

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA VIÊN NANG CỨNG AN PHỤ KHANG PLUS TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM

Đặng Thị Thu Hiền✉, Trần Thanh Tùng

Trường Đại học Y Hà Nội

Nghiên cứu độc tính cấp được đánh giá trên chuột nhắt trắng theo hướng dẫn của WHO và xác định LD_{50} theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon. Độc tính bán trường diễn của viên nang cứng An Phụ Khang Plus (APKP) tiến hành trên chuột cống trắng, trong đó, chuột được chia làm 3 lô: chứng sinh học, lô uống APKP liều 0,745 g/kg/ngày và 2,235 g/kg/ngày trong vòng 4 tuần. Chuột được lấy máu ở các thời điểm trước nghiên cứu, sau 2 tuần và 4 tuần nghiên cứu để đánh giá chức năng tạo máu. Giải phẫu bệnh gan, thận được đánh giá tại thời điểm kết thúc nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu cho thấy: Chuột nhắt trắng được uống đến liều tối đa 38,8 g/kg không có biểu hiện độc tính cấp, chưa xác định được LD_{50} của APKP. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn ở 2 mức liều không có sự thay đổi về tình trạng chung, chức năng tạo máu, chức năng và cấu trúc thận trên chuột cống trong thời gian nghiên cứu. Tuy nhiên, thay đổi mô bệnh học gan được quan sát ở liều cao, cần có nghiên cứu sâu hơn để đánh giá ảnh hưởng của APKP trên mô bệnh học của gan.

Từ khóa: An Phụ Khang Plus, độc tính cấp, độc tính bán trường diễn.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Để có thể tiến hành thử nghiệm thuốc hay một chế phẩm mới trên người, nhất thiết phải có các nghiên cứu khẳng định được tính an toàn và hiệu quả trước đó trên động vật thực nghiệm. Đánh giá độc tính bao gồm nghiên cứu độc tính cấp, độc tính dài hạn, độc tính tại chỗ, độc tính trên sinh sản và phát triển, độc tính sinh miễn dịch... Trong đó, nghiên cứu độc tính cấp và nghiên cứu độc tính bán trường diễn (là một loại của nghiên cứu dài hạn) có vai trò quan trọng trong thử nghiệm lâm sàng phát triển các thuốc dược liệu. Viên nang cứng An Phụ Khang Plus (gọi tắt là APKP) bao gồm 15 vị dược liệu. Đây là chế phẩm được dùng để hỗ trợ điều trị u xơ tử cung, u nang buồng trứng dựa trên tác dụng của các vị dược liệu có trong

thành phần.¹⁻³ Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào khẳng định tính an toàn của sự kết hợp các thành phần dược liệu này. Do đó, để chứng minh sự kết hợp trên đảm bảo tính an toàn khi sử dụng chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu này với mục tiêu: *Xác định độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của viên nang cứng An Phụ Khang Plus trên động vật thực nghiệm.*

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng nghiên cứu

Thuốc nghiên cứu: Viên nang cứng APKP hàm lượng 0,69 g/viên, được sản xuất tại Công ty dược phẩm và thương mại Phương Đông.

Động vật nghiên cứu

Chuột cống trắng chủng *Wistar*, khỏe mạnh, cả 2 giống, trọng lượng 200 ± 20 g, do Trung tâm cung cấp động vật thí nghiệm Đan Phượng - Hà Nội cung cấp.

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss*, khỏe mạnh, cả 2 giống, trọng lượng 20 ± 2 g để nghiên cứu xác định độc tính cấp. Động vật được nuôi 5 - 7

Tác giả liên hệ: Đặng Thị Thu Hiền

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: thuhien@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 22/07/2022

Ngày được chấp nhận: 22/08/2022

Bảng 1. Thành phần chế phẩm nghiên cứu cho 1 viên nang cứng

Tên dược liệu	Hàm lượng mg/viên	Tên dược liệu	Hàm lượng mg/viên
Cao Trinh nữ hoàng cung	350mg	Cao Củ mài đắng	20mg
Cao Náng hoa trắng	100mg	Cao Hương phụ	20mg
Cao Tỏa dương	30mg	Cao Tam lăng	20mg
Cao Xuyên khung	30mg	Cao Nga truyệt	20mg
Cao Bồ quân	30mg	Cao Sinh địa	10mg
Cao Đương quy	20mg	Cao Xích thược	10mg
Cao Hồng hoa	20mg	Curcumin nano	5mg
		Bột Tam thất	5mg

ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu được ăn thức ăn chuẩn, uống nước tự do tại phòng thí nghiệm của Bộ môn Dược lý - Trường Đại học Y Hà Nội.

