

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN CẤP CỦA THUỐC LIPIDAN TRÊN THỰC NGHIỆM

PHẠM VŨ KHÁNH, TỐNG THỊ TAM GIANG, LÊ THỊ HIỀN
Học viện YDHCT Việt Nam

ĐẶT VẤN ĐỀ

LIPIDAN là một chế phẩm Đông dược, được hiện đại hóa dưới dạng viên nén. Công thức của thuốc LIPIDAN được thành lập dựa trên cơ sở lý luận của y học cổ truyền (YHCT). Đây là bài thuốc kinh nghiệm của lương y Nguyễn Thiên Tích, nguyên chủ tịch Trung ương Hội Đông y, được PGS TS BS Phạm Vũ Khánh thừa kế, đã sử dụng điều trị hội chứng rối loạn lipid máu trong nhiều năm cho kết quả khả quan.

Sau khi nghiên cứu hiện đại hóa bài thuốc dưới dạng viên nén, chúng tôi tiến hành nghiên cứu trên thực nghiệm với mục tiêu: **Nghiên cứu độc tính cấp và bán cấp của thuốc LIPIDAN trên thực nghiệm** nhằm đánh giá lại độc tính sau khi đã cải dạng thuốc.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu nghiên cứu

Nguyên liệu nghiên cứu là thuốc dạng viên nén LIPIDAN được nghiên cứu sản xuất trên quy mô pilot tại Học viện Y - Dược học cổ truyền Việt Nam và Đại học Dược Hà Nội. Số lô sản xuất: LPD15062008.

Thành phần cấu tạo cho một viên thuốc:

Trần bì	0,33g	Bán hạ chế	0,33g
Bạch linh	0,67g	Hậu phác	0,25g
Nam mộc hương	0,42g	Sơn tra	0,33g
Ngũ gia bì	0,33g	Sinh khương	0,08g
Xa tiền tử	0,33g	Tá dược	vỡ

Dạng bào chế: thuốc được sản xuất dưới dạng viên nén, đóng lọ thành phẩm 50 viên/lọ.

Liều dùng: 12 viên/ngày, chia 3 lần, uống trước bữa ăn 20 – 30 phút.

2. Đối tượng nghiên cứu

2.1. Nghiên cứu độc tính cấp: chuột nhắt trắng *Mus musculus* chủng Swiss, thuần chủng, cả hai giống đực và cái khoẻ mạnh, 6 tuần tuổi, trọng lượng $20,0 \pm 2,0g$.

2.2. Nghiên cứu độc tính bán cấp: thỏ chủng *Orytolagus Cuniculus*, cả hai giống đực và cái khoẻ mạnh, trọng lượng 1,8- 2,5kg. Tất cả chuột, thỏ được nuôi trong phòng thí nghiệm với cùng điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng thí nghiệm, thời gian sáng - tối 12/12h, ăn thức ăn tổng hợp, nước uống tự do (ad libitum)

3. Phương pháp nghiên cứu

3.1. Thử độc tính cấp

Xác định trên các nhóm chuột nhắt trắng theo đường uống, chuột nhắt trắng nhện đối 16 giờ, được chia thành 12 lô, mỗi lô 10 con. Chuột được cho uống thuốc với các liều khác nhau tăng dần, từ liều cao nhất không gây chết (g/kg) đến liều thấp nhất gây chết 100% chuột nhắt trắng, trong cùng một thể tích là 0,2ml thuốc/10g trọng lượng cơ thể chuột, cho uống 3 lần trong 24 giờ

Chuột được theo dõi tình trạng chung trong suốt 7 ngày và tỷ lệ chết trong 72 giờ của từng lô để xác định liều chết 50% (LD50).

3.2. Thử độc tính bán cấp

LIPIDAN đã được dự kiến liều điều trị sử dụng trên người khi không xác định được LD50, nên chúng tôi đã ngoại suy từ liều trên người cho các thử nghiệm độc tính, có tham khảo liều chết 50% (LD50).

