

Nghiên cứu và đánh giá độc tính cấp, tác động kháng viêm của bài thuốc gia truyền Cao Khai sản xuất tại tỉnh Ninh Thuận

Nguyễn Thị Bạch Tuyết¹, Hoàng Thị Phương Liên¹, Lê Mộc Nhiên¹,
Mai Thị Ngọc Ánh¹, Phạm Trí Nhật², Bạch Long Giang³

¹ Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

² Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Đại học Nguyễn Tất Thành

³ Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³ Phòng Khoa học công nghệ, Đại học Nguyễn Tất Thành

* nbtuyet@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Đề tài khảo sát độc tính cấp đường uống và tác dụng kháng viêm của bài thuốc gia truyền Cao Khai sản xuất tại tỉnh Ninh Thuận. Các thử nghiệm *in vivo* trên chuột nhắt trắng *Swiss albino*, 6 - 8 tuần tuổi, trọng lượng trung bình khoảng 22 g. Khảo sát độc tính cấp đường uống của bài thuốc gia truyền Cao Khai liều 5000 mg/kg với thể tích 50 mL/kg trọng lượng chuột, theo dõi tỉ lệ chết và biểu hiện độc tính cấp trong vòng 14 ngày. Sự thay đổi về trọng lượng cơ thể, chỉ số huyết học, chức năng gan và thận của chuột sẽ được ghi nhận vào cuối thử nghiệm. Tác dụng điều trị viêm của bài thuốc gia truyền Cao Khai với liều 400 và 800 mg/kg được xác định trên mô hình gây viêm bàn chân chuột nhắt bằng carrageenan 1%, mỗi lô 8 chuột. Diclofenac liều 5 mg/kg được sử dụng làm chất đối chứng. Kết quả cho thấy bài thuốc gia truyền Cao Khai không gây ra độc tính cấp đường uống ở nồng độ 5000 mg/kg, được xếp vào phân loại 6 – chất gần như không có độc tính theo GSH (Globally Harmonised System for Classification of Chemicals). Hơn nữa, bài thuốc gia truyền Cao Khai không gây ra sự khác biệt đáng kể trên trọng lượng chuột, chức năng tạo máu, chức năng thận, chức năng gan của chuột ($p > 0,05$). Trên mô hình khảo sát tác động điều trị viêm, bài thuốc gia truyền Cao Khai thể hiện tác động làm giảm độ phù chân chuột đáng kể ở cả hai liều 400 và 800 mg/kg ($p < 0,05$); nhưng khởi phát chậm hơn so với thuốc đối chứng diclofenac liều 5 mg/kg.

Nhận 17.10.2020
Được duyệt 26.10.2020
Công bố 30.10.2020

Từ khóa
bài thuốc gia truyền Cao Khai, độc tính cấp, tác động kháng viêm

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Mở đầu

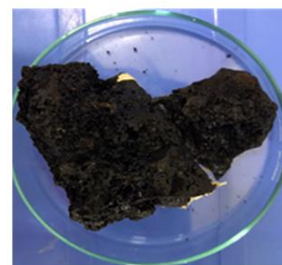
Dây Khai vốn là loài cây đặc hữu, giàu tiềm năng và được người dân sử dụng như một phần không nhỏ trong chăm sóc sức khỏe thông qua các bài thuốc cổ truyền. Hiện nay, dược liệu Dây Khai và cao khô từ Dây Khai – bài thuốc gia truyền Cao Khai (thường được gọi là “Cao Khai”) ở Ninh Thuận được xem là một nguồn tài nguyên quý giá, có giá trị khoa học, có ý nghĩa thực tiễn với nhiều công dụng khác nhau như kháng viêm, kháng khuẩn, dùng ngoài để rửa làm lạnh vết thương, điều trị các bệnh xương khớp [1]. Tuy nhiên, vẫn chưa có bài báo khoa học thực nghiệm nào chứng minh cơ sở khoa học về tính an toàn cũng như tác dụng dược lí của bài thuốc gia truyền Cao Khai. Với những lí do vừa nêu trên, đề tài “Nghiên cứu và đánh giá độc tính cấp, tác động

kháng viêm của bài thuốc gia truyền Cao Khai sản xuất tại tỉnh Ninh Thuận” được tiến hành.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

2.1.1 Mẫu thử



Hình 1 Hình ảnh về Cao Khai

Bài thuốc gia truyền Cao Khai (thường được gọi là Cao Khai) được thu thập từ huyện Ninh Sơn, tỉnh Ninh Thuận. Bài thuốc gia truyền Cao Khai được chế biến theo phương pháp chiết nóng từ cây Dây Khai và cô tới cao khô đạt được độ ẩm khoảng 5%.