2. Thuốc, hóa chất, máy móc phục vụ nghiên cứu

Kit định lượng các enzym và chất chuyển hoá trong máu: ALT (alanin aminotransferase), AST (aspartat aminotransferase), Bilirubin toàn phần, Albumin, Cholesterol toàn phần, Creatinin của hãng Erba, định lượng trên máy sinh hóa bán tự động Erba của Ấn Độ.

Các dung dịch xét nghiệm máu của hãng Horiba ABX, định lượng trên máy Horiba ABX Micros của Pháp.

Các hóa chất xét nghiệm và làm tiêu bản mô bệnh học đạt tiêu chuẩn thí nghiệm.

3. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu độc tính cấp

Nghiên cứu độc tính cấp được tiến hành theo hướng dẫn của WHO và xác định LD₅₀ theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon.⁴

Chuột nhắt trắng trọng lượng 20 ± 2g được chia thành từng lô, mỗi lô 10 con. Cho chuột uống thuốc thử APKP với liều tăng dần (trong cùng một thể tích) để xác định liều thấp nhất

gây chết 100% chuột và liều cao nhất không gây chết chuột (gây chết 0% chuột). Chuột được nhịn ăn 12 giờ trước khi uống thuốc thử, vẫn uống nước đầy đủ. Theo dõi tình trạng chung (ăn uống, hoạt động thần kinh, đi lại, bài tiết...), các dấu hiệu nhiễm độc (nôn, co giật, kích động...), số chuột chết trong 72 giờ đầu sau uống thuốc thử (nếu có). Nếu chuột chết, mổ chuột để đánh giá đại thể tổn thương của các cơ quan. Sau đó theo dõi tình trạng chung của chuột đến hết ngày thứ 7 sau uống thuốc. Xác định liều chết 50% (LD₅₀) theo tỷ lệ chuột chết trong vòng 72 giờ đầu.

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của viên nang cứng An Phụ Khang Plus trên chuột cống trắng theo đường uống được tiến hành theo hướng dẫn của WHO⁵:

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

- Lô 1 (chứng sinh học) (n = 10): uống nước cất 10 mL/kg/ngày.

- Lô trị 1 (APKP liều thấp) (n = 10): uống APKP liều 0,745 g/kg/ngày (liều có tác dụng tương đương liều dự kiến trên người, tính theo hệ số 6).

- Lô trị 2 (APKP liều cao) (n = 10): uống APKP liều 2,235 g/kg/ngày (gấp 3 lần liều lô trị 1).

Chuột được uống nước hoặc thuốc thử bằng kim đầu tù trong 4 tuần liên tục, mỗi ngày một lần vào buổi sáng. Các chỉ tiêu theo dõi trước và trong quá trình nghiên cứu:

- Tình trạng chung, thể trọng của chuột.
- Đánh giá chức phận tạo máu thông qua số lượng hồng cầu, thể tích trung bình hồng cầu, hàm lượng Hemoglobin, Hematocrit, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu.
- Đánh giá chức năng gan thông qua định lượng một số chất chuyển hoá trong máu: Bilirubin toàn phần, Albumin và Cholesterol toàn phần.
- Đánh giá tổn thương tế bào gan thông qua định lượng hoạt độ enzym trong máu: ALT, AST.
- Đánh giá chức năng thận thông qua định lượng nồng độ Creatinin huyết thanh.
- Các thông số theo dõi được kiểm tra vào

trước lúc uống thuốc, sau 2 tuần uống thuốc, sau 4 tuần uống thuốc.

- Mô bệnh học: sau 4 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.

Các xét nghiệm vi thể được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu và phát hiện sớm ung thư (do PGS.TS. Lê Đình Roanh đọc kết quả vi thể).

