

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA SẢN PHẨM HEMOSHIELD TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM

Nguyễn Thị Thanh Hương^{1,2}, Dương Thị Nhung^{1,3}

Nguyễn Tường Anh¹, Tô Thanh Thúy³ và Nguyễn Khánh Hòa^{1,✉}

¹Viện Nghiên cứu Y học Đinh Tiên Hoàng

²Trường Đại học Y Hà Nội

³Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội

Nghiên cứu này đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của sản phẩm hỗ trợ điều trị sốt xuất huyết HemoShield (HS) của công ty Dược Phẩm Vĩnh Phúc (VPO Pharco.) trên chuột nhắt trắng bằng phương pháp thử nghiệm độc tính rút gọn theo hướng dẫn của Bộ Y tế và OECD, độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng theo hướng dẫn của Bộ Y tế. Liều được dùng cho đánh giá độc tính cấp là 5,0 g/kg thể trọng; hai liều được dùng đánh giá độc tính bán trường diễn là 1120,56 mg/kg thể trọng/ngày và 3361,68 mg/kg thể trọng/ngày. Kết quả thử nghiệm độc tính cấp cho thấy liều 5,0 g/kg thể trọng không gây chết trên chuột nhắt. Kết quả đánh giá độc tính bán trường diễn không phát hiện tác dụng gây hại của sản phẩm HS ở liều cao tới 3361 mg/kg/ngày lên các chức năng tạo máu, miễn dịch, chức năng gan, thận của chuột cống. Về số lượng tiểu cầu, tuy không có sự khác biệt giữa lô dùng HS liều thấp (1120,56 mg/kg/ngày) và liều cao (3361,68 mg/kg/ngày) so với lô chứng ở các thời điểm nghiên cứu nhưng có sự giảm nhẹ số lượng tiểu cầu ở lô dùng HS liều cao sau 4 tuần uống so với trước khi uống. Các kết quả thu được cho thấy sản phẩm có thể tiếp tục được nghiên cứu để sử dụng trên người nhưng cần thận trọng khi sử dụng liều cao tương đương 3361,68 mg/kg/ngày trên chuột.

Từ khóa: Sốt xuất huyết, HemoShield (HS), độc tính cấp, độc tính bán trường diễn.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sốt xuất huyết là một bệnh thường xuất hiện thành dịch ở Việt Nam với số ca mắc ngày càng tăng. Số liệu thống kê cho thấy năm 2009 có 105.370 ca bệnh; năm 2017, số ca bệnh tăng đến 184.000 (tăng hơn 1,5 lần), và đến năm 2022, số ca bệnh là 325.604 (tăng gấp ba lần), trong đó có 112 người tử vong.^{1,2}

Cho tới nay, trên thế giới vẫn chưa có thuốc điều trị sốt xuất huyết. Các liệu pháp điều trị được áp dụng chủ yếu là điều trị triệu chứng và biến chứng bao gồm hạ sốt, phòng ngừa

tai biến, truyền tiểu cầu hoặc truyền máu cho các trường hợp nguy kịch. Tuy nhiên kho tàng y học cổ truyền lại có nhiều bài thuốc hỗ trợ cho điều trị sốt xuất huyết cũng như giúp bệnh nhân hồi phục nhanh sau khi mắc bệnh. Các bài thuốc này thường có các vị thuốc như Kim ngân hoa (*Lonicera japonica*, Thunb), Sinh địa (*Rehmannia glutinosa*, Gaertn.), rễ cỏ Tranh (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv), cỏ Nhọ nôi (*Eclipta prostrata* L.).³

HemoShield là một sản phẩm thực phẩm chức năng của công ty dược phẩm VPO Pharco sản xuất bằng cách phối hợp các vị thuốc có tác dụng hạ sốt, cầm máu, bổ huyết thường được sử dụng trong Y học cổ truyền, bao gồm rễ cỏ Tranh, Sinh địa, Thỏ phục linh, Rau má, cỏ Nhọ nôi và Kim ngân hoa. Các nghiên cứu riêng rẽ

Tác giả liên hệ: Nguyễn Khánh Hòa

Viện Nghiên cứu Y học Đinh Tiên Hoàng

Email: hnguyenkhanh@yahoo.com

Ngày nhận: 03/07/2024

Ngày được chấp nhận: 05/08/2024

về tác dụng cũng như độc tính của từng cây thuốc trong thành phần của HemoShield đều cho thấy không có vị thuốc gây ra độc tính cấp hoặc độc tính bán trường diễn trên động vật thực nghiệm.^{4,5}