2.1.2 Động vật nghiên cứu

Chuột nhắt trắng đực, chủng Swiss albino, 6 - 8 tuần tuổi, trọng lượng trung bình (22 ± 2) g, được cung cấp bởi Viện Vaccin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang. Chuột khỏe mạnh, không dị tật, không có biểu hiện bất thường, được nuôi ổn định trong môi trường tiền hành thí nghiệm 5 ngày. Chuột nuôi trong lồng kích thước ($15 \times 26 \times 36$) cm (cao \times rộng \times dài), có lót lớp trấu ở đáy. Chuột được cung cấp đầy đủ thức ăn và nước uống trong suốt thời gian thử nghiệm.

2.1.3 Hóa chất:

Carrageenan 1% (Sigma Aldrich, Mỹ) pha trong dung dịch nước muối sinh lí.

Dung dịch chống thấm Ornano imbidente (Ugo Basile, Italia) pha trong 1 mL với 250 mg NaCl trong 500 mL nước cất.

Diclofenac (viên nén Voltaren 50 mg, Novartis, Italia).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt trắng

Thí nghiệm khảo sát độc tính cấp của Cao Khai được tiến hành theo phương pháp của Raghuram et al. (2016) có hiệu chỉnh [2]. Cho chuột nhắt đối ít nhất 12 giờ trước khi tiến hành thí nghiệm. Chuột được chia ngẫu nhiên thành 2 lô, mỗi lô gồm 6 con chuột.

Lô 1: Chuột bình thường uống nước cất (đối chứng sinh lí).

Lô 2: Chuột bình thường uống bài thuốc gia truyền Cao Khai liều 5000 mg/kg trọng lượng chuột.

Chuột uống nước cất/cao thử với thể tích tối đa 50 mL/kg trọng lượng chuột theo "Hướng dẫn thử nghiệm phi lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu" của Bộ Y tế ban hành theo quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27 tháng 10 năm 2015 [3].

Theo dõi và ghi nhận cử động tổng quát, biểu hiện về hành vi, trạng thái lông, ăn uống, tỉ lệ tử vong của chuột trong vòng 14 ngày [3]. Sau 14 ngày, tất cả chuột thử nghiệm được gây mê bằng CO₂, lấy máu tim để xét nghiệm công thức máu và một số chỉ số sinh hóa.

Chỉ tiêu phân tích: Tỉ lệ chuột chết, trọng lượng chuột, sinh hóa như urê, creatinin, AST (SGOT), ALT (SGPT), hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu.

2.2.1 Khảo sát tác động kháng viêm cấp trên mô hình gây viêm bàn chân chuột bằng carrageenan.

Nguyên tắc: Gây phù chân chuột bằng carrageenan theo Winter và cộng sự (1962). Carrageenan là polysaccharid cấu tạo từ các polymer của β -(1,3)-D- galactose và β -(1,4)-3,6-hydroD-galactose. Do là hợp chất cao phân tử nên khi vào trong cơ thể, carrageenan trở thành kháng nguyên thông qua cơ chế miễn dịch kháng nguyên - kháng thể. Mức độ viêm tối đa ở trong thời gian 3-5 giờ. Mẫu có tác dụng

kháng viêm sẽ làm giảm mức độ phù chân chuột. Carrageenan gây viêm cấp theo 2 pha: pha 1 giải phóng histamin, serotonin; pha 2 giải phóng bradykinin, protease, prostaglandin, lysosom [4].

Thực hiện:

Chuột đực được chia làm 5 lô sao cho V₀ (đo bằng thiết bị Plethysmometer, Ugo Basile, Italia) khác biệt không có ý nghĩa thống kê (8 chuột/lô).

Lô 1 (sinh lí): uống nước cất

Lô 2 (chứng bệnh): uống nước cất

Lô 3 (chứng dương): uống diclofenac 5 mg/kg.

Lô 4 (CK400): Cao Khai liều 400 mg/kg.

Lô 5 (CK800): Cao Khai liều 800 mg/kg.

Chuột được nhịn đói 12 giờ và cho uống nước cất hoặc diclofenac hoặc cao thử với thể tích 10 mL/kg trọng lượng chuột. Sau khi uống nước cất, diclofenac và cao thử 1 giờ, chuột ở các lô từ 2 đến 5 được tiêm 0,025 mL dịch treo carrageenan 1% vào gan bàn chân phải sau để gây viêm bàn chân; chuột lô sinh lí được tiêm dung dịch NaCl 0,9%. Sau đó, tất cả chuột được cho vào lồng có giá đỡ để tránh nhiễm trùng chân. Đo thể tích bàn chân chuột lần lượt sau (1, 3, 5, 24, 48, 72, 96, 120, 144) giờ (Vt) sau khi gây viêm.

Mức độ phù bàn chân chuột X (%) được tính theo công thức:

$$X (\%) = (Vt - V_0) / V_0 \times 100$$

Trong đó V₀ và Vt: thể tích chân chuột tại thời điểm trước và t sau khi gây viêm (mL)

Sau khi đo thể tích bàn chân ở thời điểm (24, 48, 72, 96, 120 và 144) giờ, chuột được cho uống nước cất, diclofenac hoặc mẫu thử 01 lần/ngày.