Thỏ được chia ngẫu nhiên thành 3 lô khác nhau, mỗi lô 12 con.

- Lô chứng uống nước lọc

- Lô uống LIPIDAN liều I: 2,4g/kg trọng lượng cơ thể thỏ/ngày (gấp 10 lần liều điều trị)

- Lô uống LIPIDAN liều II: 3,6g/kg trọng lượng cơ thể thỏ/ngày (gấp 15 lần liều điều trị)

Thuốc viên được nghiền nhỏ, liều điều trị cho thỏ được pha trong cùng một thể tích là 5ml/kg trọng lượng cơ thể thỏ, liên tục trong 42 ngày, tiến hành quan sát tất cả các thỏ đánh giá các chỉ tiêu gồm:

- Sinh lý - dược lý: tình trạng chung, hoạt động, ăn uống, trọng lượng cơ thể, ghi điện tim.

- Huyết học: hồng cầu, hemoglobin, bạch cầu, công thức bạch cầu, tiểu cầu.

- Sinh hóa: AST, ALT, bilirubin, ure, creatinin.

- Mô bệnh học: vào ngày thứ 42 thỏ được phẫu thuật, quan sát hình ảnh đại thể gan, lách, thận. Sau đó sinh thiết các tạng để nghiên cứu hình ảnh mô bệnh học của tất cả các thỏ thực nghiệm (với tất cả các mẫu).

* Thời điểm xét nghiệm: lấy máu xét nghiệm các chỉ số sinh hóa, huyết học, ghi điện tim tại 3 thời điểm: xuất phát điểm, sau 3 tuần, sau 6 tuần nghiên cứu.

4. Phương pháp xử lý số liệu

Theo phương pháp thống kê sinh -y-dược học bằng chương trình Epi-info 6.04 của Tổ chức Y tế thế giới.

KẾT QUẢ

1. Độc tính cấp. Bảng 1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của LIPIDAN

Nhóm	Số mẫu	Mức liều (g/kg)	Số chuột theo dõi trong 72h			
			24h	48h	72h	Sống
1	10	4,0	0	0	0	10
2	10	6,0	0	0	0	10
3	10	8,0	0	0	0	10
4	10	10,0	0	0	0	10
5	10	12,0	0	0	0	10
6	10	14,0	0	0	0	10
7	10	16,0	0	0	0	10
8	10	18,0	0	0	0	10
9	10	20,0	0	0	0	10
10	10	22,0	0	0	0	10
11	10	24,0	0	0	0	10
12	10	26,0	0	0	0	10

Sau khi cho chuột thí nghiệm uống LIPIDAN đến mức liều cao nhất có thể là 26g/kg thể trọng chuột nhất trắng, tất cả chuột thí nghiệm ở các lô đều ăn, uống, đi lại, hoạt động bình thường. Theo dõi sau 72 giờ không có chuột thí nghiệm bị chết.

2. Độc tính bán cấp

Bảng 2. Ảnh hưởng của LIPIDAN đến trọng lượng các lô thử trước, trong và sau uống LIPIDAN

TLCT (kg)	Chứng n = 12	Lô nghiên cứu		p
		2,4g/kg/24h (n = 12)	3,6g/kg/24h (n = 12)	
Thời gian	X ± SD (1)	X ± SD (2)	X ± SD (3)	
Trước thí nghiệm (a)	2,08 ± 0,20	2,05 ± 0,27	2,02 ± 0,14	p > 0,05
Sau 3 tuần (b)	2,16 ± 0,15	2,27 ± 0,12	2,25 ± 0,12	
Sau 6 tuần (c)	2,52 ± 0,19	2,50 ± 0,18	2,48 ± 0,11	
p	pb-a < 0,05; pc-b < 0,05; pc-a < 0,05			