4. Xử lý số liệu

Số liệu được nhập và xử lý bằng phương pháp và thuật toán thống kê y sinh học trên phần mềm Microsoft Excel. Số liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Kiểm định các giá trị bằng t-test Student và test trước sau (Avant-après). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p \leq 0,05$.

	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,001$
Khác biệt so với lô chứng sinh học	*	**	***
Khác biệt so với lô mô hình	+	++	+++

III. KẾT QUẢ

1. Nghiên cứu độc tính cấp

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của APKP

Lô chuột	n	Liều (mL/kg)	Liều dùng (g/kg)	Tỷ lệ chết (%)	Dấu hiệu bất thường khác
Lô 1	10	30	15,5	0	Không
Lô 2	10	45	23,3	0	Không
Lô 3	10	60	31,1	0	Không
Lô 4	10	75	38,8	0	Không

Chuột nhất trắng được uống APKP với liều tăng dần từ 15,5 g/kg/ngày đến 38,8 g/kg/ngày, sau khi uống thuốc thử, chuột ở tất cả các lô ăn uống, hoạt động và bài tiết bình thường. Không thấy có biểu hiện ngộ độc ở chuột và không

có chuột nào chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc. Tiếp tục theo dõi trong 7 ngày sau uống thuốc, thấy chuột hoàn toàn bình thường, không có biểu hiện gì đặc biệt. Do không thể tăng độ đậm đặc của thuốc cũng như không

thể tăng thể tích cho chuột uống nên chưa xác định được độc tính cấp và chưa tính được LD₅₀ của APKP trên chuột nhắt trắng theo đường uống.

2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng chuột

Tình trạng chung: Trong thời gian nghiên cứu, chuột ở cả 3 lô hoạt động bình thường, ăn uống tốt, nhanh nhẹn, mắt sáng, phân khô.

Sự thay đổi thể trọng chuột

Bảng 3. Ảnh hưởng của viên nang An Phụ Khang Plus đến thể trọng chuột

Thời gian	Lô chứng		Lô trị 1		Lô trị 2		p (t-test Student)
	Trọng lượng (g)	% thay đổi trọng lượng	Trọng lượng (g)	% thay đổi trọng lượng	Trọng lượng (g)	% thay đổi trọng lượng	
Trước uống thuốc	199,00 ± 46,77		205,00 ± 39,79		208,00 ± 20,98		> 0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	238,00 ± 46,62	↑19,6	249,00 ± 47,71	↑17,7	238,00 ± 35,84	↑14,4	> 0,05
p trước - sau	< 0,05		< 0,05		< 0,05		
Sau 4 tuần uống thuốc	250,00 ± 55,38	↑25,6	259,00 ± 50,65	↑26,3	253,00 ± 45,47	↑21,6	> 0,05
p trước - sau	< 0,05		< 0,05		< 0,05		

Sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc thử, trọng lượng chuột ở cả 3 lô (lô chứng và 2 lô trị) đều tăng so với trước khi nghiên cứu. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt về mức độ gia tăng trọng lượng chuột giữa lô chứng và các lô dùng thuốc thử ($p > 0,05$).

Đánh giá chức năng tạo máu

Bảng 4. Ảnh hưởng của viên nang An Phụ Khang Plus đến số lượng hồng cầu

Thời gian	Số lượng hồng cầu (T/l)			p (t- test Student)
	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	
Trước uống thuốc	8,99 ± 1,13	9,56 ± 0,90	9,18 ± 1,00	> 0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	9,93 ± 1,19	10,59 ± 0,93	9,63 ± 0,74	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	8,91 ± 0,83	8,62 ± 1,02	8,44 ± 1,28	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Bảng 5. Ảnh hưởng của viên nang An Phụ Khang Plus đến hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột

Thời gian	Hàm lượng huyết sắc tố (g/dl)			p (t- test Student)
	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	
Trước uống thuốc	13,79 ± 1,13	14,36 ± 2,23	14,64 ± 1,28	> 0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	14,41 ± 1,48	15,45 ± 0,96	14,37 ± 1,34	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	14,14 ± 1,46	13,21 ± 1,57	13,76 ± 2,45	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Bảng 6. Ảnh hưởng của viên nang An Phụ Khang Plus đến Hematocrit