Các lô Cao Khai và lô đối chứng được khảo sát về hiệu quả kháng viêm tương đối thông qua khả năng giảm độ phù bàn chân chuột I (%) được tính theo công thức:

$$I (\%) = (X_1 - X_2) / (X_1 - X_3) \times 100\%$$

Trong đó X₁: độ phù chân của lô chứng bệnh.

X₂: độ phù chân của lô cao khai hoặc độ phù chân chuột của lô đối chứng.

X₃: độ phù chân của lô sinh lí.

2.2.2 Xử lý kết quả và phân tích thống kê

Kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình \pm SEM (standard error of mean - sai số chuẩn của số trung bình). Sự khác biệt giữa các lô được phân tích bằng phép kiểm One-way ANOVA, paired sample T-test, Kruskal-Wallis và Mann-Whitney với phần mềm SPSS 22.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Kết quả độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt trắng

Để khẳng định cơ sở khoa học về độ an toàn của Cao Khai đối với chuột thử nghiệm, chế phẩm đã được khảo sát khả năng gây độc tính cấp. Sau 72 giờ uống 1 liều



duy nhất Cao Khai với nồng độ 5000 mg/kg trọng lượng chuột (thể tích 50 mL/kg trọng lượng), tất cả chuột đều khỏe mạnh, cử động bình thường, không có biểu hiện co giật, tiêu chảy hay xù lông, thờ gáp. Bên cạnh đó, chuột ăn uống và di chuyển bình thường trong suốt 14 ngày thử nghiệm. Sau 14 ngày thử nghiệm, tiến hành cân trọng lượng chuột, lấy máu tim để xác định thông số huyết học và các chỉ số sinh hóa.

Bảng 1 Tỷ lệ chuột sống/chết ở các lô thử nghiệm

Lô thử nghiệm	Số chuột thử nghiệm	Số chuột chết	Tỷ lệ chuột chết (%)
Lô 1 (đối chứng sinh lí)	6	0	0
Lô 2 (Cao Khai liều 5000 mg/kg)	6	0	0

Quan sát đại thể cho thấy sau 14 ngày thử nghiệm độc tính cấp, các cơ quan như tim, phổi, gan, thận, hệ thống tiêu hóa của chuột ở 2 lô thử nghiệm không có hiện tượng bất thường.

Tim: cơ tim bình thường.

Gan: toàn bộ gan màu đỏ tươi, bề mặt láng mịn, không có hiện tượng phù nề hay sung huyết, dịch mật vàng trong, túi mật bình thường.

Thận: tất cả chuột đều có thận bình thường, mật độ chắc, màu đỏ thẫm, mặt nhẵn, không thấy đám sung huyết và đám tổn thương.

Phổi: màu trắng hồng.

Dạ dày, Lách, Tụy: bình thường

Tác động của Cao Khai lên trọng lượng chuột thử nghiệm

Ảnh hưởng của Cao Khai đến trọng lượng chuột tại 2 thời điểm trước và sau thử nghiệm được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2 Ảnh hưởng của Cao Khai đến trọng lượng chuột

Lô thử nghiệm (n=6)	Kết quả cân nặng (g)		
	Trước thử nghiệm (t ₀)	Cuối thử nghiệm	Khối lượng gia tăng
Lô 1 (đối chứng sinh lí)	23,1 ± 0,2	27,7 ± 0,3	4,6 ± 0,3
Lô 2 (Cao Khai liều 5000 mg/kg)	22,2 ± 0,5	27,3 ± 0,5	5,1 ± 0,3

Kết quả cho thấy chuột ở 2 lô thử nghiệm đều tăng cân trung bình khoảng 4-5 g/14 ngày. Sự khác biệt về trọng lượng chuột giữa 2 lô không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05). Điều đó cho thấy Cao Khai không làm ảnh hưởng đến cân nặng của chuột thử nghiệm.

Tác động của Cao Khai lên chỉ số huyết học

Ảnh hưởng của Cao Khai lên các thông số huyết học ở chuột (n = 6) được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3 Ảnh hưởng của Cao Khai đến thông số huyết học của chuột bình thường

Thông số huyết học	Lô thử nghiệm		Chỉ số bình thường [5]
	Sinh lí	Cao khai 5000 mg/kg	
WBC (10 ⁹ /L)	4,6 ± 0,2	4,1 ± 0,4	3,0 – 14,2
RBC (10 ¹² /L)	7,3 ± 0,2	7,5 ± 0,1	5 – 9,5
HgB (g/dL)	14,2 ± 0,4	14,9 ± 0,3	10,9 – 16,3
HCT (%)	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,01	/
MCV (fL)	53,8 ± 0,7	52,9 ± 0,4	48,0 – 56,0
MCH (pg)	19,4 ± 0,2	21,3 ± 1,6	11,9 – 19,0
MCHC (g/dl)	36,2 ± 0,6	37,4 ± 0,4	25,9 – 35,1
PLT (10 ³ /μL)	413,8 ± 9,4	476,5 ± 41,2	/

