

ĐỘC TÍNH CỦA BÀI THUỐC DDHV ĐIỀU TRỊ VIÊM LOÉT DẠ DÀY DO VI KHUẨN HELICOBACTER PYLORI TRÊN THỰC NGHIỆM

Nguyễn Thị Ngọc^{1*}, Trần Thị Hải Hà¹,

Nguyễn Hoàng Ngân², Đậu Xuân Cảnh^{1,**}

TÓM TẮT

Mục tiêu: (1) Mô tả độc tính cấp của bài thuốc DDHV trên động vật thực nghiệm. (2) Mô tả độc tính bán cấp của bài thuốc DDHV trên động vật thực nghiệm. **Phương pháp nghiên cứu:** Đánh giá độc tính cấp của bài thuốc DDHV trên chuột nhắt trắng theo đường uống bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon. Đánh giá độc tính bán cấp của bài thuốc DDHV trên chuột cống trắng bằng đường uống theo quy định và hướng dẫn của Bộ Y tế. **Kết quả:** Chưa tìm thấy LD₅₀ của Cao đặc DDHV theo đường uống trên chuột nhắt trắng, chuột đã được cho uống tới mức liều cao nhất là 36,0g/kg/ngày, gấp 25 lần liều dự kiến có tác dụng mà các chuột vẫn bình thường. Trên các lô chuột dùng Cao đặc DDHV liều 0,84g cao đặc/kg/ngày, và liều 4,20g cao đặc/kg/ngày, trong 90 ngày liên tục, cho thấy: Chuột khỏe mạnh, tăng trọng tốt, đều; Không làm thay đổi các chỉ số huyết học; Không làm thay đổi các chỉ tiêu sinh hóa máu đánh giá chức năng gan, thận; Không gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận. **Kết luận:** Cao đặc DDHV an toàn ở các mức liều và thời gian đã dùng.

Từ khóa: Độc tính cấp, độc tính bán cấp, DDHV.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm loét dạ dày hiện nay đang là một mặt bệnh phổ biến ở Việt Nam và trên thế giới (đặc biệt ở những nước phát triển và đang phát triển). Theo một thống kê ở Việt Nam con số này chiếm khoảng 6-7% dân số. Viêm loét dạ dày là một bệnh mạn tính, diễn biến có chu kỳ, xu hướng hay tái phát và dễ gây nhiều biến chứng ảnh hưởng đến tính mạng như xuất huyết dạ dày, ung thư hóa [4].

Theo Y học cổ truyền “viêm loét dạ dày” thuộc phạm vi chứng vị quản thống. Bài thuốc DDHV gồm mười vị dược liệu, là bài thuốc nghiệm phương, dựa trên lý luận của y học cổ truyền trong điều trị chứng vị quản thống cũng như việc phối ngũ các vị thuốc theo pháp, phương và hài hòa các vị dược

liệu để nâng cao chất lượng điều trị bệnh lý này. Để có cơ sở khoa học về tiêu chuẩn chất lượng và tính an toàn của bài thuốc, làm cơ sở cho những nghiên cứu phát triển hiện đại hóa Y học cổ truyền, tạo sản phẩm phục vụ rộng rãi cho cộng đồng, chúng tôi thực hiện đề tài “Nghiên cứu độc tính của bài thuốc DDHV điều trị viêm loét dạ dày có vi khuẩn Helicobacter Pylori trên thực nghiệm”.

Mục tiêu:

- (1) Mô tả độc tính cấp của bài thuốc DDHV trên động vật thực nghiệm.
- (2) Mô tả độc tính bán cấp của bài thuốc DDHV trên động vật thực nghiệm.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và nguyên vật liệu nghiên cứu

Chế phẩm nghiên cứu

Cao đặc DDHV bào chế từ bài thuốc DDHV gồm các vị thuốc sau: Hoài sơn 16 gam, Bạch truật 10 gam, Tam thất 06 gam, Phục linh 6 gam, Mai mực 16 gam, Trần bì 06 gam, Đảng sâm 10 gam, Mạch nha 06 gam,

¹ Học viện y dược học cổ truyền Việt Nam

² Học viện Quân Y

* Tác giả thực hiện chính:

Nguyễn Thị Ngọc

** Tác giả chịu trách nhiệm khoa học:

Đậu Xuân Cảnh

Email: xuancanhvh@gmail.com

Ngày nhận bài: 5/10/2018

Ngày phản biện: 6/10/2018

Ngày chấp nhận đăng: 2/3/2019

Cam thảo 02 gam, Mộc hương 06 gam [10]. Các dược liệu trong bài thuốc được dùng dưới dạng dược liệu khô và đạt tiêu chuẩn trong Dược điển Việt Nam IV. Các dược liệu trên được chiết xuất và bào chế thành cao đặc DDHV theo phương pháp bào chế dược điển.