Trên thế giới cũng đã có nhiều nghiên cứu về các tác dụng hạ sốt, giảm viêm, hỗ trợ miễn dịch, hỗ trợ điều trị sốt xuất huyết của các dược liệu kể trên. Ví dụ như tác dụng điều trị tiểu tiện ra máu của rễ cỏ tranh (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv), tác dụng bổ, kháng viêm, lợi tiểu, của sinh địa (*Rehmannia glutinosa*, Gaertn.), tác dụng hỗ trợ điều trị các nhiễm khuẩn, sốt do virus cũng như tác dụng điều hòa miễn dịch của Kim ngân hoa (*Lonicera japonica*, Thunb) cũng đã được nghiên cứu.⁶⁻⁸ Việc phối hợp các dược liệu này trong sản phẩm HemoShield của Công ty Đông Nam dược Vĩnh Phúc có thể được coi là một giải pháp rất cấp thiết để hỗ trợ điều trị sốt trong sốt xuất huyết và cần được nghiên cứu một cách bài bản. Do đó, nghiên cứu đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của sản phẩm HemoShield là rất cần thiết để xác định được tính an toàn của sản phẩm, tạo tiền đề cho các nghiên cứu về sản phẩm ở giai đoạn tiếp theo trên người.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Vật liệu nghiên cứu: Cao chiết HemoShield (từ đây gọi tắt là HS) được cung cấp bởi công ty Dược Phẩm Vĩnh Phúc (VPO Pharco) theo tiêu chuẩn GMP. Cao HS được bảo quản trong nhiệt độ 4°C, pha trong dung môi nước.

Đối tượng: Nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn của sản phẩm HS được thực hiện trên chuột nhắt trắng chủng Swiss và chuột cống trắng theo hướng dẫn của Bộ Y tế cho sản phẩm thuốc Y học cổ truyền phương pháp rút gọn và OECD 423, OECD 407.⁹⁻¹¹ Chuột được nuôi tại Phòng thí nghiệm nghiên cứu trên động vật thực nghiệm, Viện Nghiên cứu Y học Đính

Tiên Hoàng (DTHIM) theo các quy trình quy chuẩn về điều kiện phòng nuôi và thức ăn.

2. Phương pháp

Phương pháp đánh giá độc tính cấp

Độc tính cấp được đánh giá trên 28 chuột nhắt trắng chủng Swiss cân nặng từ 18 - 20g, chia ngẫu nhiên thành 3 lô ba ngày trước khi thí nghiệm: lô 1 - lô chứng không can thiệp, chuột được cho ăn uống bình thường và theo dõi hàng ngày trong 14 ngày thí nghiệm; lô 2 - lô chứng dung môi, chuột được cho uống nước là dung môi pha thuốc; lô 3 - chuột được cho uống HS pha trong nước liều 5 g/kg (tương đương liều gấp 5 lần liều dự định sử dụng trên người). Vào ngày đầu - ngày 1 của thí nghiệm, 3 chuột của mỗi lô 2 và 3 được cho uống 200µl nước hay 200µ HS với liều 5 g/kg và được theo dõi 24 giờ sau uống; nếu chuột khỏe mạnh bình thường thì ngày tiếp theo tiếp tục cho ba con của mỗi lô này uống nước hoặc HS cùng liều lượng và theo dõi 24 giờ sau uống; khi số chuột mới uống thuốc này bình thường thì ngày tiếp sau đó, cho bốn chuột còn lại ở mỗi lô uống nước hay HS đợt cuối. Chuột được tiếp tục nuôi và theo dõi hàng ngày cho tới ngày thứ 14 để đánh giá tỷ lệ sống và tình trạng sức khỏe tổng thể.^{9,10}

Phương pháp đánh giá độc tính bán trường diễn

Độc tính bán trường diễn được đánh giá trên chuột cống trắng theo hướng dẫn của Bộ Y tế.⁹ Bốn mươi (40) con chuột cống trắng khỏe mạnh, khối lượng 180 - 240g được chia thành 4 lô, mỗi lô 10 con: lô chứng 1 - lô đối chứng không can thiệp, chuột được nuôi dưỡng, cho ăn uống bình thường; lô chứng 2 - lô đối chứng dung môi, chuột được cho uống nước (dung môi dùng để pha chế phẩm HS); lô trị 1 - lô thí nghiệm uống HS liều thấp, cao HS pha trong nước với liều 1120,6 mg/kg/ngày (tương đương với liều dự định sử dụng trên người); lô trị 2 - lô thí nghiệm

uống HS liều cao, cao HS pha trong nước với liều 3361,7 mg/kg/ngày (gấp 3 lần liều tương đương với liều dự định sử dụng trên người). Chuột được cho uống nước/chế phẩm HS hàng ngày trong 28 ngày với thể tích cho uống chung là 0,5 ml/100g chuột. Trọng lượng của chuột được cân tại các thời điểm ngày đầu tiên, trước khi bắt đầu cho chuột uống HS và mỗi tuần một lần cho tới khi kết thúc thí nghiệm. Chuột được lấy máu ở các thời điểm ngày đầu tiên trước khi uống HS, 14 và 28 ngày sau khi uống HS để xét nghiệm đánh giá chức năng gan (thông qua các chỉ số ALT, AST, billirubin, albumin máu), thận (thông qua các chỉ số ure, creatinin), chức năng tạo máu (thông qua số lượng hồng cầu, hematocrit, hemoglobin, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, tỉ lệ bạch cầu lympho, số lượng tiểu cầu).

Phương pháp lấy máu chuột

Chuột của tất cả các lô được lấy máu ở tĩnh mạch đuôi (1 mL/con) một ngày trước khi cho uống HS và vào các ngày 14, 28 sau khi bắt đầu uống; máu được chống đông bằng K2 EDTA để xét nghiệm chỉ số hóa sinh.

Phương pháp xác định các chỉ số sinh hóa máu của chuột

Các chỉ số sinh hóa máu của chuột bao gồm số lượng hồng cầu, hematocrit, hemoglobin, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, tỉ lệ bạch cầu lympho, số lượng tiểu cầu, ure, creatinin, ALT, AST, billirubin, albumin được xác định bằng hệ thống máy ROCHE.

