

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ ĐỘC TÍNH BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA BÀI THUỐC CỔ THẬN ĐIỀU KINH THANG TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM

TS. NGUYỄN THANH HÀ TUẤN, BS. PHẠM ANH HÒA,
PGS.TS. NGUYỄN HOÀNG NGÂN - Học viện Quân y
Phản biện khoa học: PGS.TS. HỒ ANH SƠN
Phó Giám đốc Viện Nghiên cứu y dược quân sự,
Học viện Quân y

TÓM TẮT: “Cổ thận điều kinh thang” là bài thuốc được sử dụng trong điều trị xuất huyết tử cung cơ năng. Nghiên cứu nhằm mục tiêu đánh giá thực nghiệm về độc tính cấp của bài thuốc trên chuột nhắt trắng và độc tính bán trường diễn của bài thuốc trên chuột cống trắng. **Kết quả:**

- Về độc tính cấp: chưa xác định được LD50 của bài thuốc “Cổ thận điều kinh thang” trên chuột nhắt trắng, dù chuột đã uống đến liều tối đa 300 g/kg chuột/24 giờ.

- Về độc tính bán trường diễn: dịch chiết bài thuốc “Cổ thận điều kinh thang” liều 12,6 g/kg chuột/ngày và 37,8 g/kg chuột/ngày, dùng liên tục trong 90 ngày không ảnh hưởng đến thể trạng, cân nặng, và các chỉ số huyết học của chuột cống trắng.

Từ khóa: Cổ thận điều kinh thang, độc tính cấp, chỉ số huyết học.

ABSTRACT: “Co than dieu kinh thang” remedies is used in the treatment of functional uterine hemorrhage. The study evaluated the acute toxicity on mice and the semi-chronic toxicity on rats. **Results:**

- The acute toxicity did not identify the LD50 on mice although they were taken the highest dose of 300 g herbal medicines/kg body weight/24 hours.

- After 90 days of treatment with the doses of 12.6 g/kg per day and 37.8 g/kg per day, “Co than dieu kinh thang” caused no harm to rat’s health, body weight and the hematology indexes.

Keywords: Co than dieu kinh thang, acute toxicity, hematology indexes.

Chịu trách nhiệm nội dung: TS. Nguyễn Thanh Hà Tuấn, Email: nguyentuan000010@gmail.com

Ngày nhận bài: 02/5/2019; mời phản biện khoa học: 10/5/2019; chấp nhận đăng: 30/5/2019.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Xuất huyết tử cung cơ năng có thể gặp ở nhiều lứa tuổi, với tỉ lệ tương ứng khoảng 20% ở tuổi dậy thì, 30% ở tuổi sinh đẻ và 50% ở tuổi tiền mãn kinh [1]. Cơ chế gây bệnh liên quan đến hoạt động nội tiết của buồng trứng hoặc sử dụng nội tiết ngoại lai. Bệnh có tỉ lệ tái phát cao, gây ảnh hưởng nhiều đến sức khỏe và sinh hoạt hằng ngày của người phụ nữ. Với phụ nữ trẻ tuổi, xuất huyết tử cung cơ năng có nguy cơ gây ảnh hưởng xấu đến chức năng sinh sản sau này [1].

“Cổ thận điều kinh thang” là một bài thuốc nghiệm phương, đã được nhiều thầy thuốc y học cổ truyền sử dụng trong điều trị bệnh xuất huyết tử cung cơ năng và cho thấy hiệu quả tốt. Tiếp thu những kinh nghiệm và thành quả này, việc nghiên cứu, triển khai ứng dụng bài thuốc “Cổ thận điều kinh thang” rộng rãi hơn trong điều trị là hết sức cần thiết. Để có cơ sở khoa học về độ an toàn của bài thuốc trước khi tiến hành nghiên cứu trên lâm sàng, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm mục tiêu đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của bài thuốc “Cổ thận điều kinh thang” trên động vật thực nghiệm.

2. CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Chất liệu, đối tượng, thiết bị nghiên cứu:

- Thuốc nghiên cứu (thuốc thử): dịch chiết bài thuốc “Cổ thận điều kinh thang”.

