

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐỘC TÍNH BÀI THUỐC THỪA KẾ
ĐIỀU TRỊ VIÊM GAN TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM
HOÀNG ANH TUẤN, MAI TIẾN DŨNG
Học viện Quân y**

TÓM TẮT

Để xác định độc tính của bài thuốc điều trị viêm gan B, chúng tôi đánh giá liều độc cấp (LD_{50}) và độc tính bán cấp của 5 vị thuốc y học cổ truyền (YHCT) ở dạng cao lỏng trên 60 chuột nhắt trắng dòng Swiss và 16 thỏ. Kết quả cho thấy, với liều 1 ml cao lỏng/chuột (gấp 300 lần liều dùng trên người) không gây chết cho chuột nhắt trắng qua theo dõi 7 ngày, không xác định được LD_{50} qua đường tiêu hóa. Khi sử dụng liều 3ml cao lỏng/kg thể trọng, trong 30 ngày liên tục, không gây chết cho thỏ sau 30 ngày uống thuốc. Các chỉ tiêu sinh hóa đánh giá chức năng gan, chức năng thận và các chỉ tiêu hồng cầu, bạch cầu, huyết sắc tố của thỏ ở các nhóm nghiên cứu không thay đổi so với nhóm chứng.

Từ khóa: Viêm gan B; bài thuốc điều trị viêm gan B; độc tính, tính an toàn.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm gan vi rút B là bệnh gan hiểm nghèo thường gặp nhất trên thế giới do vi rút viêm gan B gây ra. Việt Nam là một trong những quốc gia có tỷ lệ bị nhiễm vi rút viêm gan B cao nhất thế giới. Ở nước ta có khoảng 10 triệu người đang bị nhiễm căn bệnh này.

Hiện nay trên thế giới có hơn 1 tỷ người nhiễm HBV, hơn 350 triệu người mang HBV mạn, trong đó có

60 triệu người chết vì ung thư gan và 45 triệu người chết vì xơ gan (theo WHO năm 1997).

HBV được xem là tác nhân hàng đầu gây ung thư gan nguyên phát ở người.

Có nhiều thuốc đông dược và tân dược để điều trị viêm gan B nhưng chưa có thuốc đặc hiệu. Trong dân gian có nhiều bài thuốc, vị thuốc chữa bệnh gan có hiệu quả. Rất nhiều vị đã được nghiên cứu tác dụng dược lý trên lâm sàng và thực nghiệm. Đặc điểm các bài thuốc YHCT đều rẻ tiền, dễ kiếm và ít độc.

Việc ứng dụng thuốc YHCT, đặc biệt là kết hợp thuốc YHCT với tân dược để điều trị viêm gan B đã có nhiều vị được nghiên cứu tác dụng dược lý trên lâm sàng và thực nghiệm. Để có thêm một chế phẩm thuốc YHCT điều trị viêm gan B, chúng tôi thực hiện đề tài “Nghiên cứu tính an toàn của bài thuốc điều trị viêm gan B trên thực nghiệm” nhằm mục đích đánh giá độc tính cấp (LD_{50}) và độc tính bán cấp của bài thuốc thừa kế điều trị viêm gan của lương y Bàn Chí Hàm xã Minh Hương - Huyện Hàm Yên, tỉnh Tuyên Quang.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

- Bài thuốc YHCT với thành phần gồm 05 vị thuốc YHCT: Thảo long mộc 30g, Đổ trọng nam 40g, Thổ phục linh đỏ 15g, Bình vôi đỏ 10g, Cam thảo 5g.

- Động vật thực nghiệm: 60 chuột nhắt trắng dòng Swiss thuần chủng, không phân biệt đực cái, trọng lượng 25 ± 2 g/con; thỏ gồm 16 con, không phân biệt giống, đang trong thời kỳ phát triển khỏe mạnh, có trọng lượng trung bình $2 \pm 0,2$ kg do Trung tâm Kiểm nghiệm nghiên cứu Dược, Cục Quân y cung cấp. Chuột nhắt trắng, thỏ chăn nuôi theo chế độ quy định dùng cho động vật thí nghiệm.