Phương pháp giết chuột và làm tiêu bản giải phẫu mô bệnh học

Vào ngày 28 sau khi uống HS - ngày kết thúc thí nghiệm bán trường diễn, sau khi được lấy máu, 30% chuột của mỗi lô (tương đương với 3 chuột/ lô) được giết bằng cách gây ngạt CO₂ sau đó giải phẫu để thu mẫu mô gan, thận cho xét nghiệm mô bệnh học.

Tiêu bản mô học được cắt lát, đúc nén nhuộm, quan sát và chụp ảnh sử dụng kính

hiển vi ở độ phóng đại 100x và 400x.

Phương pháp xử lý thống kê

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Graphpad Prism 8, sử dụng phân tích non - parametric, hậu kiểm Turkey để so sánh giá trị trung bình của các chỉ số giữa các lô chuột nghiên cứu. Khác biệt với $p < 0,05$ (*) được coi là có ý nghĩa thống kê; $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu nhằm đánh giá mức độ an toàn cho liều duy nhất trên chuột nhất và mức độ an toàn khi dùng nhiều ngày (28 ngày) trên chuột cống trắng, tuân thủ theo các qui định về nghiên cứu đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của quốc gia và quốc tế. Bên cạnh đó, nghiên cứu được tiến hành tại Labo nghiên cứu trên động vật thực nghiệm của Viện Nghiên cứu Y học Đinh Tiên Hoàng DTHIM – là nơi đã tiến hành đào tạo cũng như xây dựng các qui chuẩn về thực hành nghiên cứu trên động vật tuân thủ các quy tắc đạo đức.

Nghiên cứu đã được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học (IRB) phê duyệt, số IRB-A-2305, thông qua ngày 15 tháng 11 năm 2023.

III. KẾT QUẢ

1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp

Chuột nhất trắng được cho uống dung môi và HS, sau khi uống, chuột ở cả ba lô đều ăn uống, hoạt động và bài tiết bình thường, không có dấu hiệu ngộ độc và không có chuột **nào** chết trong thử nghiệm 14 ngày đánh giá độc tính cấp, bao gồm cả 10 chuột được uống thuốc liều 5 g/kg.

2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Tình trạng sức khỏe chung của chuột nghiên cứu

Đặc điểm chung về sức khỏe

- 37/40 con chuột khỏe mạnh.

- 3/40 con chuột chết (có biên bản kiểm điểm tử vong và kết quả mô xác trong phần kết luận là chết do uống thuốc bị sặc đã lưu trong hồ sơ nghiên cứu); trong đó có một con thuộc lô chứng 2 chết ở ngày thứ 9, hai con thuộc lô uống liều cao chết ở ngày thứ 10 và ngày ngày thứ 15 của nghiên cứu. Tất cả số chuột còn lại đều sống khỏe mạnh đến khi nghiên cứu kết thúc.

Đặc điểm ăn uống hàng ngày của chuột:
Không có sự khác biệt về đặc điểm ăn uống

hàng ngày giữa các lô chứng và các lô được uống HS.

Ảnh hưởng của HemoShield lên cân nặng chuột

Đối với đánh giá độc tính bán trường diễn, chuột được cân vào bốn thời điểm: ngày thứ nhất (ngày 1), trước khi uống HS và hàng tuần cho đến bốn tuần sau khi uống. Khối lượng trung bình của mỗi lô chuột ở các thời điểm này được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của HemoShield lên cân nặng chuột

Thời gian	Lô chứng 1		Lô chứng 2		Lô trị 1		Lô trị 2		p
	Trọng lượng (g)	% thay đổi trọng lượng	Trọng lượng (g)	% thay đổi trọng lượng	Trọng lượng (g)	% thay đổi trọng lượng	Trọng lượng (g)	% thay đổi trọng lượng	
Trước uống HS	228,30 ± 35,57		237,00 ± 37,75		249,00 ± 39,16		234,20 ± 19,67		> 0,05
Sau 1 tuần uống HS	225,00 ± 36,93	↓ 1,45	242,00 ± 40,11	↑ 2,11	245,40 ± 34,12	↓ 1,45	248,40 ± 30,04	↑ 6,06	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05		> 0,05		> 0,05		> 0,05		
Sau 2 tuần uống HS	241,30 ± 44,76	↑ 7,24	246,20 ± 42,86	↑ 4,2	243,90 ± 37,96	↓ 0,6	236,89 ± 23,96	↓ 4,67	> 0,05
p (trước - sau)	*		> 0,05		> 0,05		> 0,05		
Sau 3 tuần uống HS	243,60 ± 48,32	↑ 0,95	252,11 ± 37,42	↑ 2,40	250,90 ± 42,44	↑ 2,87	242,88 ± 30,82	↑ 2,53	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05		*		> 0,05		> 0,05		
Sau 4 tuần uống HS	244,00 ± 47,50	↑ 0,16	256,11 ± 39,30	↑ 1,59	252,60 ± 38,88	↑ 0,68	240,00 ± 26,24	↓ 0,12	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05		*		**		> 0,05		