Thời gian	Hematocrit (%)			p (t- test Student)
	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	
Trước uống thuốc	46,67 ± 4,16	45,30 ± 3,67	50,34 ± 5,28	> 0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	49,54 ± 7,13	48,92 ± 4,27	51,84 ± 4,63	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	46,50 ± 4,25	46,46 ± 6,56	49,38 ± 10,05	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Bảng 7. Ảnh hưởng của viên nang An Phụ Khang Plus đến thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột

Thời gian	Thể tích trung bình hồng cầu (fl)			p (t- test Student)
	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	
Trước uống thuốc	53,50 ± 2,12	54,90 ± 1,73	54,80 ± 1,75	> 0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	54,20 ± 1,87	53,60 ± 1,58	53,70 ± 2,50	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	52,30 ± 1,16	52,80 ± 4,08	53,50 ± 4,03	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở các bảng 4, 5, 6 và 7 cho thấy: sau 2 tuần và 4 tuần uống APKP, 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) ở cả lô trị 1 (uống

APKP liều 0,745 g/kg/ngày) và lô trị 2 (uống APKP liều 2,235 g/kg/ngày) không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

Bảng 8. Ảnh hưởng của viên nang An Phụ Khang Plus đến số lượng bạch cầu trong máu chuột

Thời gian	Số lượng bạch cầu (G/l)			p (t- test Student)
	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	
Trước uống thuốc	8,61 ± 2,75	10,13 ± 2,82	8,74 ± 2,47	> 0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	8,95 ± 2,11	9,14 ± 1,97	9,46 ± 2,21	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	9,07 ± 2,29	9,21 ± 2,29	9,14 ± 2,70	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Bảng 9. Ảnh hưởng của viên nang An Phụ Khang Plus đến công thức bạch cầu trong máu chuột

Thời gian	Công thức bạch cầu					
	Lô chứng		Lô trị 1		Lô trị 2	
	Lympho (%)	Trung tính (%)	Lympho (%)	Trung tính (%)	Lympho (%)	Trung tính (%)
Trước uống thuốc	81,02 ± 3,34	5,42 ± 1,02	79,01 ± 3,75	5,59 ± 1,73	78,52 ± 4,95	6,29 ± 2,17
Sau 2 tuần uống thuốc	79,87 ± 4,60	6,12 ± 1,97	79,39 ± 4,35	5,12 ± 1,54	79,14 ± 8,14	5,32 ± 1,82
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 4 tuần uống thuốc	79,35 ± 3,84	6,35 ± 1,63	78,47 ± 6,31	6,32 ± 1,40	74,92 ± 10,94	6,63 ± 2,09
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

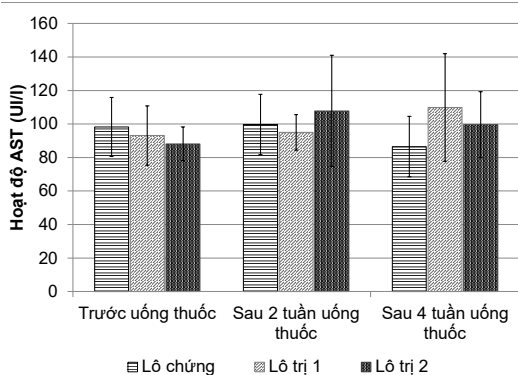
Bảng 10. Ảnh hưởng của viên nang An Phụ Khang Plus đến số lượng tiểu cầu trong máu chuột

Thời gian	Số lượng tiểu cầu (G/l)			p (t- test Student)
	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	
Trước uống thuốc	623,30 ± 125,25	565,20 ± 83,78	657,80 ± 146,08	> 0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	680,30 ± 190,71	675,90 ± 207,99	620,10 ± 132,92	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	570,60 ± 141,62	502,90 ± 118,87	534,50 ± 138,48	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

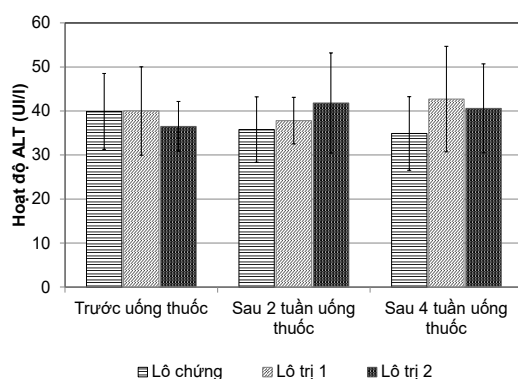
Kết quả ở bảng 8, 9 và 10 cho thấy: sau 2 tuần và 4 tuần uống APKP, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu ở cả lô trị 1 và lô trị 2 không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của viên nang An Phụ Khang Plus đến mức độ tổn thương tế bào gan và chức năng gan

Đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan



Biểu đồ 1. Ảnh hưởng của APKP đến hoạt độ AST (GOT) trong máu chuột



Biểu đồ 2. Ảnh hưởng của APKP đến hoạt độ ALT (GPT) trong máu chuột

Kết quả ở các biểu đồ 1, 2 cho thấy: sau 2 tuần và 4 tuần uống APKP, hoạt độ AST, ALT trong máu chuột ở cả 2 lô trị đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

Đánh giá chức năng tế bào gan

Bảng 11. Ảnh hưởng của viên nang An Phụ Khang Plus đến chức năng gan, thận

Chỉ số	Lô (n = 10)	Trước NC ($\bar{X} \pm SD$)	Sau 2 tuần ($\bar{X} \pm SD$)	Sau 4 tuần ($\bar{X} \pm SD$)	p (t- test Student)
Albumin (g/dL)	Lô chứng	3,21 ± 0,35	3,38 ± 0,21	3,33 ± 0,30	> 0,05
	Lô trị 1	3,45 ± 0,27	3,54 ± 0,31	3,41 ± 0,44	> 0,05
	Lô trị 2	3,19 ± 0,45	3,28 ± 0,22	3,09 ± 0,28	> 0,05
p (trước - sau)		> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Cholesterol toàn phần (mmol/L)	Lô chứng	1,50 ± 0,12	1,61 ± 0,16	1,52 ± 0,16	> 0,05
	Lô trị 1	1,48 ± 0,30	1,68 ± 0,30	1,62 ± 0,39	> 0,05
	Lô trị 2	1,30 ± 0,36	1,53 ± 0,25	1,42 ± 0,21	> 0,05
p (trước - sau)		> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Bilirubin toàn phần (mmol/L)	Lô chứng	13,25 ± 0,25	13,45 ± 0,54	13,38 ± 0,45	> 0,05
	Lô trị 1	13,48 ± 0,52	13,22 ± 0,50	13,41 ± 0,62	> 0,05
	Lô trị 2	13,43 ± 0,19	13,26 ± 0,52	13,55 ± 0,55	> 0,05

Chỉ số	Lô (n = 10)	Trước NC ($\bar{X} \pm SD$)	Sau 2 tuần ($\bar{X} \pm SD$)	Sau 4 tuần ($\bar{X} \pm SD$)	p (t- test Student)
p (trước - sau)		> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Creatinine (mg/dL)	Lô chứng	0,83 ± 0,15	0,78 ± 0,12	0,84 ± 0,18	> 0,05
	Lô trị 1	0,84 ± 0,15	0,76 ± 0,15	0,80 ± 0,17	> 0,05
	Lô trị 2	0,81 ± 0,14	0,78 ± 0,15	0,79 ± 0,19	> 0,05
p (trước - sau)		> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Kết quả ở các bảng 11 cho thấy: sau 2 tuần và 4 tuần uống APKP, các xét nghiệm đánh giá chức năng gan (nồng độ Bilirubin toàn phần, Albumin, Cholesterol toàn phần) và chức năng thận (nồng độ Creatinin) ở cả 2 lô trị đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

Thay đổi về mô bệnh học

Đại thể: Trên tất cả các chuột thực nghiệm (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.

Vi thể: Không có khác biệt về cấu trúc vi thể gan, thận chuột sau 4 tuần uống thuốc ở các lô trị 1 và lô chứng. Ở lô trị 2 APKP liều gấp 3 liều lâm sàng 2,235 g/kg/ngày có gây tổn thương vi thể gan chuột nặng hơn so với lô chứng sinh học.