Chú thích: WBC: Số lượng bạch cầu, RBC: Lượng hồng cầu, HgB: Huyết sắc tố, MCV: Thể tích trung bình hồng cầu, HCT: Thể tích khối hồng cầu, MCH: Huyết sắc tố trung bình hồng cầu, MCHC: Nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu, PLT: Số lượng tiểu cầu

So với lô sinh lí, các thông số về công thức máu gồm WBC (bạch cầu), RBC (hồng cầu), HgB (huyết sắc tố), MCV (thể tích trung bình hồng cầu), HCT (thể tích khối hồng cầu), MCH (huyết sắc tố trung bình hồng cầu), MCHC (nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu), PLT (tiểu cầu) của chuột uống Cao Khai 5000 mg/kg khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05), vẫn nằm trong khoảng các thông số sinh lí bình thường ở chuột. Như vậy, Cao Khai không ảnh

hưởng đến sự phát triển bình thường của chuột, không có dấu hiệu của nhiễm trùng cũng như ảnh hưởng đến chức năng tạo máu của chuột.

Tác động của Cao Khai lên chức năng gan, thận

Ảnh hưởng của Cao Khai đến chức năng gan và thận được đánh giá thông qua định lượng các chỉ số sinh hóa: hoạt động enzyme gan (ALT, AST), nồng độ ure và creatinine trong máu được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4 Ảnh hưởng của Cao Khai lên chức năng gan, thận của chuột thử nghiệm

Chỉ số sinh hóa	Lô thử nghiệm		Chỉ số bình thường [5]
	Sinh lí	Cao khai 5000 mg/kg	
ALT (U/L)	75,6 ± 3,6	176,7* ± 18,9	69 – 191
AST (U/L)	40,6 ± 0,9	131,7* ± 12,5	26-120
Ure (mmol/L)	6 ± 0,2	5,1 ± 0,5	/
Creatinine (μmol/L)	79,2 ± 0,5	78 ± 1,9	/

*: p < 0.05 so với lô sinh lí

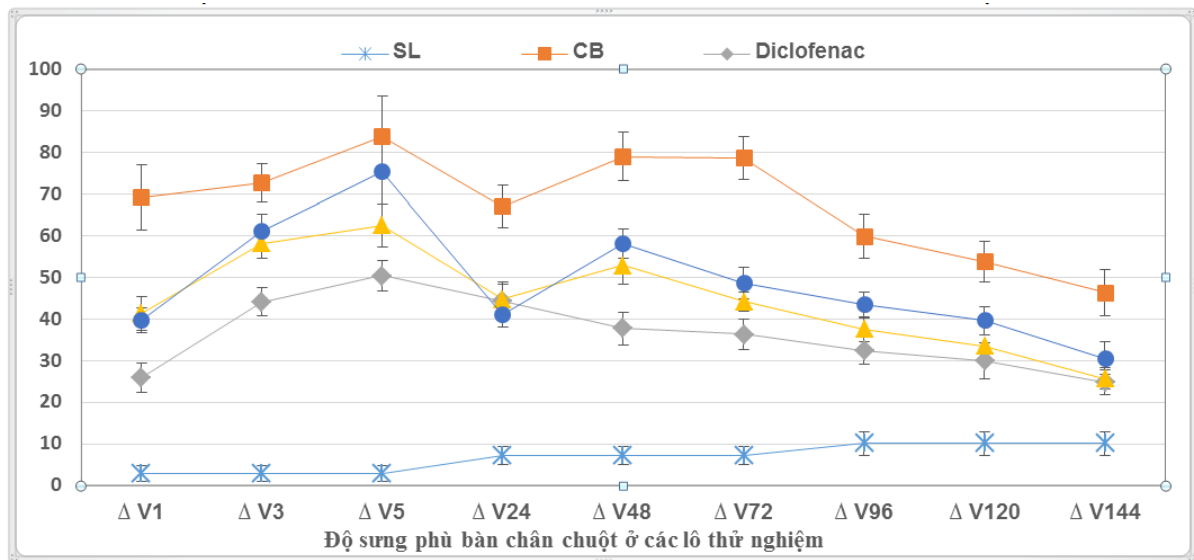
Tại thời điểm khảo sát, chỉ số ure và creatinine của lô uống Cao Khai liều 5000 mg/kg khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lí (p > 0,05); điều đó chứng tỏ thận không bị tổn thương (giảm chức năng thận, viêm thận mô kẽ, viêm đài bể thận...). Nhìn chung, Cao Khai không ảnh hưởng đến chức năng thận của chuột. Trên chức năng gan, chuột uống Cao Khai liều 5000 mg/kg có chỉ số ALT, AST tăng hơn so với lô sinh lí (p < 0,05), nhưng vẫn nằm trong ngưỡng giới hạn bình thường của chuột. Như vậy, việc uống Cao Khai liều 5000 mg/kg có ảnh hưởng tới chức năng gan của chuột.