Như vậy, sau bốn tuần nghiên cứu cân nặng của chuột ở cả hai lô được uống thuốc và các lô đối chứng đều có xu hướng tăng so với trước

khi nghiên cứu. Tuy nhiên khi so sánh cân nặng giữa các lô ở mỗi thời điểm nghiên cứu lại không có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của HemoShield đến hồng cầu trong máu ngoại vi**Bảng 2. Ảnh hưởng của HemoShield đến số lượng hồng cầu trong máu ngoại vi**

Thời gian	Số lượng hồng cầu (T/l)				p
	Lô chứng 1	Lô chứng 2	Lô trị 1	Lô trị 2	
Trước uống HS	8,03 ± 0,50	7,31 ± 0,64	8,05 ± 0,64	7,87 ± 0,59	> 0,05
Sau 2 tuần uống HS	8,13 ± 0,45	8,28 ± 0,48	8,00 ± 0,66	8,13 ± 0,44	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	*	> 0,05	> 0,05	
Sau 4 tuần uống HS	7,48 ± 1,36	7,97 ± 0,76	8,10 ± 0,39	8,31 ± 0,33	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Bảng 2 cho thấy số lượng hồng cầu của chuột ở các lô được uống thuốc cũng tương tự như ở các lô chứng (p > 0,05) ở tất cả các thời điểm nghiên cứu và không thay đổi có ý nghĩa thống kê trong suốt 4 tuần nghiên cứu (p > 0,05).

Bảng 3. Ảnh hưởng của HemoShield đến nồng độ huyết sắc tố, thể tích trung bình hồng cầu, hematocrit trong máu ngoại vi

Chỉ số	Lô	Trước uống HS	Sau 2 tuần uống HS	p (trước - sau)	Sau 4 tuần uống HS	p (trước - sau)
Nồng độ huyết sắc tố (g/L)	Lô chứng 1	143,10 ± 10,10	150,68 ± 7,90	*	145,70 ± 9,45	> 0,05
	Lô chứng 2	134,40 ± 9,93	152,60 ± 6,22	***	143,44 ± 9,37	*
	Lô trị 1	144,80 ± 4,98	138,70 ± 19,22	> 0,05	149,40 ± 7,11	> 0,05
	Lô trị 2	142,40 ± 8,64	151,44 ± 8,10	**	155,50 ± 6,95	*
	p	> 0,05	> 0,05	* (lô chứng 2 so với lô trị 2)		
Thể tích trung bình hồng cầu (fl)	Lô chứng 1	54,77 ± 1,61	53,17 ± 2,45	*	54,28 ± 3,01	> 0,05
	Lô chứng 2	55,04 ± 3,07	51,54 ± 2,05	> 0,05	54,06 ± 3,43	> 0,05
	Lô trị 1	54,44 ± 2,55	54,90 ± 3,89	> 0,05	54,07 ± 2,68	> 0,05
	Lô trị 2	55,09 ± 3,31	53,34 ± 3,84	> 0,05	54,46 ± 1,31	> 0,05
	p	> 0,05	> 0,05		> 0,05	

Chỉ số	Lô	Trước uống HS	Sau 2 tuần uống HS	p (trước - sau)	Sau 4 tuần uống HS	p (trước - sau)
Hematocrit (%)	Lô chứng 1	44,00 ± 2,40	43,10 ± 1,85	> 0,05	40,40 ± 6,30	> 0,05
	Lô chứng 2	40,10 ± 3,04	42,80 ± 1,48	*	43,00 ± 2,18	> 0,05
	Lô trị 1	43,90 ± 3,07	43,70 ± 2,45	> 0,05	43,80 ± 2,10	> 0,05
	Lô trị 2	43,40 ± 3,06	43,33 ± 2,45	> 0,05	45,38 ± 1,85	> 0,05
p	* (lô chứng 1 với lô chứng 2)		> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Sau hai tuần nghiên cứu, nồng độ huyết sắc tố của chuột tăng lên (Bảng 3), có thể là do trong xét nghiệm trước khi thử nghiệm chúng tôi đã bổ sung sắt vào trong khẩu phần thức ăn của chuột. Do đó sau 2 tuần nồng độ huyết sắc tố đã tăng có ý nghĩa thống kê so với trước thử nghiệm ($p < 0,05$). Nồng độ huyết sắc tố này cũng duy trì cho tới cuối đợt thí nghiệm trên các lô chuột.

Thể tích trung bình hồng cầu của chuột ở lô được uống thuốc tương tự như ở như ở lô

chứng ($p > 0,05$) và không thay đổi trong suốt 4 tuần thử nghiệm ($p > 0,05$) (Bảng 3).

Ở thời điểm bắt đầu nghiên cứu, hematocrit ở lô chứng 2 thấp hơn so với các lô khác ($p < 0,05$), nhưng sau đó đã tăng lên sau hai tuần nghiên cứu và cao tương tự như ở các lô khác sau bốn tuần ($p > 0,05$). Các lô được uống thuốc đều có hàm lượng hematocrit tương đương với lô chứng ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của HemoShield đến số lượng bạch cầu và công thức bạch cầu

Bảng 4. Ảnh hưởng của HemoShield đến số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi và % bạch cầu lympho