Bảng 3. Ảnh hưởng của LIPIDAN đối với điện tim của thỏ ở đạo trình DII

Chỉ tiêu	Thời điểm xét nghiệm	Lô nghiên cứu			p
		Chứng (n = 12)	2,4g/kg/24h (n = 12)	3,6g/kg/24h (n = 12)	
		X ± SD (1)	X ± SD (2)	X ± SD (3)	
Tần số (chu kỳ/phút)	Trước thí nghiệm (a)	224,14 ± 16,04	218,02 ± 14,24	221,14 ± 22,18	p2-1>0,05 p3-1>0,05 p3-2 >0,05
	Sau 3 tuần (b)	225,37 ± 18,96	224,78 ± 11,24	225,12 ± 16,07	
	Sau 6 tuần (c)	218,02 ± 12,48	224,41 ± 12,92	227,23 ± 10,62	
	p	pc-a > 0,05; pb-a > 0,05; pc-b > 0,05			
Biên độ (mV)	Trước thí nghiệm (a)	5,08 ± 0,40	5,47 ± 0,48	5,60 ± 0,64	p2-1>0,05 p3-1>0,05 p3-2 >0,05
	Sau 3 tuần (b)	4,98 ± 0,34	5,04 ± 0,66	5,18 ± 0,42	
	Sau 6 tuần (c)	4,90 ± 0,23	4,98 ± 0,72	5,04 ± 0,49	
	p	pc-a > 0,05; pb-a > 0,05; pc-b > 0,05			
Sóng bất thường		Không	Không	Không	

Bảng 4. Ảnh hưởng của LIPIDAN đối với số lượng HC, Hb, Hct thỏ

Chỉ tiêu	Thời điểm xét nghiệm	Lô nghiên cứu			p
		Chứng (n = 12)	2,4g/kg/24h (n = 12)	3,6g/kg/24h (n = 12)	
		X ± SD (1)	X ± SD (2)	X ± SD (3)	
Số lượngHC (T/L)	Trước thí nghiệm (a)	5,08 ± 0,24	5,02 ± 0,12	5,16 ± 0,48	p > 0,05
	Sau 3 tuần (b)	5,18 ± 0,74	5,24 ± 0,61	5,28 ± 0,17	
	Sau 6 tuần (c)	5,36 ± 0,79	5,41 ± 0,26	5,24 ± 0,80	
	p	pc-a > 0,05; pb-a > 0,05; pc-b > 0,05			
Lượng Hb (g/l)	Trước thí nghiệm (a)	104,21 ± 10,24	108,27 ± 4,84	106,04 ± 8,27	p > 0,05
	Sau 3 tuần (b)	102,16 ± 6,21	109,42 ± 4,56	107,22 ± 4,02	
	Sau 6 tuần (c)	104,21 ± 6,32	104,48 ± 5,73	109,17 ± 6,98	
	p	pc-a > 0,05; pb-a > 0,05; pc-b > 0,05			
Hct (%)	Trước thí nghiệm (a)	0,31 ± 0,05	0,32 ± 0,03	0,34 ± 0,04	p > 0,05
	Sau 3 tuần (b)	0,36 ± 0,04	0,32 ± 0,06	0,31 ± 0,04	
	Sau 6 tuần (c)	0,32 ± 0,03	0,34 ± 0,05	0,32 ± 0,05	
	p	pc-a > 0,05; pb-a > 0,05; pc-b > 0,05			