+ Công thức bài thuốc: Tang kí sinh 10g; Thổ ty tử 20g; Tục đoạn 20g; Hạn liên thảo (sao đen) 10g; Trữ ma căn (sao đen) 20g; Kinh giới (sao đen) 10g. Các vị thuốc đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam IV [2], do Công ty Dược phẩm Trung ương Mediplantex cung cấp; sắc đóng gói tại Khoa Y học cổ truyền, Bệnh viện Quân y 103 bằng hệ thống máy sắc thuốc và đóng gói tự động của Hàn Quốc.

+ Liều dùng (tính theo g dược liệu khô): liều dự kiến trên người là 90 g/người (50 kg)/ngày, tương đương 1,8 g/kg/ngày. Liều quy đổi trên chuột nhắt trắng (hệ số 12) là 21,6 g/kg/ngày. Liều quy đổi trên chuột cống trắng (hệ số 7) là 12,6 g/kg/ngày.

- Đối tượng nghiên cứu: 50 con chuột nhắt trắng dòng Swiss (nghiên cứu độc tính cấp) và 24 con chuột cống trắng dòng Wistar (nghiên cứu

độc tính bán trường diễn). Chuột nghiên cứu không phân biệt giống, là chuột trưởng thành, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, thể trọng mỗi con từ 18-22g đối với chuột nhắt trắng và 160-180g đối với chuột cống trắng. Chuột do Ban động vật thí nghiệm (Học viện Quân y) cung cấp, nuôi dưỡng theo tiêu chuẩn động vật nghiên cứu.

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

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Nghiên cứu độc tính cấp theo đường uống (xác định LD50 theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon và hướng dẫn của WHO [4], [5]): chia đều ngẫu nhiên 50 con chuột nhắt thành 5 lô; cho chuột các lô uống mẫu thuốc nghiên cứu 3 lần/ngày theo liều tăng dần từ 100 g/kg/ngày đến 300 g/kg/ngày (liều tối đa chuột có thể uống được). Theo dõi tình trạng chung và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ. Tiếp tục theo dõi tình trạng chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống thuốc thử lần đầu. Xác định tỉ lệ % số chuột chết theo liều dùng trong 72 giờ sau uống thuốc thử lần đầu, từ đó xác định liều chết 50% (nếu có).

- Nghiên cứu độc tính bán trường diễn theo đường uống: chia đều ngẫu nhiên 24 con chuột cống trắng thành 3 lô. Cho chuột uống thuốc thử hoặc nước cất 1 lần vào 8 giờ sáng hằng ngày, liên tục trong 90 ngày, trong đó, chuột lô 1 uống nước cất (lô chứng); chuột lô 2 uống thuốc thử, liều 12,6 g/kg/ngày (lô trị 1) và chuột lô 3 uống thuốc thử, liều 37,8 g/kg/ngày (lô trị 2, liều gấp 3 lần lô trị 1). Theo dõi các chỉ tiêu: tình trạng chung, thể trọng chuột, số lượng hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu máu chuột [3]. Thời điểm theo dõi: trước khi uống thuốc (N0), ngày 45 sau uống thuốc (N45) và ngày 90 sau uống thuốc (N90).

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

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.

3.1. Độc tính cấp của bài thuốc:

Sau khi cho các lô chuột nhắt uống thuốc thử theo liều tăng dần từ 100 g/kg/ngày đến 300 g/kg/ngày, chuột các lô nghiên cứu vẫn hoạt động bình thường, các biểu hiện sinh lý bình thường, không phát hiện triệu chứng ngộ độc nào trên chuột thí nghiệm trong thời gian theo dõi. Sau 72 giờ, các lô chuột nhắt thí nghiệm đều không có chuột chết. Vì vậy, chưa xác định được liều chết 50% chuột thí nghiệm (LD50) của bài thuốc.

3.2. Độc tính bán trường diễn của bài thuốc:

3.2.1. Ảnh hưởng đến tình trạng chung:

Trong thời gian thí nghiệm, chuột cống ở cả 3 lô đều 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.

3.2.2. Ảnh hưởng đến thể trọng chuột:

Bảng 1. Biến đổi về thể trọng chuột.