Động vật nghiên cứu

Chuột nhắt trắng trưởng thành dòng Swiss, 60 con, không phân biệt giống, cân nặng 18 - 22g. Chuột cống trắng trưởng thành, dòng Wistar, 30 con, không phân biệt giống, cân nặng 160 - 180g. Động vật đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, do Ban Cung cấp động vật thực nghiệm (Học viện Quân y) cung cấp. Thức ăn theo tiêu chuẩn cho động vật nghiên cứu, nước sạch đun sôi để nguội uống tự do.

Thiết bị, hóa chất nghiên cứu

Thiết bị: Máy đo quang phổ UVD-2960 (Mỹ) hệ thống phân tích sắc ký, máy xét nghiệm sinh hoá 3000 Evolution (hãng Biochemical Systems International Sr, Italia); máy phân tích huyết học Humancount 30TS (hãng Human, Đức); máy điện tim Fukuda FX 7102 (hãng Fukuda, Nhật Bản); kim cong đầu tù dùng cho chuột uống thuốc (Nhật Bản); ống micropipette chuyên dụng để lấy máu hốc mắt (Trung Quốc).

Hóa chất: Nước cất, Aceton- PA, Cloroform - PA, Amoniac - PA, Toluene - PA, Ethanol - PA (hãng MEDIA, Italia), hóa chất xét nghiệm huyết học của hãng Human, Đức.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu độc tính cấp

Xác định LD₅₀ của bài thuốc DDHV trên chuột nhắt trắng chủng Swiss đường uống bằng phương pháp của Litchfield - Wilcoxon [1].

Tất cả chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con. Cho nhịn ăn trước 12 giờ, nước uống bình thường. Sau đó, cho chuột uống thuốc với thể tích 0,2ml cao đặc/10g thể trọng/lần, 3 lần/ 24 giờ, mỗi lần uống cách nhau 3 giờ, đưa thẳng thuốc vào dạ dày bằng kim đưa thuốc chuyên dụng. Cứ 3 ngày tăng liều lên 0,2ml cao đặc/lần đến khi chết 100% lô chuột. Theo dõi số lượng

chuột chết ở mỗi lô. Tiến hành phẫu tích quan sát các tạng ngay sau khi có chuột chết để làm tiêu bản mô bệnh học.

Nghiên cứu độc tính bán cấp

Được thực hiện theo quy trình trước đó [5], [6], [7]. Cụ thể: Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 10 con. Các chuột được thí nghiệm liên tục trong 90 ngày. Lô chứng sinh lý: uống nước cất, 10ml/kg thể trọng/ngày. Lô trị 1: uống DDHV liều 0,84g cao đặc/kg/ngày. Lô trị 2: uống DDHV liều 4,20g cao đặc/kg/ngày (gấp 5 lần liều 1) [2], [7].

Các chỉ tiêu đánh giá: cân nặng, điện tim, làm xét nghiệm huyết học (số lượng hồng cầu (T/L), bạch cầu (G/L), tiểu cầu (G/L); hoạt độ enzym gan AST, ALT (U/L), nồng độ creatinin máu (mmol/L), mô bệnh học đại thể và vi thể. Các chỉ tiêu trên (trừ mô bệnh học) được lấy tại các thời điểm xuất phát điểm, 45 ngày, 90 ngày sau thử nghiệm. Riêng mô bệnh học được lấy tại thời điểm 90 ngày sau thử nghiệm.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp

Bảng 3.1. cho thấy cao đặc DDHV được cho chuột ở các lô uống với các mức liều khác nhau từ 12,0g cao đặc/kg/ngày thể trọng cho đến mức liều cao nhất 36g cao đặc/kg thể trọng/ngày không gây chết chuột thí nghiệm. Chúng tôi nhận thấy, phân chuột ở tất cả các lô bình thường, tình trạng vận động không có gì thay đổi. Liều dự kiến có tác dụng ở chuột nhất là 1,44g cao đặc/kg/ngày/kg/ngày. Chuột đã được cho uống tới mức liều cao nhất là 36,0g/kg/ngày, gấp 25 lần liều dự kiến không gây chết chuột, chứng tỏ cao đặc DDHV có tính an toàn cao [1], [7]. Chưa tìm thấy LD₅₀ của cao đặc DDHV theo đường uống trên chuột nhắt trắng.