Chỉ số	Lô	Trước uống HS	Sau 2 tuần uống HS	p (trước - sau)	Sau 4 tuần uống HS	p (trước - sau)
Số lượng bạch cầu (G/l)	Lô chứng 1	11,78 ± 1,65	13,31 ± 5,52	> 0,05	11,85 ± 5,78	> 0,05
	Lô chứng 2	10,08 ± 3,44	11,40 ± 3,90	> 0,05	10,26 ± 4,48	> 0,05
	Lô trị 1	13,64 ± 3,31	12,40 ± 3,15	> 0,05	13,19 ± 4,76	> 0,05
	Lô trị 2	8,74 ± 3,39	11,35 ± 2,77	> 0,05	9,50 ± 1,68	> 0,05
p	* (lô trị 1 so với lô trị 2)		> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Chỉ số	Lô	Trước uống HS	Sau 2 tuần uống HS	p (trước - sau)	Sau 4 tuần uống HS	p (trước - sau)
% bạch cầu lympho	Lô chứng 1	76,97 ± 6,10	80,43 ± 5,83	> 0,05	73,90 ± 8,93	> 0,05
	Lô chứng 2	73,36 ± 12,95	76,49 ± 9,66	> 0,05	68,05 ± 10,97	> 0,05
	Lô trị 1	78,30 ± 6,63	81,03 ± 7,78	> 0,05	69,38 ± 12,52	> 0,05
	Lô trị 2	78,60 ± 4,66	78,33 ± 10,17	> 0,05	72,64 ± 6,18	> 0,05
	p	> 0,05	> 0,05		> 0,05	

Số liệu ở Bảng 4 cho thấy ở thời điểm bắt đầu nghiên cứu, số lượng bạch cầu ở lô trị 2 thấp hơn so với các lô trị 1 ($p < 0,05$), nhưng sau đó đã tăng lên sau 2 tuần nghiên cứu. Ở các thời điểm sau 2 tuần và sau 4 tuần, các lô được uống HS đều có số lượng bạch cầu tương đương với lô chứng ($p > 0,05$).

Tỉ lệ bạch cầu lympho trong máu ngoại vi ở các lô được uống thuốc tương đương như ở các lô chứng ở tất cả các thời điểm nghiên cứu ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của HemoShield đến số lượng tiểu cầu trong máu ngoại vi (chức năng đông cầm máu)

Bảng 5. Ảnh hưởng của HemoShield đến số lượng tiểu cầu trong máu ngoại vi

Thời gian	Số lượng tiểu cầu (G/l)				p
	Lô chứng 1	Lô chứng 2	Lô trị 1	Lô trị 2	
Trước uống HS	740,50 ± 252,99	664,30 ± 221,58	630,70 ± 266,49	747,10 ± 348,26	> 0,05
Sau 2 tuần uống HS	657,50 ± 158,33	478,00 ± 329,33	542,10 ± 260,24	460,22 ± 235,11	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 4 tuần uống HS	649,00 ± 249,71	667,44 ± 304,93	582,40 ± 289,02	405,13 ± 174,24	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	*	

Số lượng tiểu cầu trong máu ngoại vi ở lô được uống thuốc liều cao (lô trị 2) giảm nhẹ có ý nghĩa thống kê sau bốn tuần uống HS ($p < 0,05$) nhưng vẫn trong giới hạn bình thường.

3. Ảnh hưởng của HemoShield đến chức năng gan thận

Chức năng gan của chuột thí nghiệm được

đánh giá qua các chỉ số về hàm lượng albumin, hàm lượng bilirubin toàn phần, hàm lượng các enzyme AST-GOT, ALT-GPT được trình bày ở Bảng 6.

Số liệu ở Bảng 6 cho thấy, albumin của các lô chuột được uống thuốc có hàm lượng tương tự như các lô chứng ở tất cả các thời điểm nghiên cứu ($p > 0,05$). Billirubin toàn phần của

Bảng 6. Ảnh hưởng của HemoShield đến chức năng gan

Chỉ số	Lô	Trước uống HS	Sau 2 tuần uống HS	p (trước - sau)	Sau 4 tuần uống HS	p (trước - sau)
Albumin (g/dL)	Lô chứng 1	40,29 ± 3,95	40,60 ± 3,63	> 0,05	42,60 ± 3,86	> 0,05
	Lô chứng 2	40,00 ± 5,01	40,40 ± 7,71	> 0,05	42,78 ± 7,07	> 0,05
	Lô trị 1	42,00 ± 4,08	41,61 ± 3,06	> 0,05	39,10 ± 4,38	> 0,05
	Lô trị 2	43,40 ± 5,89	42,67 ± 6,86	> 0,05	44,00 ± 3,07	> 0,05
	p	> 0,05	> 0,05		> 0,05	
Bilirubin toàn phần (mol/L)	Lô chứng 1	1,271 ± 0,58	1,03 ± 0,28	> 0,05	1,30 ± 0,33	> 0,05
	Lô chứng 2	1,11 ± 0,28	1,27 ± 0,71	> 0,05	1,07 ± 0,26	> 0,05
	Lô trị 1	1,17 ± 0,41	1,20 ± 0,29	> 0,05	1,10 ± 0,47	> 0,05
	Lô trị 2	1,10 ± 0,38	1,63 ± 0,37	*	1,23 ± 0,21	> 0,05
	p	** (lô chứng 1 với lô trị 2)	> 0,05		> 0,05	
Hàm lượng AST-GOT	Lô chứng 1	92,04 ± 15,08	76,82 ± 9,68	> 0,05	79,76 ± 14,31	> 0,05
	Lô chứng 2	78,68 ± 19,98	84,71 ± 16,82	> 0,05	74,98 ± 9,61	> 0,05
	Lô trị 1	84,96 ± 12,40	79,97 ± 10,29	**	79,86 ± 10,55	> 0,05
	Lô trị 2	74,60 ± 7,83	97,06 ± 15,20	> 0,05	78,29 ± 8,84	> 0,05
	p	* (lô chứng 1 so với lô trị 2)	* (lô chứng 1 so với lô trị 2)		> 0,05	
Hàm lượng ALT-GPT	Lô chứng 1	33,34 ± 7,66	27,06 ± 6,96	*	23,54 ± 5,39	**
	Lô chứng 2	28,93 ± 6,60	22,32 ± 8,04	> 0,05	24,18 ± 5,74	> 0,05
	Lô trị 1	27,22 ± 4,54	33,25 ± 7,41	> 0,05	32,64 ± 4,73	> 0,05
	Lô trị 2	30,35 ± 10,17	36,18 ± 13,52	> 0,05	33,86 ± 12,00	> 0,05
	p	> 0,05	* (lô chứng 2 so với lô trị 1)		** (lô chứng 1 so với lô trị 2) * (lô chứng 2 so với lô trị 1)	