IV. BÀN LUẬN

1. Nghiên cứu độc tính cấp

Nghiên cứu độc tính cấp của thuốc nhằm theo dõi và đánh giá tất cả những dấu hiệu bất thường ở động vật thí nghiệm sau khi dùng thuốc và tiến hành xác định LD₅₀ tức liều gây chết 50% số chuột theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon.⁴ Ở liều tối đa tương đương với 38,8 g/kg (liều đặc nhất có thể cho chuột uống bằng kim đầu tù) gấp 26,04 lần liều dự kiến dùng trên lâm sàng không gây các biểu hiện nhiễm độc

cấp trên chuột, không gây chết trên chuột sau 72 giờ và sau 7 ngày uống thuốc cũng không có dấu hiệu bất thường do vậy chưa thể xác định được LD₅₀ của chế phẩm APKP trên chuột nhất trắng theo đường uống.

Theo Đỗ Tất Lợi, thành phần chính của Hồng Hoa là cactamin có liều độc trên thỏ là 20 - 75 mg/kg, đối với mèo là 80 - 85 mg/kg thể trọng.⁶ Nghiên cứu của M A Latif năm 1979, bột Nga Truật gây độc đối với chuột 5 tuần tuổi và gây tử vong 100% trong vòng 6 ngày khi cho ăn 320 g/kg/ngày. Thân rẽ tươi cắt nhỏ và sấy khô dùng liều 400 g/kg gây giảm hoạt động của chuột nhất trắng, ở liều 250 g/ngày dùng trên lâm sàng gây mệt mỏi ứ oải, da xanh tái khi sử dụng dài ngày.⁷ Chiết xuất ethanol và thành phần alkaloid của lá Náng trắng có LD₅₀ là 22,75 g/kg p.o. ở chuột.⁸ Tuy nhiên, liều lượng của các dược liệu có trong viên nang cứng APKP đều thấp hơn rất nhiều lần so với liều gây ra các biểu hiện độc tính được báo cáo. Các dược liệu khác hiện theo Đỗ Tất Lợi chưa quan sát thấy độc tính.⁶

Như vậy, kết quả nghiên cứu độc tính cấp cũng cho thấy liều dự kiến dùng trên người của viên nang cứng APKP 9 viên/ngày là có thể chấp nhận được.

2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Ảnh hưởng của viên nang An Phụ Khang Plus lên tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng chuột

Trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn

chúng tôi lựa chọn đối tượng nghiên cứu là chuột cống trắng do loài này dễ nuôi hơn, chế độ ăn tương tự và các chỉ số nghiên cứu tương đối ổn định. Tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng phản ánh tình trạng sức khỏe của động vật. Theo báo cáo của M A Latif, bột Nga Truật cho chuột non cai sữa dùng với liều 400 g/kg có hiện tượng giảm cân nhanh chóng và hai trong số năm con chuột tử vong trong vòng 4 ngày. Trong nghiên cứu, chuột ở cả 3 lô đều ăn uống, hoạt động bình thường, mắt sáng, lông mượt, phân khô. Cân nặng của chuột ở cả 3 lô đều tăng so với trước khi nghiên cứu. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở 2 lô trị so với lô chứng ở các thời điểm trước và sau uống thuốc thử ($p > 0,05$). Như vậy, APKP không ảnh hưởng xấu tới tình trạng chung và mức độ thay đổi thể trọng của chuột khi uống thuốc liên tục trong 4 tuần.

Ảnh hưởng của viên nang An Phụ Khang Plus đến hệ thống tạo máu

Để đánh giá ảnh hưởng của thuốc đến chức năng tạo máu chúng tôi tiến hành xác định số lượng hồng cầu, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu trong máu chuột. Ngoài ra, định lượng huyết sắc tố, thể tích trung bình hồng cầu sẽ cho biết chức năng của hồng cầu trong vận chuyển khí máu. Hematocrit là tỉ lệ % giữa hồng cầu và máu toàn phần. Qua nghiên cứu cho thấy, các chỉ số trên của chuột ở cả 2 lô trị đều thay đổi không có ý nghĩa thống kê so với trước khi dùng thuốc và so với lô chứng sinh học ở cùng thời điểm ($p > 0,05$). Theo báo cáo của Fyal Younas, polysaccharid từ Đương qui có tác dụng làm tăng số lượng hồng cầu, Hemoglobin, chống lại các tác nhân gây tình trạng thiếu máu.⁹ Điều đó chứng tỏ APKP không thể hiện độc tính trên cơ quan tạo máu.

