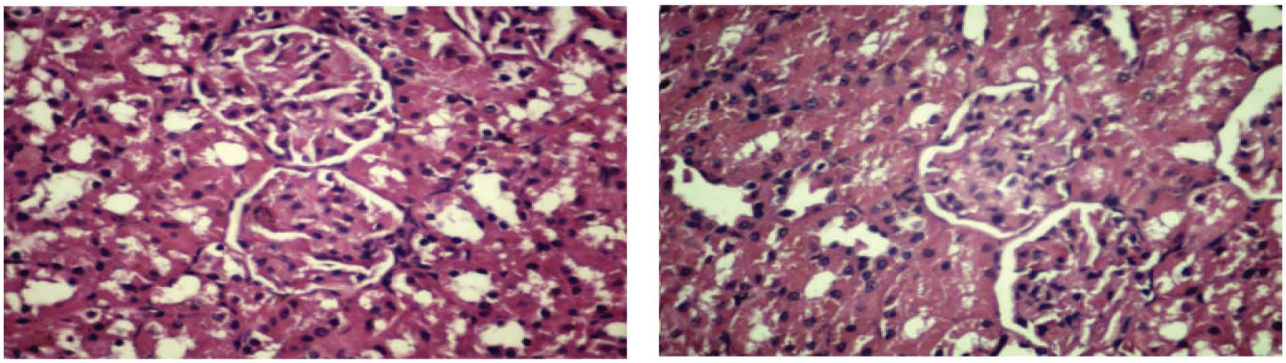
Kết luận: hình ảnh thận bình thường.



Ảnh 3.10. Hình thái vi thể thận chuột cống (số 02) lô chứng (HE x 400)

+ Lô thử 1: Dưới kính hiển vi độ phóng đại 400 lần nhận thấy, các cầu thận nở to, các cuộn mạch xung huyết nhẹ, lòng chứa hồng cầu, khoang Bowman chứa dịch trong. Biểu mô ống thận thoái hóa hạt, các ống thận chứa nước tiểu trong. Mô kẽ có các mạch máu xung huyết.

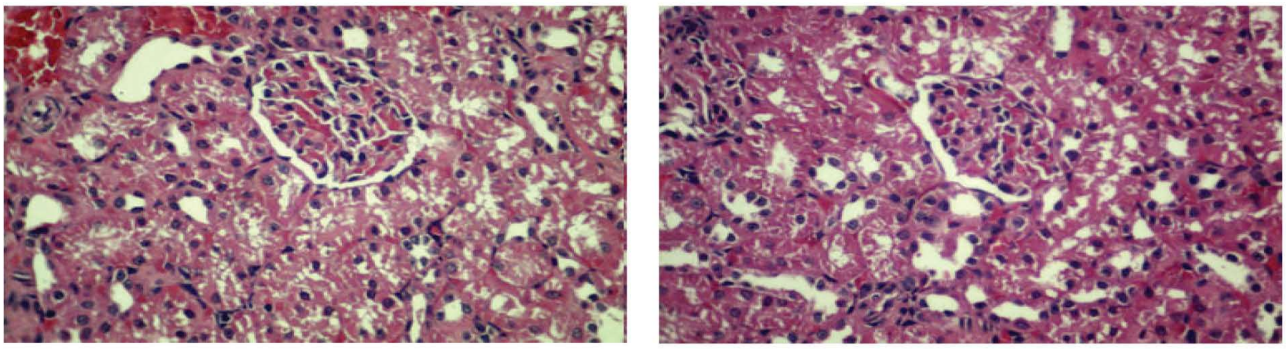
Kết luận: Hình ảnh thận bình thường.



Ảnh 3.11. Hình thái vi thể thận chuột cống (số 15) lô thử 1 (HE x 400)

+ Lô thử 2: Dưới kính hiển vi độ phóng đại 400 lần nhận thấy, các cầu thận nở to, các cuộn mạch xung huyết nhẹ, lòng chứa hồng cầu, khoang Bowman chứa dịch trong. Biểu mô ống thận thoái hóa hạt, các ống thận chứa nước tiểu trong. Mô kẽ có các mạch máu xung huyết.

Kết luận: Hình ảnh thận bình thường.



Ảnh 3.12. Hình thái vi thể thận chuột cống (số 26) lô trị 2 (HE x 400)

Nhận xét: Hình ảnh vi thể thận lô trị 1 và lô trị 2, chưa nhận thấy khác biệt so với lô đối chứng.

*** Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn của viên hoàn Lipid AT:**

Trên cả hai lô chuột, một lô uống viên hoàn Lipid AT lô trị 1 (uống thuốc liều 1,05g/kg thể trọng tương đương liều dùng trên người và lô trị 2 (uống thuốc liều 3,15g/kg thể trọng gấp 3 lần liều dùng trên người) liên tục trong 12 tuần, kết quả cho thấy:

- Cả hai liều thuốc thử không làm ảnh hưởng xấu đến tình trạng chung, mức độ tăng trọng lượng của chuột.

- Không làm thay đổi kết quả các xét nghiệm đánh giá chức năng tạo máu (số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu , số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu).

- Không làm thay đổi kết quả một số xét nghiệm đánh giá chức năng gan (hoạt độ AST, ALT, Protein toàn phần).

- Không làm thay đổi kết quả xét nghiệm đánh giá chức năng thận (Creatinin huyết thanh).

- Không gây tổn thương rõ rệt về mặt hình thái khi quan sát đại thể các cơ quan của chuột.

- Cấu trúc vi thể gan, thận của chuột: cả hai liều không ảnh hưởng đến cấu trúc vi thể gan, thận của chuột. Hình ảnh vi thể gan và thận của chuột không có sự khác biệt giữa lô chứng và 2 lô uống viên hoàn Lipid AT trong 12 tuần liên tục.

IV. KẾT LUẬN

4.1. ĐỘC TÍNH CẤP

Không xác định được liều gây chết 50% số động vật thí nghiệm (LD50) của viên hoàn Lipid AT, mặc dù cho chuột uống với thể tích và liều cao nhất có thể là 37,5g viên hoàn Lipid AT/1kg thể trọng chuột.

4.2. ĐỘC TÍNH BÁN TRƯỜNG DIỄN

Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng thực nghiệm trong thời gian 12 tuần của viên hoàn Lipid AT cho thấy:

- Viên hoàn Lipid AT không thể hiện độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng khi cho chuột cống trắng uống liều 1,05g/kg thể trọng (liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người) và một lô uống liều 3,15g/kg thể trọng chuột/ngày (cao gấp 3 lần liều lâm sàng dùng cho người) trong 12 tuần liên tục uống thuốc.

- Tất cả các chỉ số theo dõi về tình trạng chung, cân nặng, chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận đều nằm trong giới hạn bình thường, mô bệnh học gan, thận không có sự khác biệt rõ rệt so với lô chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (1996), Quyết định số 371/BYT - QĐ ngày 12/03/1996 về việc ban hành "Quy chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực thuốc cổ truyền".

2. Bộ Y tế (2006), Phương pháp nghiên cứu tác dụng của thuốc từ thảo dược, NXB Y học.

3. Hướng dẫn kèm theo Quyết định 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 "Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu".

4. Gerhard Vogel H. (2008), Drug discovery and evaluation Pharmacological assays, Springer.

5. General guidelines for methodologies on research and evaluational of traditional medicine, World Health Organization 2000.

6. OECD Guidelines for the testing of chemicals (407), Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents, OECD (2008).

7. Principles and Methods of Toxicology, Wallace Hayes, Raven Press, 2001.

8. 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.