2. Phương pháp nghiên cứu

Chế phẩm thảo mộc đảm bảo theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam III, chiết xuất theo hướng dẫn của Bệnh viện YHDT Tuyên Quang bằng cách lấy 1 thang thuốc và 2,5 lít nước cho vào nồi đun sôi cạn lấy 2 lít dịch chiết 1; tiếp tục cho thêm 2,5 lít nước vào nồi thuốc trên đun sôi 10 phút, cạn lấy 2 lít nước sắc 2; Tiếp tục cho thêm 2,5 lít nước vào nồi thuốc trên đun sôi 10 phút cạn lấy 2 lít dịch chiết 3. Gộp nước sắc trên, khuấy đều được 6000ml, liều dùng cho người là 1000ml/ngày. Liều dùng cho chuột: cô cách thủy 6000ml dịch chiết thành 60ml cao lỏng, cho chuột uống 0,4ml cao lỏng tương đương liều gấp 100 lần liều sử dụng trên người.

Liều sử dụng trên thỏ: Cô cách thủy 6000ml nước sắc thành 300ml cao lỏng, 1ml cao lỏng tương đương 20 ml nước sắc. Cho thỏ uống liên tục 30 ngày, mỗi ngày uống 1 lần với liều 3ml cao lỏng/1kg thỏ (tương đương với liều 60ml nước sắc/kg).

Nghiên cứu độc tính cấp và bán cấp qua đường tiêu hóa trên động vật thực nghiệm, xác định theo phương pháp Karber G [3].

* Nghiên cứu độc tính cấp:

- Chia ngẫu nhiên chuột nhắt trắng làm 6 nhóm, mỗi nhóm 10 con (trong đó 1 nhóm đối chứng cho chuột uống nước cất và 5 nhóm thí nghiệm).

- Cho 6 nhóm chuột thí nghiệm (từ nhóm 2 đến nhóm 6) uống nước sắc thuốc viêm gan B 1 lần vào buổi sáng bằng dụng cụ chuyên dụng (bơm trực tiếp vào dạ dày chuột), nhóm đối chứng cho uống nước cất với phương pháp tương tự.

- Liều 1ml cao lỏng/con (lớn gấp 250 lần liều sử dụng trên người, tương đương 1666,67mg dược chất/con) là liều cao nhất có thể cho chuột uống. Theo dõi số chuột chết ở các nhóm trong 7 ngày.

* Nghiên cứu độc tính bán cấp:

- Chia ngẫu nhiên thỏ làm 2 nhóm, mỗi nhóm 8 con (trong đó, 1 nhóm đối chứng và 1 nhóm thí nghiệm).

- Cho thỏ thí nghiệm (nhóm 2) uống nước sắc thuốc điều trị viêm gan B mỗi ngày một lần vào buổi sáng bằng dụng cụ chuyên dụng (bơm trực tiếp vào dạ dày thỏ), thời gian uống thuốc 30 ngày liều 3ml cao lỏng/1kg thỏ (tương đương 60ml nước sắc/kg thể trọng/ngày, tương đương 990mg dược chất/kg thể trọng/ngày); nhóm đối chứng (nhóm 1) cho uống nước cất với thời gian tương tự.

- Liều 3ml cao lỏng/kg thể trọng (lớn gấp 3 lần liều sử dụng trên người, tương đương 990mg dược chất/kg thể trọng), đánh giá ảnh hưởng của thuốc đến chức năng gan, thận, cơ quan tạo máu trên thỏ thực nghiệm thông qua một số chỉ tiêu sinh hóa, huyết học khi cho thỏ uống thuốc liên tục 30 ngày.

- Thời gian lấy máu xét nghiệm: lấy máu tại thỏ xét nghiệm tại 2 thời điểm: trước khi uống: n_0 , sau khi uống

30 ngày: n_{30} . Xét nghiệm huyết học được thực hiện trên máy CELL-DYN3700 (Hoa Kỳ); xét nghiệm sinh hóa được thực hiện trên máy OLYMPUS-AU400 (Nhật Bản) tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

* Phương pháp đánh giá kết quả:

- Trường hợp chuột 6 nhóm chết 100%:

Tính LD_{50} theo công thức: $LD_{50} = LD_{100} - (\Sigma Z.d/n)$.

Trong đó: Z: Số trung bình từ vong của 2 nhóm kề cận; d: Khoảng cách liều giữa các nhóm; n: Số động vật trong từng nhóm.

- Trường hợp chuột 6 nhóm không chết 100%:

Khi đó không xác định được LD_{50} . Trong trường hợp này, tính kết quả ở dạng tỷ lệ chuột bị chết ở các liều tương ứng.