Ảnh hưởng của viên nang An Phụ Khang Plus đến mức độ tổn thương tế bào gan và chức năng gan, thận

Trong cơ thể, gan có vai trò rất quan trọng.

Gan đảm nhiệm nhiều chức năng phức tạp và là cơ quan chuyển hóa chính. Khi đưa thuốc vào cơ thể, thuốc có thể độc cho gan, gây hủy hoại tế bào gan, ảnh hưởng đến chức năng gan. Khi tổn thương hủy hoại tế bào gan, nồng độ ALT sẽ tăng cao. AST chủ yếu nằm trong ty thể, khi tổn thương ở mức độ dưới tế bào thì AST mới được giải phóng ra ngoài. Ngoài ra, gan có chức năng chuyển hóa protid, lipid, tạo mật... qua đó, gan thể hiện vai trò trong tổng hợp Albumin, Cholesterol toàn phần và Bilirubin. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ALT, AST và các chỉ số chức năng gan của chuột cống ở cả 2 lô trị đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thời điểm trước nghiên cứu và so với lô chứng tại cùng một thời điểm. Điều này chứng tỏ, APKP ở cả 2 mức liều đều không thể hiện độc tính trên gan.

Thận là cơ quan bài tiết của cơ thể. Khi đưa thuốc vào cơ thể, phần lớn thuốc được thải trừ qua thận. Vì vậy, thuốc gây độc có thể làm tổn thương thận, từ đó ảnh hưởng đến chức năng thận. Creatinin là thành phần đạm trong máu ổn định nhất, hầu như không phụ thuộc vào chế độ ăn, thay đổi sinh lý mà chỉ phụ thuộc vào khả năng đào thải của thận. Khi cầu thận tổn thương, nồng độ Creatinin tăng sớm hơn Ure, do vậy để đánh giá và theo dõi chức năng thận, Creatinin máu là chỉ tiêu quan trọng và tin cậy hơn Ure¹⁰.

Giải phẫu bệnh đại thể và vi thể là chỉ số cần thiết khi đánh giá độc tính bán trường diễn theo hướng dẫn của WHO.⁵ Các mẫu bệnh phẩm gan ở cả 3 lô gồm 2 lô dùng thuốc thử và 1 lô chứng đều có tỉ lệ số mẫu thoái hóa ở mức độ nhẹ/số mẫu bình thường là như nhau ở các thời điểm sau 4 tuần uống thuốc. Ở lô trị 2 cho thấy hình ảnh tổn thương trên vi thể gan rõ hơn hơn so với lô chứng sinh học. Tuy nhiên có thể thấy các chỉ số sinh hóa đánh giá chức năng gan (AST, ALT, Albumin, Cholesterol toàn

phần, Bilirubin toàn phần) lại không có dấu hiệu bất thường ở tất cả các lô. Sở dĩ có sự không phù hợp giữa hình ảnh tổn thương vi thể và các chỉ số sinh hóa như vậy có thể do mức độ tổn thương tế bào gan nhẹ và khu trú nên các tế bào gan bình thường còn lại có hiện tượng hoạt động bù trừ. Mặt khác, khi xem xét các thành phần của APKP thì thấy, trong nghiên cứu của Peng Cao và cộng sự năm 2018 chỉ ra rằng: hợp chất polysaccharid có trong Đương qui có tác dụng giảm sự thoái hóa của tế bào gan và số lượng không bào tế bào chất ở chuột tiếp xúc với quá liều paracetamol, làm giảm rõ rệt tình trạng tổn thương gan thông qua việc tăng nồng độ GSH và ức chế quá trình apoptosis ở gan. Trong ống nghiệm, polysaccharid làm tăng đáng kể tỷ lệ sống sót của tế bào gan nguyên phát của chuột khi dùng quá liều paracetamol. Tác dụng này có thể do cải thiện quá trình peroxy hóa lipid và stress oxy hóa, cùng với việc ức chế quá trình apoptosis.¹¹ Thành phần sesquiterpenes có trong Nga Truật được phân lập từ dịch chiết aceton có tác dụng bảo vệ gan. Cần có nghiên cứu trong thời gian dài hơn để đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm lên sự tổn thương tế bào gan.