Thời điểm	Thể trọng chuột (g)			p_{1-2-3}
	Lô chứng ⁽¹⁾	Lô thử 1 ⁽²⁾	Lô thử 2 ⁽³⁾	
D0 ^(a)	170,25 ± 3,99	170,00 ± 4,72	169,75 ± 3,24	$p_{1-2} > 0,05$;
D45 ^(b)	192,75 ± 3,92	190,63 ± 4,41	193,88 ± 7,47	$p_{1-3} > 0,05$;
D90 ^(c)	212,63 ± 4,69	213,13 ± 5,82	215,38 ± 6,39	$p_{2-3} > 0,05$
p_{a-b-c}	$p_{a-b} < 0,01$; $p_{b-c} < 0,01$; $p_{a-c} < 0,01$			-

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

3.2.3. Ảnh hưởng đến chức năng tạo máu:

Bảng 2. Biến đổi số lượng hồng cầu.

Thời điểm	Số lượng hồng cầu máu chuột (T/l)			p_{1-2-3}
	Lô chứng ⁽¹⁾	Lô thử 1 ⁽²⁾	Lô thử 2 ⁽³⁾	
D0 ^(a)	7,84 ± 0,85	8,45 ± 0,40	8,22 ± 0,77	$p_{1-2} > 0,05$
D45 ^(b)	8,27 ± 1,19	8,45 ± 0,34	7,43 ± 1,30	$p_{1-3} > 0,05$
D90 ^(c)	8,74 ± 1,63	8,64 ± 1,44	8,51 ± 1,98	$p_{2-3} > 0,05$
p_{a-b-c}	$p_{a-b} > 0,05$; $p_{a-c} > 0,05$; $p_{b-c} > 0,05$			-

So sánh trong cùng lô chuột ở các thời điểm đánh giá, thấy số lượng hồng cầu máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm đánh giá, thấy số lượng hồng cầu máu chuột khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3. Biến đổi hàm lượng huyết sắc tố.

Thời điểm	Huyết sắc tố máu chuột (g/dl)			p_{1-2-3}
	Lô chứng ⁽¹⁾	Lô thử 1 ⁽²⁾	Lô thử 2 ⁽³⁾	
D0 ^(a)	154,13 ± 21,92	159,88 ± 19,90	159,75 ± 24,63	$p_{1-2} > 0,05$
D45 ^(b)	160,13 ± 11,43	166,00 ± 6,09	158,88 ± 18,43	$p_{1-3} > 0,05$
D90 ^(c)	165,50 ± 29,10	164,00 ± 27,86	172,50 ± 10,11	$p_{2-3} > 0,05$
p_{a-b-c}	$p_{a-b} > 0,05$; $p_{b-c} > 0,05$; $p_{a-c} > 0,05$			-

So sánh trong cùng lô chuột ở các thời điểm đánh giá, thấy nồng độ huyết sắc tố máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các lô chuột trong cùng một thời điểm đánh giá, thấy nồng độ huyết sắc tố máu chuột

khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 4. Biến đổi hematocrit.

Thời điểm	Hematocrit máu chuột (%)			p_{1-2-3}
	Lô chứng ⁽¹⁾	Lô thử 1 ⁽²⁾	Lô thử 2 ⁽³⁾	
D0 ^(a)	42,06 ± 3,81	44,38 ± 1,69	44,48 ± 4,22	p_{1-2} > 0,05
D45 ^(b)	44,52 ± 2,62	45,95 ± 2,60	41,80 ± 6,28	p_{1-3} > 0,05
D90 ^(c)	46,25 ± 9,02	46,83 ± 6,93	46,53 ± 3,30	p_{2-3} > 0,05
p	$p_{a-b} > 0,05$; $p_{b-c} > 0,05$; $p_{a-c} > 0,05$			-

So sánh trong cùng lô chuột ở các thời điểm đánh giá và giữa các lô chuột trong cùng một thời điểm đánh giá, thấy hematocrit máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 5. Biến đổi số lượng bạch cầu.

Thời điểm	Số lượng bạch cầu máu chuột (G/l)			p_{1-2-3}
	Lô chứng ⁽¹⁾	Lô thử 1 ⁽²⁾	Lô thử 2 ⁽³⁾	
D0 ^(a)	6,85 ± 1,31	6,50 ± 1,80	6,60 ± 1,59	p_{1-2} > 0,05;
D45 ^(b)	7,67 ± 1,66	8,31 ± 2,18	6,93 ± 0,83	p_{1-3} > 0,05;
D90 ^(c)	6,66 ± 1,61	8,06 ± 2,28	7,85 ± 1,44	p_{2-3} > 0,05
p	$p_{a-b} > 0,05$; $p_{b-c} > 0,05$; $p_{a-c} > 0,05$			-

So sánh trong cùng lô chuột ở các thời điểm đánh giá và giữa các lô chuột trong cùng một thời điểm đánh giá, thấy số lượng bạch cầu máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 6. Biến đổi số lượng tiểu cầu.