Bảng 5. Ảnh hưởng của LIPIDAN đối với số lượng và tỷ lệ bạch cầu trong máu thỏ

Chỉ tiêu	Thời điểm xét nghiệm	Lô nghiên cứu			p
		Chứng (n = 12)	2,4g/kg/24h (n = 12)	3,6g/kg/24h (n = 12)	
		X ± SD (1)	X ± SD (2)	X ± SD (3)	
Số lượngBC (G/L)	Trước thí nghiệm (a)	7,26 ± 1,04	6,80 ± 1,72	6,94 ± 1,26	p > 0,05
	Sau 3 tuần (b)	7,42 ± 2,46	6,92 ± 1,27	7,06 ± 1,32	
	Sau 6 tuần (c)	7,27 ± 1,24	7,08 ± 1,44	7,15 ± 2,12	
	p	p > 0,05			
BCTT (%)	Trước thí nghiệm (a)	36,32 ± 7,03	36,06 ± 8,24	35,17 ± 6,46	p > 0,05
	Sau 3 tuần (b)	37,03 ± 6,68	37,26 ± 6,31	36,14 ± 7,09	
	Sau 6 tuần (c)	37,28 ± 7,27	38,06 ± 4,35	37,04 ± 5,40	
	p	p > 0,05			
BC lympho (%)	Trước thí nghiệm (a)	50,86 ± 4,48	52,46 ± 7,27	51,47 ± 6,98	p > 0,05
	Sau 3 tuần (b)	48,25 ± 4,86	52,08 ± 7,21	55,06 ± 6,84	
	Sau 6 tuần (c)	53,28 ± 6,22	52,68 ± 9,31	48,57 ± 9,06	
	p	p > 0,05			
BC mono (%)	Trước thí nghiệm (a)	3,26 ± 1,20	3,19 ± 1,37	3,28 ± 1,12	p > 0,05
	Sau 3 tuần (b)	3,08 ± 0,64	3,08 ± 0,27	3,09 ± 0,87	
	Sau 6 tuần (c)	3,24 ± 0,72	3,42 ± 1,03	3,29 ± 0,67	
	p	pc-a > 0,05; pb-a > 0,05; pc-b > 0,05			

Bảng 6. Ảnh hưởng của LIPIDAN đối với số lượng TC thỏ

Số lượng TC (G/L)	Lô nghiên cứu			p
	Chứng (n = 12)	2,4g/kg/24h (n = 12)	3,6g/kg/24h (n = 12)	
Thời gian	$\bar{X} \pm SD$ (1)	$\bar{X} \pm SD$ (2)	$\bar{X} \pm SD$ (3)	
Trước thí nghiệm (a)	305,26 ± 64,74	302,57 ± 87,34	309,46 ± 62,91	p > 0,05
Sau 3 tuần (b)	312,34 ± 78,92	314,02 ± 86,46	302,15 ± 67,29	p < 0,05
Sau 6 tuần (c)	307,84 ± 69,25	308,37 ± 64,12	303,86 ± 82,0	p < 0,01
p	pc-a < 0,05; pb-a < 0,05; pc-b > 0,05			-