- Trường hợp chuột ở tất cả 6 nhóm đều không chết:

Kết luận: Ở liều tối đa có thể, động vật uống nước sắc thuốc không gây chết. Như vậy, không xác định được độc tính của thuốc [3].

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả xác định độc tính cấp.

Bảng 1: Độc tính cấp của bài thuốc điều trị viêm gan B trên chuột nhắt trắng qua đường tiêu hóa

Các chỉ số ở chuột	Số lượng chuột (con)	Liều dùng cao lỏng (ml/con)	SL chuột chết sau 7 ngày (con)	Hiệu 2 liều kế tiếp (d)	Số chuột chết TB 2 liều kế tiếp (a)	Tích số a.d	Tỷ lệ % chết
Nhóm 1 (nhóm chứng)	10	Nước cất	0		0	0	0
Nhóm 2	10	0,2ml	0	0,2	0	0	0
Nhóm 3	10	0,4ml	0	0,2	0	0	0
Nhóm 4	10	0,6ml	0	0,2	0	0	0
Nhóm 5	10	0,8ml	0	0,2	0	0	0
Nhóm 6	10	1ml	0	0,2	0	0	0

Với liều 0,4ml cao lỏng/con, (tương ứng với liều gấp 100 lần liều dùng trên người, tương ứng với liều 666,8mg dược chất) chuột ở các nhóm vẫn hoạt động, ăn uống bình thường; không có chuột nào chết sau 7 ngày uống cao lỏng thuốc điều trị viêm gan B. Với nhóm 6, cho chuột uống liều 1ml cao lỏng thuốc điều trị viêm gan B (tương đương với liều gấp 250 lần liều dùng trên người và tương đương với liều 1666,67mg dược chất) là liều cao nhất có thể cho chuột uống, không có chuột nào chết sau 7 ngày do đó, không xác định được liều độc cấp

Tiếp tục theo dõi sau 4 ngày, 5 ngày uống thuốc cả 6 nhóm chuột vẫn khỏe mạnh, hoạt động ăn uống bình thường, không có chuột chết.

2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán cấp.

Bảng 2: Sự thay đổi các chỉ tiêu sinh hóa đánh giá chức năng thận trên thỏ trước và sau khi uống thuốc điều trị viêm gan vi rút B

Nhóm nghiên cứu Các chỉ tiêu nghiên cứu		Nhóm chứng		Nhóm nghiên cứu	
		n0	n30	n0	n30
Ure (mmol/l)	X	5,8	6,3	5,6	4,6
	SD	1,1	1,6	1,3	0,6
	P	> 0,05		> 0,05	
Creatini n (μ mol/l)	X	82,5	88,3	78,8	85,7
	SD	4,8	10,1	6,8	11,1
	P	> 0,05		> 0,05	

Với liều thuốc lớn gấp 3 lần liều dùng trên người (tương ứng với 1,2g dược chất/kg thể trọng), cho thở uống trong 30 ngày liên tục, hàm lượng ure, creatinin trước và sau khi uống thuốc 30 ngày liên tục ở cả 2 nhóm, nhóm nghiên cứu và nhóm chứng thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

Bảng 3: Sự thay đổi các chỉ tiêu sinh hóa đánh giá chức năng gan trên thỏ trước và sau khi uống thuốc điều trị viêm gan vi rút B

Nhóm nghiên cứu Các chỉ tiêu nghiên cứu		Nhóm chứng		Nhóm nghiên cứu	
		n0	n30	n0	n30
AST (U/L)	X	75,5	62,5	53,7	60,2
	SD	12,6	10,5	9,8	12,1
	P	> 0,05		> 0,05	
ALT (U/L)	X	76,0	63,5	66,5	59,7
	SD	27,8	20,8	11,7	13,4
	P	> 0,05		> 0,05	
GGT (U/L)	X	9,8	10,8	9,0	11,0
	SD	3,4	3,1	2,1	2,6
	P	> 0,05		> 0,05	

Với liều thuốc lớn gấp 3 lần liều dùng trên người (tương ứng với 1,2g dược chất/kg thể trọng), cho thở uống trong 30 ngày liên tục, hoạt độ enzym AST, ALT và GGT trước và sau khi uống thuốc 30 ngày ở cả 2 nhóm, nhóm nghiên cứu và nhóm chứng thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

Bảng 4: Sự thay đổi các chỉ tiêu huyết học trên thỏ trước và sau khi uống thuốc điều trị viêm gan vi rút B