Từ những kết quả trên cho thấy, bài thuốc gia truyền Cao Khai không gây ra độc tính cấp cho chuột thí nghiệm ở liều 5000 mg/kg trọng lượng chuột. Khi nồng độ cao chiết

5000 mg/kg không gây chết chuột thí nghiệm, điều này có nghĩa giá trị LD₅₀ ở khoảng cao hơn 5000 mg/kg trọng lượng chuột. Theo GSH, LD₅₀ của bài thuốc gia truyền Cao Khai được xếp vào phân loại 6 – chất gần như không có độc tính [6]. Theo Đỗ Trung Đàm (2014), liều thử tác động được lí thường vào khoảng 1/10 LD₅₀ (trong giới hạn từ 1/5 tới 1/20 của LD₅₀) [7]. Từ đó, đề tài sử dụng liều 400 mg/kg và 800 mg/kg để tiến hành các thử nghiệm được lí tiếp theo như thử nghiệm kháng viêm.

3.2 Khảo sát tác động kháng viêm của Cao Khai

Kết quả khảo sát sự thay đổi độ sưng phù bàn chân chuột của các lô thử nghiệm theo thời gian được trình bày ở Bảng 5 và Hình 3.

**Hình 3** Độ sưng phù chân chuột của các lô thử nghiệm theo thời gian**Bảng 5** Sự thay đổi độ phù chân chuột theo các lô thử nghiệm (%)

Lô thử nghiệm	Độ sưng phù chân chuột (MEAN ± SEM) (%)								
	Δ V1 giờ	Δ V3 giờ	Δ V5 giờ	Δ V24 giờ	Δ V48 giờ	Δ V72 giờ	Δ V96 giờ	Δ V120 giờ	Δ V144 giờ
Sinh lí	2,78 ± 1,82	2,78 ± 1,82	2,78 ± 1,82	7,12 ± 2,09	7,12 ± 2,09	7,12 ± 2,09	10,07 ± 2,77	10,07 ± 2,77	10,07 ± 2,77
Chứng bệnh	69,20*** ± 7,95	72,74*** ± 4,49	83,82*** ± 9,67	67,15*** ± 5,16	79,03*** ± 5,76	78,72*** ± 5,10	59,86*** ± 5,30	53,78*** ± 4,98	46,32*** ± 5,45
Diclofenac 5mg/kg	25,88***## ± 3,50	44,10***## ± 3,36	50,38***## ± 3,60	44,24***## ± 4,61	37,69***## ± 3,87	36,30***## ± 3,77	32,27***## ± 3,21	29,89***## ± 4,26	24,75***## ± 2,99

Cao khai 400 mg/kg	41,28 ^{***#} ± 4,17	58,11 ^{***#} ± 3,63	62,45 ^{***} ± 5,25	44,72 ^{***##} ± 3,64	52,84 ^{***##} ± 4,54	44,15 ^{***##} ± 2,38	37,43 ^{***##} ± 2,81	33,40 ^{***##} ± 0,93	25,71 ^{***##} ± 2,47
Cao khai 800 mg/kg	39,72 ^{***#} ± 3,06	60,97 ^{***} ± 4,20	75,42 ^{***} ± 7,72	41,11 ^{***##} ± 2,96	58,06 ^{***##} ± 3,53	48,61 ^{***##} ± 3,78	44,86 ^{***#} ± 4,02	39,58 ^{***#} ± 3,41	30,55 ^{##} ± 3,87

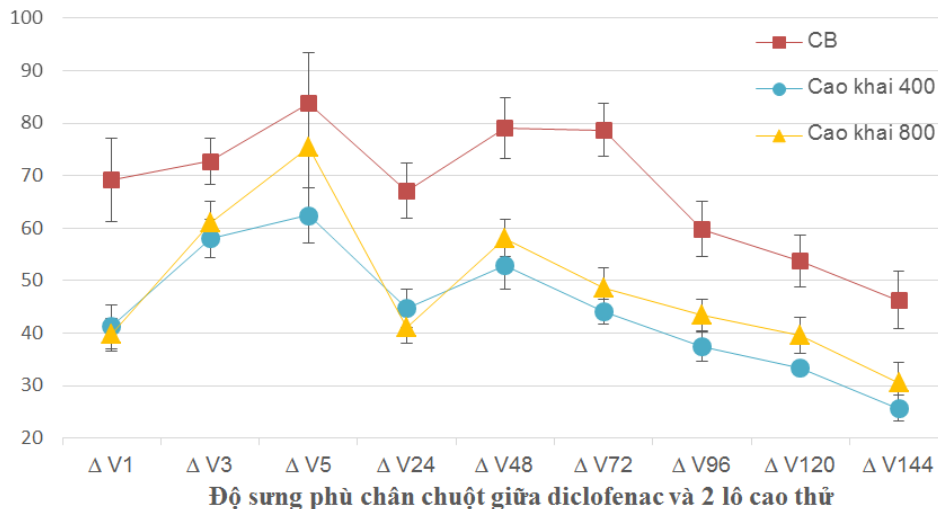
*, **, *** lần lượt p < 0,05; 0,01; 0,001 khác biệt có ý nghĩa thống kê so với sinh lí cùng thời điểm khảo sát.
#, ##, ### lần lượt p < 0,05; <0,01; <0,001 khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng bệnh cùng thời điểm khảo sát.