Bảng 7. Ảnh hưởng của LIPIDAN đối với hoạt độ enzyme AST, ALT thỏ

Chỉ tiêu	Thời điểm xét nghiệm	Lô nghiên cứu			p
		Chứng n = 12	2,4g/kg/24h (n = 12)	3,6g/kg/24h (n = 12)	
		$\bar{X} \pm SD$ (1)	$\bar{X} \pm SD$ (2)	$\bar{X} \pm SD$ (3)	
Hoạt độ enzym AST (U/L)	Trước thí nghiệm (a)	39,48 ± 14,87	40,28 ± 18,27	37,97 ± 20,12	p > 0,05
	Sau 3 tuần (b)	42,08 ± 12,87	43,58 ± 12,84	39,20 ± 19,98	
	Sau 6 tuần (c)	41,86 ± 15,82	42,48 ± 17,37	40,24 ± 18,43	
	p	pc-a > 0,05; pb-a > 0,05; pc-b > 0,05			
Hoạt độ enzym ALT (U/L)	Trước thí nghiệm (a)	103,46 ± 16,84	108,21 ± 34,46	104,53 ± 24,89	p > 0,05
	Sau 3 tuần (b)	101,98 ± 22,35	104,45 ± 16,67	104,68 ± 21,87	
	Sau 6 tuần (c)	105,38 ± 12,46	105,37 ± 25,67	115,43 ± 21,76	
	p	pc-a > 0,05; pb-a > 0,05; pc-b > 0,05			
Hàm lượng Urê (mmol/L)	Trước thí nghiệm (a)	5,08 ± 0,43	5,32 ± 1,18	4,97 ± 1,98	p > 0,05
	Sau 3 tuần (b)	5,23 ± 1,28	5,09 ± 1,36	5,05 ± 1,86	
	Sau 6 tuần (c)	5,27 ± 1,67	5,28 ± 1,36	5,02 ± 1,42	
	p	pc-a > 0,05; pb-a > 0,05; pc-b > 0,05			
Hàm lượng Creatinin (μmol/L)	Trước thí nghiệm (a)	61,12 ± 14,23	62,26 ± 5,18	60,44 ± 12,49	p > 0,05
	Sau 3 tuần (b)	62,64 ± 12,51	64,50 ± 6,67	62,69 ± 11,32	
	Sau 6 tuần (c)	62,88 ± 16,06	63,78 ± 18,21	63,32 ± 15,23	
	p	pc-a > 0,05; pb-a > 0,05; pc-b > 0,05			

Bảng 8. Ảnh hưởng của LIPIDAN trên hình thái mô bệnh học của gan thỏ (n = 12)

Chỉ tiêu đánh giá	Lô chứng	LIPIDAN liều I	LIPIDAN liều II
Tế bào gan	bình thường	Bình thường, bào tương thuần nhất	Bình thường, bào tương thuần nhất
Cấu trúc tiểu thùy	bình thường	Các tiểu thùy gan rõ	Các tiểu thùy gan rõ
Cấu trúc khoảng cửa	bình thường	bình thường	bình thường
Mạch máu	bình thường	Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy xung huyết nhẹ	Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy xung huyết nhẹ
Các tổn thương	không có	không có	không có
Kết luận	Gan bình thường	Không thấy hình ảnh tổn thương	Không thấy hình ảnh tổn thương

Bảng 9. Ảnh hưởng của LIPIDAN trên hình thái mô bệnh học của thận thỏ (n = 12)

Chỉ tiêu đánh giá	Lô chứng	LIPIDAN liều I	LIPIDAN liều II
Màu sắc	Màu nâu nhạt	Màu nâu nhạt	Màu nâu nhạt
Cấu trúc vùng vỏ	Rõ ràng	Rõ ràng	Rõ ràng
Cấu trúc vùng tủy	Bình thường	Rõ ràng	Rõ ràng
Cầu thận	Bình thường	Bình thường, khoang Bowman rõ	Bình thường, khoang Bowman rõ
ống thận	Bình thường	Các ống thận đều	Các ống thận đều
Tổn thương	Không có	Không có	Không có
Kết luận	Mô thận bình thường	Mô thận bình thường, không thấy hình ảnh tổn thương.	Mô thận bình thường, không thấy hình ảnh tổn thương.

Bảng 10. Ảnh hưởng của LIPIDAN trên hình thái mô bệnh học của lách thỏ (n = 12)

Chỉ tiêu đánh giá	Lô chứng	LIPIDAN liều I	LIPIDAN liều II
Màu sắc	Nâu đậm	Nâu đậm	Nâu đậm
Cấu trúc vùng tủy trắng, các nang lympho	Rõ ràng	Rõ ràng	Rõ ràng
Cấu trúc mạch máu	Bình thường	Xung huyết nhẹ	Xung huyết nhẹ
Cấu trúc xoang	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Các tổn thương	Không có	Không có	Không có
Kết luận	Mô lách bình thường	Mô lách bình thường	Mô lách bình thường

BÀN LUẬN

LIPIDAN là một chế phẩm Đông dược, được hình thành từ bài thuốc kinh nghiệm đã được sử dụng nhiều năm dưới dạng thuốc sắc, có tác dụng tốt trong việc điều chỉnh các trường hợp rối loạn lipid máu và không thấy có các biểu hiện nhiễm độc đối với người sử dụng.