3.2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán cấp

Cao đặc DDHV với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên sự phát triển thể trọng của chuột (bảng 3.2)

Bảng 3.3 cho thấy Cao đặc DDHV với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên

cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên các chỉ tiêu về số lượng hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu trong máu chuột. Các chỉ tiêu về cân nặng, huyết học thường phản ánh khá chính xác mức độ ảnh hưởng độc tính bán cấp lên cơ thể sinh học [2], [7]. Sự không khác biệt thống kê về cân nặng và các chỉ số huyết học đã cho thấy thuốc an toàn và không gây ra độc tính bán cấp lên đối tượng thí nghiệm. Và do đó, có thể an toàn với người trên các thử nghiệm sau này.

Bảng 3.4 chỉ ra cao đặc DDHV với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi hoạt độ các enzym AST và ALT có ý nghĩa thống kê, cho thấy Cao đặc DDHV không gây ra hủy hoại tế bào gan trên chuột nghiên cứu. Bảng 3.5

cho thấy, nồng độ creatinin máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê sau khi thử nghiệm với cao đặc DDHV ($p > 0,05$). So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, nồng độ creatinin máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy Cao đặc DDHV với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi nồng độ creatinin trong máu chuột nghiên cứu. Kết quả từ hai bảng 3.4 và 3.5 cho thấy chức năng gan, thận không bị ảnh hưởng nhiều bởi cao đặc DDHV. Hoạt độ enzym gan và nồng độ creatinin trong giới hạn bình thường chứng tỏ cao đặc không có gây tổn thương gan và thận, vốn là 2 cơ quan chịu trách nhiệm thải trừ và có sự tích lũy thuốc [6].

Bảng 3.1. Độc tính cấp theo đường uống của cao đặc DDHV trên chuột nhắt trắng.

Lô chuột	Số chuột	Liều dùng (gam cao đặc)	Tỷ lệ chuột sống/chết sau 72 giờ	Số chuột sống/chết sau 168 giờ
Lô 1	10	12,0	10/0	10/0
Lô 2	10	16,8	10/0	10/0
Lô 3	10	21,6	10/0	10/0
Lô 4	10	26,4	10/0	10/0
Lô 5	10	31,2	10/0	10/0
Lô 6	10	36,0	10/0	10/0

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của DDHV lên thể trọng chuột (gam)

Thời điểm	Trước thí nghiệm	Sau 45 ngày	Sau 90 ngày	p
Lô chứng	169,30 ± 4,72	199,60 ± 6,88	216,90 ± 5,90	<0,05
Lô trị 1	168,60 ± 4,48	201,70 ± 8,35	218,80 ± 6,12	<0,05
Lô trị 2	169,70 ± 4,30	200,90 ± 7,40	217,30 ± 7,20	<0,05
p	>0,05	>0,05	>0,05	

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của DDHV lên huyết học của chuột

Thời điểm	Trước thí nghiệm	Sau 45 ngày	Sau 90 ngày	p
Số lượng hồng cầu (T/L)				
Lô chứng	8,04 ± 0,57	8,14 ± 0,52	8,16 ± 0,94	>0,05
Lô trị 1	8,05 ± 0,49	8,12 ± 0,62	8,15 ± 0,72	>0,05
Lô trị 2	8,13 ± 0,72	8,08 ± 0,71	8,11 ± 0,66	>0,05
p	>0,05	>0,05	>0,05	
Số lượng bạch cầu (G/L)				
Lô chứng	8,64 ± 1,84	8,45 ± 2,43	8,83 ± 1,88	>0,05
Lô trị 1	8,81 ± 1,71	8,68 ± 2,36	8,91 ± 1,58	>0,05
Lô trị 2	8,53 ± 1,29	8,65 ± 1,45	8,77 ± 1,42	>0,05
p	>0,05	>0,05	>0,05	
Số lượng tiểu cầu (G/L)				
Lô chứng	684,10 ± 104,75	693,60 ± 66,58	658,50 ± 70,02	>0,05
Lô trị 1	714,50 ± 123,80	643,70 ± 230,81	683,70 ± 142,14	>0,05
Lô trị 2	669,40 ± 138,27	627,50 ± 85,63	690,90 ± 138,97	>0,05
p	>0,05	>0,05	>0,05	