Trên thế giới các nghiên cứu về độc tính chung khi phối hợp các bị dược liệu có trong thành phần của APKP hiện chưa được ghi nhận. Đây là các dược liệu phổ biến, chúng tôi chưa tìm thấy các báo cáo về độc tính của các vị dược liệu này, tham khảo các tài liệu cũng chưa thấy đề cập tới những độc tính nghiêm trọng.^{4,5}

V. KẾT LUẬN

Viên nang cứng An Phụ Khang Plus không gây độc tính cấp và không xác định được LD₅₀ trên chuột nhắt trắng.

Viên nang cứng An Phụ Khang Plus liều 0,745 g/kg/ngày và liều cao gấp 3 lần liều dự kiến lâm sàng (2,235 g/kg/ngày) dùng đường

uống liên tục trong 4 tuần không ảnh hưởng đến tình trạng chung, các chỉ số huyết học, sinh hóa, mô bệnh học thận. Tuy nhiên, cần có nghiên cứu sâu hơn để đánh giá ảnh hưởng lên mô bệnh học gan chuột cống trắng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hyun JH, Kang JI, Kim SC, et al. The effects of crinum asiaticum on the apoptosis induction and the reversal of multidrug resistance in HL-60/MX2. *Toxicol Res*. 2008;24(1):29-36.
2. Nguyen HYT, Vo BHT, Nguyen LTH, et al. Extracts of crinum latifolium inhibit the cell viability of mouse lymphoma cell line EL4 and induce activation of anti-tumour activity of macrophages in vitro. *J Ethnopharmacol*. 2013;149(1):75-83.
3. Song Y, Hu J, Wang H, et al. Research on the modern clinical herbal administration rules in TCM treatment of ovarian cysts based on data mining. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*. 2017;4(2):222-231.
4. Litchfield JT, Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther*. 1949;96(2):99-113.
5. WHO. Working group on the safety and efficacy of herbal medicine. Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization. 2013.
6. Đỗ Tất Lợi. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. 8th ed. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội; 2015.
7. Latif MA, Morris TR, Miah AH, Hewitt D, Ford JE. Toxicity of shoti (Indian arrowroot: *Curcuma zedoaria*) for rats and chicks. *Br J Nutr*. 1979;41(1):57-63.
8. Phuong NK. Studies on pharmacological effects of crinum asiaticum L. *Journal of Medicinal Materials - Hanoi*. P 2003:149-152.
9. Younas F, Aslam B, Muhammad F, et al. Haematopoietic effects of *Angelica sinensis* root cap polysaccharides against lisinopril-

induced anaemia in albino rats. *Pharm Biol.* 2017;55(1):108-113.

10. Nguyễn Thế Khánh, Phạm Tử Dương. *Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng*. Nhà xuất bản Y học; 2005.

11. Xia JY, Fan YL, Jia DY, et al. Protective effect of *Angelica sinensis* polysaccharide against liver injury induced by D-galactose in aging mice and its mechanisms. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2016;24(3):214-219.

Summary

STUDY ACUTE AND SUB-CHRONIC TOXICITY OF AN PHU KHANG PLUS ON EXPERIMENTAL ANIMALS

The study was conducted to assess the acute toxicity on Swiss mice according to the World Health Organization Guidance, LD₅₀ was determined by Litchfield-Wilcoxon method. The sub-chronic toxicity of An Phu Khang Plus were studied on *Wistar* rats, in which rats were divided in 3 groups: no treatment; treated with An Phu Khang Plus at the daily dose of 0.745 g/kg per day and 2.235 g/kg per day, respectively, for 4 weeks. After administration, rats were sacrificed to collect samples for blood analysis before and at 2.4 weeks after treatment. Histopathological of liver and kidney were only observed at the end of treatment. The results show no symptom of acute toxicity up to a maximum dose 38.8 g/kg, LD50 of APKP has not been determined. The APKP at two doses of 0.745 g/kg per day and 2.235 g/kg per day had no effect on general conditions, hematopoietic function. No change in the liver and kidney functions, however, histopathological changes were seen in the liver at the high dose. A subchronic study of other doses consumed should be further carried out to assess the effects of APKP on liver histology.

Keywords: An Phu Khang Plus, acute toxicity, sub-chronic toxicity.