Nhóm nghiên cứu Các chỉ tiêu nghiên cứu		Nhóm chứng		Nhóm nghiên cứu	
		n0	n30	n0	n30
Hồng cầu (RBC: T/l)	X	5,3	6,1	5,9	6,2
	SD	1,5	0,3	0,9	0,4
	P	> 0,05		> 0,05	
Bạch cầu (WBC: T/l)	X	8,7	10,2	8,5	9,6
	SD	2,3	1,4	2,9	3,3
	P	> 0,05		> 0,05	
Huyết sắc tố (HGB, g/l)	X	118,0	123,5	122,3	127,3
	SD	22,5	10,1	16,7	8,6
	P	> 0,05		> 0,05	

Trước và sau khi uống thuốc liên tục 30 ngày ở cả 2 nhóm, nhóm nghiên cứu và nhóm chứng, chỉ số hồng cầu, bạch cầu và huyết sắc tố thay đổi không có ý nghĩa thống kê với $P > 0,05$, các chỉ tiêu này vẫn trong giới hạn bình thường.

Các vị thuốc trong bài thuốc nghiên cứu đều là những vị thuốc YHCT thường ứng dụng trên lâm sàng để điều trị nhiều chứng bệnh, trong đó, có viêm gan virus B. Liều độc của từng vị thuốc đã được nhiều tác giả nghiên cứu và công bố ít độc, có thể ứng dụng trên lâm sàng để điều trị cho người bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn liều nghiên cứu từ 0,2ml cao lỏng/chuột (gấp 50 lần liều dùng trên người, tương đương 333,3mg dược chất/con chuột) đến 1 ml cao lỏng/chuột (gấp 250 lần liều dùng trên người, tương đương 1666,67mg dược chất/con chuột), với thỏ chúng tôi chọn liều 3ml cao lỏng/kg thể trọng (gấp 3 lần liều dùng trên lâm sàng đối với người, tương ứng với 1,2g dược chất/kg thể trọng). Kết quả nghiên cứu trên động vật thực nghiệm về độc tính cấp cũng như bán cấp cho thấy bài thuốc điều trị viêm gan B rất ít độc.

KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu độc tính cấp và bán cấp của bài thuốc thừa kế điều trị viêm gan B trên 60 chuột nhất trắng thuần chủng dòng Swiss và 16 thỏ, chúng tôi rút ra kết luận:

- Chưa phát hiện được liều LD_{50} của bài thuốc (khi cho chuột uống với liều tối đa 1ml cao lỏng gấp 250 lần liều dùng trên người (tương ứng với 1666,67mg dược chất/con chuột), không thấy chuột chết khi theo dõi trong thời gian 7 ngày).

- Với liều thuốc 3ml cao lỏng/kg thể trọng đối với thỏ (tương ứng với 1,2g dược chất/kg thể trọng), uống liên tục trong 30 ngày, theo dõi trong 30 ngày sau uống thuốc, thỏ vẫn hoạt động bình thường, ăn uống tốt, lông mượt, phân khô, không có thỏ chết. Một số chỉ tiêu sinh hóa đánh giá chức năng gan (ALT, AST, GGT), chức năng thận (Ure, creatinin) thay đổi không có ý nghĩa thống kê và các chỉ tiêu hồng cầu, bạch cầu, huyết sắc tố của thỏ thay đổi không có ý nghĩa thống kê. Do đó, không xác định được độc tính bán cấp của bài thuốc điều trị viêm gan B trên chuột nhất trắng và trên thỏ qua đường uống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế. Hướng dẫn nghiên cứu đánh giá tính an toàn và hiệu lực của thuốc cổ truyền Việt Nam. Nhà xuất bản Y học. Hà Nội. 1996.
2. Trần Quốc Bảo. Lý luận cơ bản YHCT. Nhà xuất bản Y học. Hà Nội. 2010.
3. Đỗ Trung Đàm. Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc. Nhà xuất bản Y học. Hà Nội. 1996.
4. Chu Quốc Trường và cs. Đánh giá tác dụng bài thuốc livcol với bệnh nhân viêm gan B mạn tính. Tạp chí nghiên cứu y dược học cổ truyền Việt Nam số 14, 2/2005.
5. Vũ Bằng Đình, Đặng Kim Thanh. Viêm gan virus và những hậu quả, Nhà xuất bản Y học năm 2005. Trang 15, 22, 114-119
6. Bùi Đại. Viêm gan virus B & D, Nhà xuất bản Y học năm 2002.