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của DDHV lên hoạt độ AST và ALT

Thời điểm	Trước thí nghiệm	Sau 45 ngày	Sau 90 ngày	p
Hoạt độ AST (U/L)				
Lô chứng	76,40 ± 17,95	72,30 ± 15,96	73,30 ± 12,91	>0,05
Lô trị 1	74,20 ± 10,61	70,20 ± 17,15	69,70 ± 15,12	>0,05
Lô trị 2	79,40 ± 13,70	76,10 ± 15,37	75,20 ± 9,93	>0,05
p	>0,05	>0,05	>0,05	
Hoạt độ ALT (U/L)				
Lô chứng	68,10 ± 19,51	63,00 ± 20,48	61,20 ± 13,03	>0,05
Lô trị 1	67,20 ± 17,95	61,50 ± 18,60	60,50 ± 19,44	>0,05
Lô trị 2	66,50 ± 18,66	62,20 ± 17,27	62,90 ± 17,85	>0,05
p	>0,05	>0,05	>0,05	

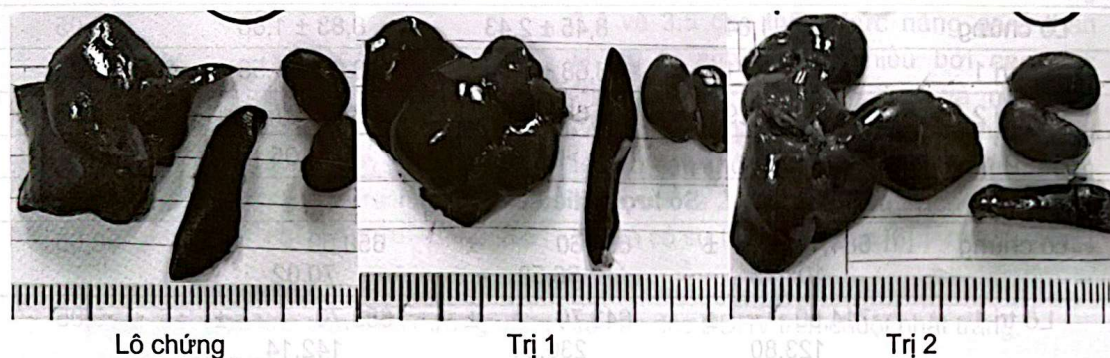
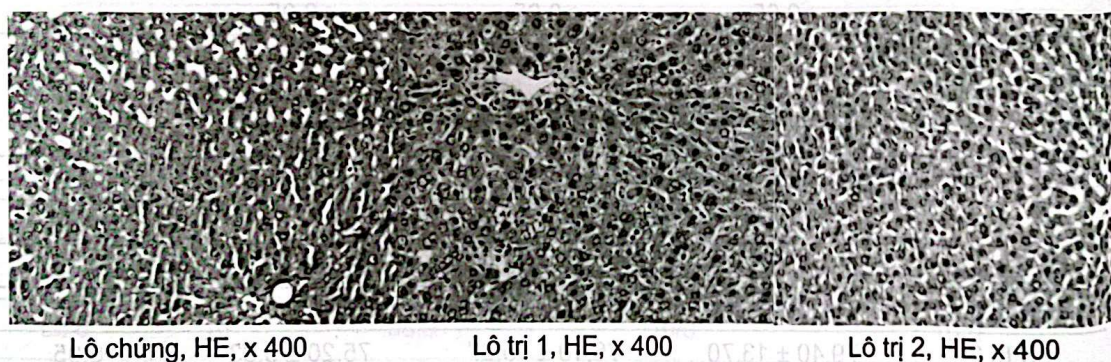
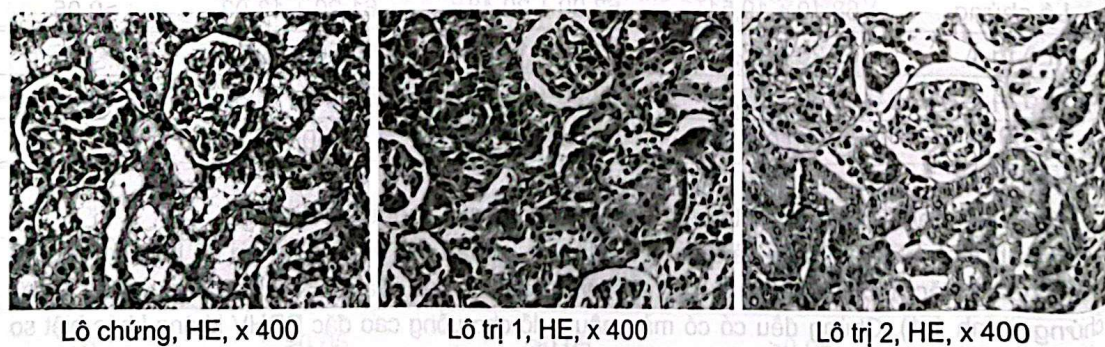
Quan sát đại thể gan, lách, thận thấy: màu sắc, hình thái của gan, lách và thận ở hai lô dùng Cao đặc DDHV không khác so với chứng (hình 3.1). Chúng đều có có màu nâu đỏ thẫm đồng đều, bề mặt nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết, có đàn hồi khi ấn xuống, không khác biệt so với hình ảnh gan, lách,