lô chuột dùng thuốc liều cao tăng nhẹ so với trước khi dùng HS ($p < 0,05$) và so với các lô chuột khác ($p < 0,05$) ở thời điểm sau hai tuần dùng HS nhưng trở về bình thường sau 4 tuần

dùng HS.

Nồng độ AST trong máu chuột ở lô dùng thuốc liều cao (lô trị 2) tăng hơn so với nhóm chứng sau 2 tuần uống HS ($p < 0,05$) nhưng

vẫn trong giới hạn sinh lý bình thường và trở về tương đương như lô chứng sau 4 tuần uống HS ($p > 0,05$).

Hàm lượng ALT ở lô uống và không uống HS là tương tự như nhau trước khi nghiên cứu ($p > 0,05$). Sau hai tuần và sau bốn tuần uống

HS, lô trị 2 có hàm lượng AST tăng nhẹ so với lô chứng ($p < 0,05$) nhưng vẫn trong giới hạn bình thường.

Chức năng thận của chuột được đánh giá dựa trên các chỉ số về nồng độ creatinine và ure trong máu, được trình bày trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7. Ảnh hưởng của HemoShield đến chỉ số creatinine và ure trong máu

Chỉ số	Lô	Trước uống HS	Sau 2 tuần uống HS	p (trước - sau)	Sau 4 tuần uống HS	p (trước - sau)
Creatinin (mg/dL)	Lô chứng 1	56,20 ± 11,18	54,70 ± 8,00	> 0,05	56,00 ± 5,27	> 0,05
	Lô chứng 2	50,50 ± 8,30	49,70 ± 7,63	> 0,05	57,00 ± 12,66	> 0,05
	Lô trị 1	51,80 ± 12,82	50,20 ± 10,23	> 0,05	42,50 ± 7,25	*
	Lô trị 2	53,00 ± 9,96	52,78 ± 8,15	> 0,05	42,38 ± 8,94	*
	p	> 0,05	> 0,05		** (lô chứng 1 so với lô trị 2) * (lô chứng 1 so với lô trị 2) * (lô chứng 2 so với lô trị 1)	
	Hàm lượng ure (mmol/L)	Lô chứng 1	4,60 ± 1,35	4,78 ± 0,64	> 0,05	5,21 ± 0,83
	Lô chứng 2	3,78 ± 0,70	4,55 ± 0,86	> 0,05	5,96 ± 1,63	**
	Lô trị 1	3,82 ± 0,73	4,07 ± 0,85	> 0,05	4,63 ± 0,91	> 0,05
	Lô trị 2	4,38 ± 1,41	3,47 ± 1,13	> 0,05	4,99 ± 2,14	> 0,05
	p	> 0,05	* (lô chứng 1 so với lô trị 2)		> 0,05	

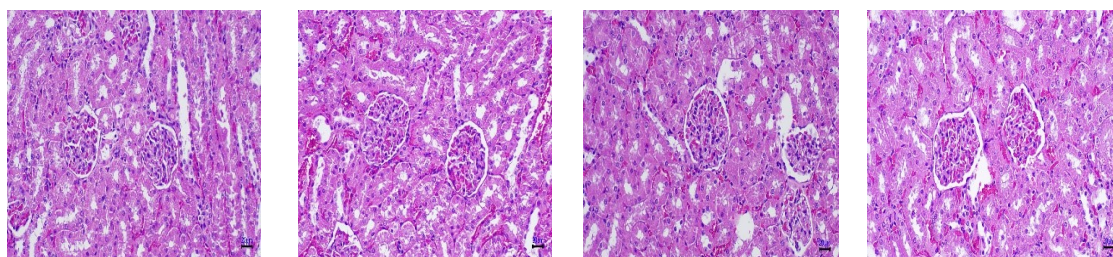
Như vậy, creatinin giảm nhẹ ở cả lô trị 1 và lô trị 2 sau bốn tuần uống HS so với các lô chứng ($p < 0,05$).