Kết quả cho thấy độ sưng phù chân chuột ở tất cả các thời điểm ở lô sinh lí cho với các lô khác khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05). Điều này chứng tỏ rằng thao tác tiêm không làm gây viêm bàn chân chuột.

Sau khi tiêm dung dịch carrageenan 1%, độ sưng phù chân chuột ở lô chứng bệnh ở tất cả các thời điểm từ 1 giờ tới 144 giờ khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) so với lô sinh lí và thời điểm gây sưng phù chân chuột nhất rơi vào khoảng thời điểm 3 giờ - 5 giờ. Kết quả chứng tỏ mô hình đã gây thành công tình trạng viêm bằng cách tiêm carrageenan 1%.

Lô đối chứng diclofenac làm giảm rõ rệt độ phù chân chuột, khác nhau có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh (p < 0,05). Điều này chứng tỏ mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenan 1% đáp ứng tốt với thuốc đối chứng diclofenac 5 mg/kg. Vì vậy, mô hình có thể sử dụng carrageenan 1% làm chất gây viêm và sử dụng diclofenac 5 mg/kg làm chất đối chứng để đánh giá tác động kháng viêm của cao thử.

So sánh mức độ phù chân chuột giữa lô chứng bệnh và 2 lô Cao Khai liều 400 và 800 mg/kg (Hình 4)



Hình 4 Độ sưng phù chân chuột theo thời gian ở lô chứng bệnh, Cao khai 400 và 800 mg/kg

Lô Cao Khai liều 400 mg/kg có tác dụng làm giảm độ sưng phù chân chuột so với lô chứng bệnh ở hầu hết các thời điểm khảo sát, trừ thời điểm 5 giờ (p < 0,05). Lô Cao Khai liều 800 mg/kg có tác dụng làm giảm độ sưng phù chân chuột so với lô chứng bệnh, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở hầu hết các thời điểm khảo sát, ngoại trừ thời điểm 3 giờ và 5 giờ sau khi gây viêm.

Tại thời điểm 3 giờ và 5 giờ sau tiêm, Cao Khai ở cả 2 liều tuy có làm giảm độ sưng phù chân chuột nhưng không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05), điều này có thể giải thích là do sự không đồng đều về độ sưng phù ở lô cũng như cao thử phát huy tác dụng chậm hơn dẫn tới sự không có ý nghĩa.

So sánh giữa 2 lô Cao Khai, lô Cao Khai liều 400 và liều 800 mg/kg có độ sưng phù chân chuột khác nhau không có

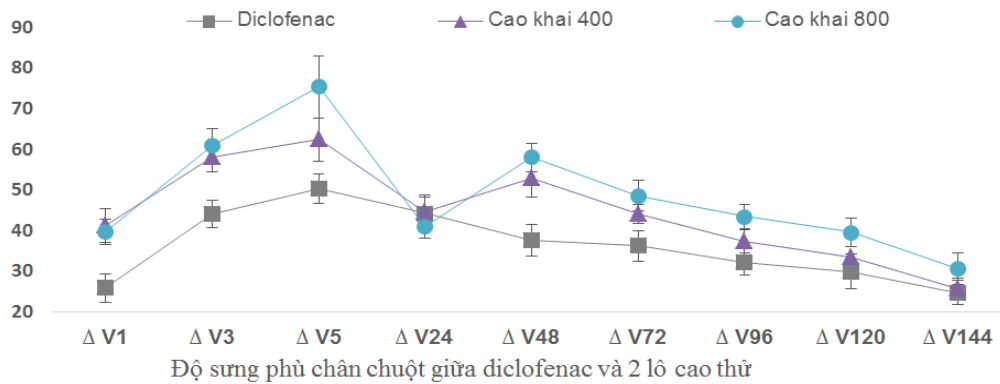
ý nghĩa thống kê ở tất cả các thời điểm khảo sát (p > 0,05). Điều này cho thấy, có thể sử dụng Cao Khai liều 400 mg/kg cho các thử nghiệm tác dụng dược lí khác như khảo sát tác động bán trường diễn để hạn chế liều cũng như hạn chế tác dụng phụ không mong muốn của Cao Khai.