Thời điểm	Số lượng tiểu cầu máu chuột (G/l)			p_{1-2-3}
	Lô chứng ⁽¹⁾	Lô thử 1 ⁽²⁾	Lô thử 2 ⁽³⁾	
D0 ^(a)	598,38 ± 87,75	560,75 ± 60,94	590,50 ± 104,49	p_{1-2} > 0,05;
D45 ^(b)	528,00 ± 78,23	525,13 ± 57,21	556,75 ± 55,11	p_{1-3} > 0,05;
D90 ^(c)	578,63 ± 149,10	528,50 ± 79,97	608,38 ± 104,48	p_{2-3} > 0,05
p	$p_{a-b} > 0,05$; $p_{b-c} > 0,05$; $p_{a-c} > 0,05$			-

So sánh trong cùng lô chuột ở các thời điểm đánh giá và giữa các lô chuột trong cùng một thời điểm đánh giá, thấy số lượng tiểu cầu máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

4. BÀN LUẬN.

4.1. Về độc tính cấp của bài thuốc “Cổ thận điều kinh thang”:

Chuột nhắt trắng đã uống đến liều tối đa 300 g/kg thể trọng/24 giờ (gấp 13,89 lần so với liều dự kiến có tác dụng) mà không thấy xuất hiện dấu hiệu của độc tính cấp. Vì không có chuột chết, nên chưa xác định được LD50 của thuốc thử trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon.

Kết quả này cho thấy, dịch chiết bài thuốc có tính an toàn cao trong thử nghiệm độc tính cấp, hay khoảng an toàn điều trị rộng [4], [5].

4.2. Về độc tính bán trường diễn của bài thuốc “Cổ thận điều kinh thang”:

Theo quy chế của Bộ Y tế [3] và hướng dẫn của WHO [5], tình trạng chung, trọng lượng cơ thể và các chỉ số huyết học là những xét nghiệm quan trọng khi đánh giá độc tính của thuốc thử. Trọng lượng chuột 3 lô thí nghiệm đều tăng so với trước nghiên cứu. Không có sự khác biệt về sự tăng trọng lượng giữa lô chứng so với các lô dùng thuốc ($p > 0,05$). Như vậy, ở cả hai mức liều thử (lô trị 1 và lô trị 2), thuốc đều không làm ảnh hưởng xấu đến tình trạng chung và trọng lượng chuột.

Chúng tôi đánh giá tác động của dịch chiết bài thuốc đến chức năng tạo máu của chuột thí nghiệm qua các chỉ số huyết học chuột, gồm số lượng hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu. Sau 90 ngày chuột uống thuốc thử, tất cả các xét nghiệm đánh giá chức năng tạo máu chuột ở lô trị 1 và lô trị 2 thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng. Đồng thời, so sánh trong từng lô chuột giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử, thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, thuốc thử với các mức liều và thời gian nghiên cứu không ảnh hưởng đến các chỉ số huyết học chuột thí nghiệm.

5. KẾT LUẬN.

- Chưa xác định được LD50 của bài thuốc “Cổ thận điều kinh thang” trên chuột nhắt trắng, dù chuột đã uống đến liều tối đa 300 g/kg/ngày, gấp 13,89 lần liều dự kiến có tác dụng.

- Dịch chiết bài thuốc “Cổ thận điều kinh thang” không ảnh hưởng đến thể trạng, cân nặng và các chỉ số huyết học của chuột cống trắng khi cho chuột uống liều 12,6 g/kg/ngày và 37,8 g/kg/ngày, liên tục trong 90 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Trường Đại học Y dược thành phố Hồ Chí Minh (2017), “Xuất huyết tử cung cơ năng”, trong: *Bài giảng sản phụ khoa*, tập I, Nhà xuất bản Y học, thành phố Hồ Chí Minh.
2. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam IV*, tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
3. Bộ Y tế (1996), *Quy chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực thuốc cổ truyền*, Quyết định số 371/BYT-QĐ.
4. Đỗ Trung Đàm (1996), *Phương pháp xác định độc tính cấp*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
5. WHO (2000), “Working group on the safety and efficacy of herbal medicine”, *Report of regional office for the western pacific of the WHO*. □