thận của chuột ở lô chứng.

Quan sát vi thể thấy với độ khuếch đại 400 lần, mô gan của chuột ở lô trị 1 và lô trị 2, là các lô cho uống cao đặc DDHV không khác biệt so với hình ảnh vi thể gan chuột ở lô chứng (hình 3.2). Trên hình ảnh không thấy ở xuất huyết hoặc ổ hoại tử, thoái hóa tế bào gan.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của DDHV lên nồng độ creatinin máu chuột ($\mu\text{mol/lit}$)

Thời điểm	Trước thí nghiệm	Sau 45 ngày	Sau 90 ngày	p
Lô chứng	$77,50 \pm 17,76$	$73,50 \pm 15,02$	$68,90 \pm 16,36$	$>0,05$
Lô trị 1	$76,70 \pm 8,19$	$67,50 \pm 11,65$	$66,80 \pm 17,97$	$>0,05$
Lô trị 2	$69,70 \pm 25,05$	$65,50 \pm 12,43$	$65,90 \pm 18,05$	$>0,05$
p	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	

**Hình 3.1.** Hình ảnh đại thể thể gan, thận, lách ở 3 lô chứng, trị 1 và trị 2**Hình 3.2.** Hình ảnh vi thể mô gan ở 3 lô chứng, trị 1 và trị 2**Hình 3.3.** Hình ảnh vi thể mô thận ở 3 lô chứng, trị 1 và trị 2

Hình ảnh vi thể mô thận cho thấy ở các lô cho uống cao đặc DDHV, cấu trúc mô thận không khác biệt so với lô chứng (hình 3.3). Cấu trúc mô thận bình thường.

Lý do không có sự biến đổi trên độc tính bán cấp có thể là do các vị thuốc này được chứng minh an toàn trên các thực thể sinh học. Các vị thuốc trên đã được dùng trong nhiều bài thuốc cổ truyền phương đông cũng như trong các nghiên cứu dược học cổ truyền. Vì vậy, sự kết hợp các vị thuốc trên có thể không gây ra tác dụng độc nào mà chỉ có thể làm tăng hoạt tính của nhau [8], [9], [10]. Về cơ chế tác dụng của cao đặc DDHV có lẽ cần phải nghiên cứu thêm.

4. KẾT LUẬN

1. Cao đặc DDHV an toàn trên thử nghiệm độc tính cấp theo đường uống trên chuột nhắt trắng

Chưa tìm thấy LD₅₀ của cao đặc DDHV theo đường uống trên chuột nhắt trắng với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống là 36g cao đặc/kg thể trọng.