Với mục tiêu hiện đại hóa các chế phẩm dược cổ truyền, bài thuốc đã được nghiên cứu cải dạng thành viên nén. Tuy đã được công nhận tác dụng qua quá trình sử dụng theo phương pháp sắc truyền thống, nhưng để đảm bảo đúng yêu cầu của Bộ Y tế và tuân thủ các quy định về đạo đức trong nghiên cứu, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu độc tính cấp và bán cấp của thuốc. Kết quả nghiên cứu cho thấy: quá trình bào chế cải dạng thuốc không gây độc cho chế phẩm. Đây là kết quả lạc quan trong quá trình nghiên cứu cải dạng thuốc YHCT, kết quả này góp phần hiện đại hóa YHCT, đồng thời mở ra hướng tiếp tục nghiên cứu cải dạng các bài thuốc YHCT có tác dụng tốt trong điều trị, tạo điều kiện dễ dàng cho người bệnh trong quá trình sử dụng thuốc YHCT.

KẾT LUẬN

1. Về độc tính cấp tính

Chưa xác định được độc tính cấp (LD50) của LIPIDAN dùng theo đường uống. Với thể tích lớn nhất có thể đưa vào dạ dày chuột nhắt trắng, không gây chết chuột nhắt trắng thực nghiệm ở liều 26,0g/kg TLCT.

2. Về độc tính bán cấp

Khi dùng uống trong thời gian 42 ngày liên tục trên thỏ thực nghiệm :

- Không ảnh hưởng đến sự phát triển trọng lượng cơ thể
- Không làm ảnh hưởng đến sóng điện tim thỏ.
- Không độc với tế bào máu (số lượng hồng cầu, hemoglobin, hematocrite, tiểu cầu, bạch cầu,

công thức bạch cầu).

- Không ảnh hưởng đến chức năng thận (hàm lượng creatinin, ure), chức năng gan (hoạt độ enzyme AST, ALT).

- Về hình thái mô bệnh học: không gây tổn thương mô bệnh học của gan, lách và thận.

Như vậy LIPIDAN an toàn trên động vật thực nghiệm ở các mức liều đã khảo sát.

SUMMARY

LIPIDAN is a traditional Vietnamese product modernized into tables. In order to reevaluate its toxicity after being made, we do lots of experiments on animal with a view to evaluating LIPIDAN acute and sub-acute toxicity. The result is successful because the modern manufacture doesn't contaminate the medicine.

Keywords: Lipidan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (1996), *Quy định về nghiên cứu dược lý các thuốc y học cổ truyền dân tộc*. Ban hành kèm theo Quyết định số 371/QĐ-BYT ngày 12 tháng 3 năm 1996 của Bộ trưởng Bộ Y tế.
2. Bộ Y tế (2005), *Dự thảo hướng dẫn thử độc tính của thuốc - Các phương pháp tính LD50 cổ điển*, Phụ lục 3.
3. Bộ Y tế (2005), *Dự thảo hướng dẫn thử độc tính của thuốc - Phương pháp thử độc tính liều nhắc lại 28 ngày, đường uống - OECD Guideline: Repeated Dose Toxicity 28 Days - Oral*, Phụ lục 3.
4. Bộ Y tế (2005), *Dự thảo hướng dẫn thử độc tính của thuốc - Các phương pháp thử độc tính cấp - OECD*, Phụ lục 2.
5. Abraham W.B. (1978), *Techniques of Animal and Clinical Toxicology*, Med. Pub. Chicago, pp 55 - 68.
6. WHO (1993), *Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines*, Manila, Philippine, pp 35 - 41.