Nồng độ ure trong máu chuột ở lô được uống HS và lô chứng đều tương đương nhau ở tất cả các thời điểm nghiên cứu ($p > 0,05$) trừ lô trị 2 có nồng độ ure máu thấp hơn ở thời điểm sau hai tuần ($p < 0,05$), nhưng sau đó nồng độ

ure ở lô trị 2 lại trở về tương đương như các lô khác ở thời điểm sau bốn tuần uống thuốc ($p > 0,05$).

Nồng độ ure ở các lô chuột sau 4 tuần nghiên cứu đều không khác biệt so với trước khi nghiên cứu ($p > 0,05$) trừ lô chứng 2 có tăng nhẹ ($p < 0,05$), nhưng vẫn trong giới hạn bình thường ($p > 0,05$).

4. Kết quả giải phẫu bệnh mô gan, thận của chuột



Lô chứng 1

Lô chứng 2

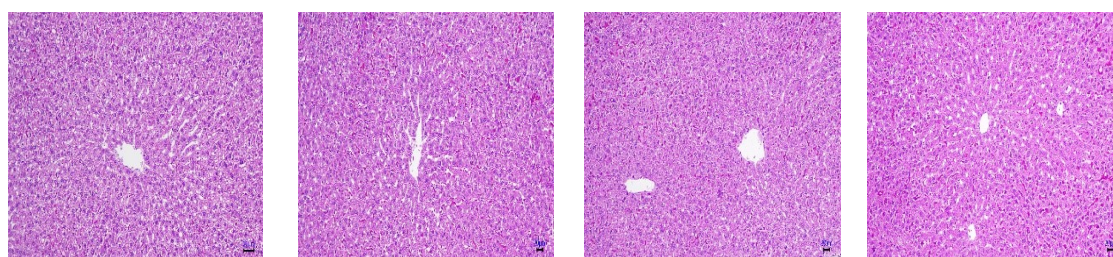
Lô trị 1

Lô trị 2

Hình 1. Hình ảnh tổ chức thận (quan sát dưới kính hiển vi thường độ phóng đại 400x)

Ổng thận có cấu trúc rõ ràng, tiểu cầu thận không bị tổn thương, khoang Bowman phân cách

với tiểu cầu thận, không thấy hiện tượng thoái hóa ống thận hoặc tiểu cầu thận ở tất cả các lô.



Lô chứng 1

Lô chứng 2

Lô trị 1

Lô trị 2

Hình 2. Hình ảnh mô gan (quan sát dưới kính hiển vi thường độ phóng đại 100x)

Gan có cấu trúc rõ từng tiểu thùy, khoảng cửa rộng, rõ nét, tế bào gan xếp hình cánh quạt, tỏa ra xung quanh. Một số tế bào gan có hiện tượng thoái hóa hạt nhẹ nhưng không có khác biệt gì giữa lô uống thuốc so với lô chứng.

ngân hoa không gây chết hoặc thay đổi về thể trạng, hành vi cũng như không gây bất thường trong các cơ quan nội tạng của chuột sau khi cho uống một liều duy nhất là 5000 mg/kg thể trọng.

IV. BÀN LUẬN

1. Độc tính cấp của sản phẩm HemoShield

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy HemoShield (HS) không gây độc tính cấp trên chuột nhất khi dùng với liều 5000mg của hỗn hợp cao chiết. Thành phần bài thuốc HS bao gồm rễ cỏ Tranh, Sinh địa, Thổ phục linh, Rau má, cỏ Nhọ nồi và Kim ngân hoa.

Kim ngân hoa là vị thuốc thường được dùng trong Y học cổ truyền của các nước châu Á như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản và Việt Nam. Nghiên cứu năm 2006 của Thanabhorn và cộng sự⁴ cho thấy cao chiết ethanol của Kim

ngân hoa không gây chết hoặc thay đổi về thể trạng, hành vi cũng như không gây bất thường trong các cơ quan nội tạng của chuột sau khi cho uống một liều duy nhất là 5000 mg/kg thể trọng.

Cao chiết nước rễ Cỏ tranh sấy khô đã được Chunlaratthanaphorn khảo sát độc tính cấp trên chuột cống và cũng không phát hiện dấu hiệu gây hại hoặc gây chết của sản phẩm khi dùng liều duy nhất 5000 mg/kg cho chuột nhất.⁵

Các nghiên cứu khác về các vị thuốc như sinh địa, thổ phục linh, rau má đều không tìm thấy độc tính cấp ở liều nhỏ hơn 5 g/kg trên động vật.³

Do vậy, liều độc tính cấp 5000 mg/kg của hỗn hợp cao chiết được thử nghiệm trong nghiên cứu của chúng tôi là phù hợp với các nghiên cứu quốc tế trong lĩnh vực này. Hơn nữa, vì HemoShield là cao chiết hỗn hợp của 6

vị thuốc khác nhau nên thành phần riêng rẽ của mỗi vị thuốc trong hỗn hợp sẽ nhỏ hơn 5000 mg/kg, do vậy việc không tìm thấy độc tính cấp của sản phẩm Hemoshield ở nghiên cứu này là phù hợp.

2. Độc tính bán trường diễn của HemoShield trên gan và thận

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy HS không gây độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng được cho uống hàng ngày trong 28 ngày với hai liều 1120,56 và 3361,68 mg/kg thể trọng/ngày đối với chức năng gan, thận.