So sánh mức độ phù chân chuột giữa lô diclofenac 5 mg/kg và 2 lô Cao Khai (Bảng 6, Hình 5).

Lô chuột uống cao thử liều 400 và 800 mg/kg có khả năng làm giảm độ phù chân chuột, nhưng mức độ giảm không bằng so với lô diclofenac ở tất cả các thời điểm khảo sát (Bảng 6). Như vậy, Cao Khai thể hiện được hoạt tính kháng viêm ở liều uống 400 và 800 mg/kg, khởi phát chậm hơn so với thuốc đối chứng diclofenac liều 5 mg/kg.

Bảng 6 Khả năng giảm độ phù chân chuột (1%) của lô Diclofenac 5 mg/kg và lô Cao Khai

Lô thử nghiệm	$\Delta V1$ giờ	$\Delta V3$ giờ	$\Delta V5$ giờ	$\Delta V24$ giờ	$\Delta V48$ giờ	$\Delta V72$ giờ	$\Delta V96$ giờ	$\Delta V120$ giờ	$\Delta V144$ giờ
Diclofenac 5 mg/kg	65,22	40,93	41,26	38,16	57,49	59,24	55,41	54,67	59,51
Cao Khai 400 mg/kg	42,03	20,91	26,36	37,37	36,43	48,27	45,06	46,63	56,86
Cao Khai 800 mg/kg	44,38	16,82	10,37	43,38	29,16	42,05	32,91	32,49	43,49

**Hình 5** Độ sưng phù chân chuột theo thời gian của lô Diclofenac, Cao Khai 400 và 800 mg/kg

3.3 Bàn luận

Mô hình *in vivo*, liều gây chết 50% (LD_{50}) số lượng chuột nhắt trắng Swiss albino của bài thuốc gia truyền Cao Khai được xác định lớn hơn 5000 mg/kg trọng lượng chuột. Theo phân loại độc tính cấp của GHS [6], những chất có giá trị độc tính cấp LD_{50} trong khoảng > 5000 mg/kg được coi là chất gần như không độc. Ngoài ra, cuối thử nghiệm, chuột uống Cao Khai không nhận thấy sự thay đổi đáng kể về trọng lượng chuột, chức năng tạo máu (về hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu), chức năng thận của chuột, ngoại trừ làm tăng hoạt tính enzyme gan ALT, AST nhưng vẫn nằm trong ngưỡng giới hạn bình thường của chuột. Do đó, kết quả nghiên cứu chứng minh rằng bài thuốc gia truyền Cao Khai không gây độc tính, có tính an toàn cao. Theo nghiên cứu, liều an toàn thử tác động dược lý khoảng 1/10 LD_{50} [7]. Từ đó, đề tài chọn 2 liều 400 mg/kg và 800 mg/kg để đánh giá tác động kháng viêm.

Mô hình gây viêm bàn chân chuột bằng carrageenan là mô hình thử tác dụng kháng viêm kinh điển, đơn giản, thuận tiện, thời gian tiến hành nhanh, tạo độ phù ổn định nên đề tài đã chọn mô hình này. Carrageenan gây phản ứng viêm tiến triển theo 2 pha (pha 1: đặc trưng bởi sự phóng thích histamin, serotonin và các kinin; pha 2: đặc trưng bởi sự phóng thích prostaglandin) phù hợp để nghiên cứu các chất/dược liệu có tác dụng ức chế riêng lẻ hoặc đồng thời các chất trung gian hóa học. Kết quả kháng viêm cho thấy bài thuốc gia truyền Cao Khai liều 400 và 800 mg/kg đều thể hiện tác dụng làm giảm độ sưng phù chân chuột so với lô chứng bệnh, có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) nhưng tác dụng giữa 2 liều của bài thuốc thì khác nhau không có ý nghĩa thống kê. So với diclofenac 5 mg/kg, bài thuốc Cao Khai ở 2 mức liều thử đều thể hiện hoạt tính kháng viêm khởi phát chậm hơn so với thuốc diclofenac, điều này có thể giải thích do cao thử có nguồn gốc tự nhiên, còn diclofenac là thuốc có nguồn gốc

hóa học. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Khemasili Kosala và cộng sự (2019) về hiệu quả kháng viêm của cao chiết nước rễ Dây Khai với EC_{50} 3,68 mg/mL nhỏ hơn EC_{50} của Indomethacin 11,13 mg/mL. Cao chiết nước rễ Dây Khai có tác dụng chống viêm mạnh hơn Indomethacin, có thể do chứa polyphenol (tannin) và saponin [8].