2. Cao đặc DDHV an toàn trên thử nghiệm độc tính cấp theo đường uống trên chuột cống trắng

Trên cả 2 lô chuột dùng cao đặc DDHV liều 0,84g/kg/ngày và liều 4,20g /kg/ngày trong 90 ngày liên tục: chuột khỏe mạnh, tăng trọng tốt, đều; không có sự thay đổi các chỉ số huyết học; sinh hóa gan, thận; không gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự ủng hộ, giúp đỡ của Ban cung cấp động vật thực

nghiệm, Khoa Dược lý (Học viện Quân y) đã trợ giúp kỹ thuật cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đỗ Trung Đàm (2014)**, Phương pháp Litchfield Wilcoxon, Phương pháp xác định độc tính của thuốc, Nhà xuất bản y học, tr. 101 – 112.
2. **Đỗ Trung Đàm (2006)**, Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm, Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, tr.377 – 392.
3. **Nguyễn Thế Khánh, Phạm Tử Dương (2001)**, Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng, Nhà xuất bản Y học.
4. **Hội Khoa học tiêu hóa Việt Nam (2012)**, Đồng thuận về chẩn đoán và điều trị nhiễm HP ở Việt Nam", Tạp chí khoa học tiêu hóa Việt Nam, 7(29):1929-1940.
5. **OECD (2002)**. Drug Safety Evaluation I: Acute and subchronic toxicity assesment; USA Academy Press.
6. **Turner R.A. (1971)**, Screening method in pharmacology, Volume II 75-85.
7. **WHO (1993)**. Research Guidelines For Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines, ROWP, Manila, Philippines.
8. **Đỗ Tất Lợi (2006)**, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Y học, Hà Nội.
9. **Võ Văn Chi (1997)**, Từ điển cây thuốc Việt Nam. NXB Y học, Hà Nội.
10. **Viện Y học Dân tộc Thượng Hải (1995)**, 380 Bài thuốc đồng y hiệu nghiệm. NXB Thời đại.

Tương Đối học Y Dược Cần Thơ

Tác giả thực hiện chính

Nguyễn Long Hồ, Phạm Kiều Anh Thơ

Tác giả chịu trách nhiệm khoa học

Nguyễn Trung Kiên

Email: ntkien@ctu.vn

Ngày nhận bài: 2/12/2018

Ngày phản biện: 22/12/2018

Ngày chấp nhận đăng: 2/3/2019

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu tiến hành trên 55 bệnh nhân được chẩn đoán hội chứng tetany tăng theo tiêu chuẩn chẩn đoán sau [2]: có dấu Chvostek, có dấu Trousseau, triệu chứng cơ năng của hệ cơ, thần kinh, tim mạch-hô hấp. Không đưa vào nghiên cứu những bệnh nhân

SUMMARY

RESEARCH OF TOXICITY OF DDHV REMEDY IN GASTRIC ULCER TREATMENT BY HELICOBACTER PYLORI BACTERIAL ON EXPERIMENT

Nguyen Thi Ngoc^{1*}, Tran Thi Hai Ha¹,

Nguyen Hoang Ngan², Đâu Xuan Canh^{1***}

¹Vietnam Traditional Academy of Medicine and Pharmacology

²Military Medical University

Objectives: (1) Study of the toxicity level of DDHV remedy on experimental animals. (2) Study of the **Semi-Chronic** toxicity of DDHV remedy on experimental animals. **Methods:** Evaluating the acute toxicity of DDHV remedy in oral mice by Litchfield-Wilcoxon method. Evaluating the **Semi-Chronic** toxicity of DDHV remedy on oral rat following the rules and guidelines of the Ministry of the Health. **Results:** Acute Toxicity: the LD50 of DDHV extract was not found in oral mice, the mice were given the highest dose of 36.0 g /kg/day, 25 times the expected dose, and the mice were normal. **Semi-Chronic** toxicity: On the rat used DDHV extract with dose of 0.84g/extract/day and dose of 4.20g/extract/day in 90 continuous days, it shows that: Rats are healthy and good weigh gain; not alter the hematological indexes; Not change the blood biochemical to evaluating the liver and kidney function; not damage histology of liver, spleen, kidney. **Conclusion:** DDHV extract is safe at dosage and used intervals.

Keywords: Acute Toxicity, Semi-Chronic toxicity, DDHV.