Theo nghiên cứu của K Kosala và cộng sự (2018) báo cáo rằng cao chiết methanol rễ *C.flavescens* (CFR) thể hiện hoạt tính kháng viêm ở *in vivo* và *in vitro*. *In vitro*, EC_{50} của chiết xuất methanol CFR là $1,905 \pm 0,119$ mg/mL, thấp hơn so với indomethacin $10,288 \pm 0,212$ mg/mL. *In vivo*, chiết xuất methanol CFR liều 600 và 1200 mg/kg có hoạt tính kháng viêm, nhưng ở liều 1200 mg/kg thể hiện hoạt tính kháng viêm sau 1 giờ tiêm carrageenan [9]. Những kết quả nghiên cứu trên điều chứng tỏ Cao chiết từ Dây Khai đều thể hiện hoạt tính kháng viêm.

4 Kết luận

Bài thuốc gia truyền Cao Khai không gây ra độc tính cấp cho chuột thí nghiệm ở nồng độ 5000 mg/kg trọng lượng chuột, được xếp vào phân loại 6 – chất gần như không có độc tính theo GSH (Globally Harmonised System for Classification of Chemicals). Hơn nữa, Cao Khai không gây ra sự khác biệt đáng kể trên trọng lượng chuột, chức năng tạo máu, chức năng thận, chức năng gan của chuột, thông số vẫn nằm trong ngưỡng giới hạn bình thường của chuột.

Ngoài ra, trên mô hình gây viêm bàn chân chuột bằng carrageenan 1%, bài thuốc gia truyền Cao Khai thể hiện tác dụng làm giảm độ phù chân chuột đáng kể ở cả hai liều 400 và 800 mg/kg; nhưng không bằng thuốc đối chứng diclofenac 5 mg/kg có thể giải thích do dược liệu khởi phát tác động chậm hơn.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã số đề tài: 2020.01.094/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Viện Dược Liệu (2003), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập I, NXB Khoa học và Kỹ thuật, pp. 645 - 646.
2. Kandimalla R. et al. (2016), "Antioxidant and Hepatoprotective Potentiality of *Randia dumetorum* Lam. Leaf and Bark via Inhibition of Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines", *Front Pharmacol.* 7, pp. 205.
3. Bộ Y tế (2015), *Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc Đông y, thuốc từ dược liệu*. Ban hành Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015, trang 13-17.
4. Morris C. J. (2003), "Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse", *Methods Mol Biol.* 225, pp. 115-121.
5. Mark A. et al. (2001), "The laboratory mouse", CRC Press Inc., USA, pp. 18-21.
6. United Nations (2005), *A Guide to The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS)*, United Nations.
7. Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, Nhà xuất bản Y học, trang 15-190.
8. Khemasili Kosala et al. (2019), "Anti-inflammatory activity study and secondary metabolites detection in *Coptosapelta flavescens* korth root's water extract", *Eurasian Journal of Biosciences.* 13 (2), pp. 2317-2320.
9. Kosala K. et al. (2018), "In vitro and In vivo Anti-inflammatory Activities of *Coptosapelta flavescens* Korth Root's Methanol Extract", *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 8, pp. 42-48.

Study on oral acute toxicity and anti-inflammatory effects of Cao Khai traditional medicine produced in Ninh Thuan province, Vietnam

Nguyen Thi Bach Tuyet¹, Hoang Thi Phuong Lien¹, Le Moc Nhen¹,

Mai Thi Ngoc Anh¹, Pham Tri Nhut², Bach Long Giang³

¹Pharmacology Department, Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

²NTT Institute of Hi-Technology, Nguyen Tat Thanh University. Viet Nam Academy of Science and Technology

³Science and Technology Department, Nguyen Tat Thanh University

*ntbtuyet@ntt.edu.vn

Abstract This study aims to evaluate oral acute toxicity and anti-inflammatory effect of Cao Khai traditional medicine produced in Ninh Thuan province. *In vivo* experiments used 6-to-8-week-old *Swiss albino* mice, weighing around 22 g. Oral acute toxicity of Cao Khai traditional medicine was investigated at 5000 mg/kg dose with a volume of 50 mL/kg by monitoring mortality and toxicity within 14 days. Changes in weight, hematologic indices, liver function and kidney function are recorded at the end of experiment. Anti-inflammatory effects at 400 and 800 mg/kg doses were determined in 1% carrageenan-induced paw edema mouse model, with 8 mice per group. Diclofenac at the dose of 5 mg/kg was used as a drug reference. This results showed that Cao Khai traditional medicine did not show any signs of oral acute toxicity in mice at 5000 mg/kg dose, and is classified in the category 6 - a nearly non-toxic substance according to GSH (Globally Harmonised System for Classification of Chemicals). Furthermore, the Cao Khai traditional medicine did not significantly influence the body weight, erythrocyte, leukocyte and platelet indices, liver function and kidney function compared with the records after the 14-day experiment ($p > 0.05$). Cao Khai traditional medicine exhibited anti-inflammatory effect at 400 and 800 mg/kg doses by significantly decreasing hind paw edema in mice ($p < 0.05$), but onset more slowly than drug reference diclofenac at the dose of 5 mg/kg.

Keywords Cao Khai traditional medicine, acute toxicity, anti-inflammatory effect.