Gan và thận là hai cơ quan trực tiếp tác động lên quá trình chuyển hóa và thải trừ của thuốc trong cơ thể. Vì vậy, khi đánh giá độc tính của thuốc hay hoạt chất, chức năng gan, thận cần được đánh giá thông qua các chỉ số xét nghiệm máu như nồng độ creatinin, ure, albumin, bilirubin cũng như hoạt độ các enzyme ALT, AST. Kết quả của nghiên cứu cho thấy HS không gây ảnh hưởng đến chức năng của thận thông qua các chỉ số nồng độ ure và creatinin trong máu. Việc chuột ở lô dùng HS liều cao có chỉ số creatinin giảm mặc dù chỉ số albumin không thay đổi ở tuần thứ tư cho thấy thuốc có thể có tác dụng tăng thanh thải creatinin của thận. Các chỉ số chức năng gan bao gồm ALT, AST và bilirubin của chuột sau bốn tuần dùng HS cũng không có khác biệt so với nhóm chứng mặc dù có tăng nhẹ ở tuần thứ hai sau dùng HS, cho thấy thuốc hầu như không có tác dụng có hại lên gan. Kết quả này phù hợp với hình ảnh mô bệnh học như hình ảnh đại thể của gan và thận (Hình 1, 2: không có sự khác biệt về cấu trúc giải phẫu của thận và gan giữa các lô dùng HS và các lô chứng).

Kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của của Thanabhorn và cộng sự cho thấy cao chiết ethanol của Kim ngân hoa không gây các bất thường trên gan thận của

chuột sau khi cho uống liên tục trong 14 ngày với liều 1000 mg/kg thể trọng/ngày.⁴

Cao chiết nước rễ Cỏ tranh sấy khô đã được Chunlaratthanaphorn khảo sát trên chuột cống trắng uống tới liều 1200 mg/kg/ngày trong 90 ngày cũng không thấy có tác dụng gây hại trên gan và thận.⁵

Các nghiên cứu khác về các vị thuốc như sinh địa, thổ phục linh, rau má đều không tìm thấy độc tính trên gan và thận trong các nghiên cứu độc tính bán trường diễn trên động vật.³

HemoShield là cao chiết hỗn hợp của 6 vị thuốc khác nhau nên thành phần riêng rẽ của mỗi vị thuốc trong hỗn hợp sẽ nhỏ hơn 1000 mg/kg thể trọng. Do vậy việc không tìm thấy độc tính bán trường diễn trên gan thận của sản phẩm Hemoshield ở nghiên cứu này là phù hợp khi cho chuột cống trắng uống HS hàng ngày trong 28 ngày liên tục với hai liều 1120,56 và 3361,68 mg/kg thể trọng/ngày.

3. Độc tính bán trường diễn của HS lên các chỉ số máu ngoại vi

Các chỉ về số lượng hồng cầu, bạch cầu cũng như hemoglobin, hematocrit của chuột được uống HS cả ở liều thấp cũng như liều cao đều không có sự khác biệt so với nhóm chứng. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu đã được công bố khi nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao chiết kim ngân hoa, cao chiết sấy khô rễ cỏ tranh và các cao chiết của sinh địa, thổ phục linh, rau má.³⁻⁵

Tuần thứ tư sau dùng thuốc, lô chuột cống trắng được uống hàng ngày liều cao (3361,68 mg/kg/ngày) có số lượng tiểu cầu giảm so với trước khi dùng thuốc có ý nghĩa thống kê. Số lượng tiểu cầu trong máu của chuột dùng HS liều cao này là thấp hơn giới hạn sinh lý bình thường của chuột Wistar nhưng chưa gây xuất huyết tại các mô cơ quan bao gồm cả gan, thận.¹² Kết quả này cũng cho thấy cần thận trọng khi dùng sản phẩm HS ở liều cao gấp ba

lần liều chỉ định trong thời gian kéo dài. Kết quả về sự thay đổi số lượng tiểu cầu này chưa được ghi nhận ở các nghiên cứu khi nghiên cứu độc tính bán trường diễn của các dịch chiết riêng rẽ của từng cây kim ngân hoa, rễ cỏ tranh, sinh địa, thổ phục linh hay rau má.³⁻⁵ Do vậy, có thể khi kết hợp các cây thuốc này với nhau đã tạo nên các tương tác thuốc và gây nên tác dụng giảm tiểu cầu khi sử dụng liều cao liên tục dài ngày; chúng ta sẽ cần có những nghiên cứu sâu hơn để làm sáng tỏ điều này.

Tuy nhiên, chỉ số tiểu cầu của nhóm chuột cống trắng được cho uống liên tục hàng ngày với liều 1120,56 mg/kg thể trọng/ngày không thay đổi sau 2 tuần và 4 tuần nghiên cứu và tương tự như nhóm chứng. Điều đó có nghĩa là dùng HS ở liều thấp (tương đương với liều dùng trên người) tương đối an toàn.

V. KẾT LUẬN

Sản phẩm HemosShield (HS) không thể hiện độc tính cấp tính, không gây chết hay ảnh hưởng đến sức khỏe của chuột nhắt trắng khi cho uống một lần với liều lên tới 5 g/kg thể trọng và theo dõi trong 14 ngày. Sản phẩm cũng không thể hiện độc tính bán trường diễn khi chuột cống trắng được cho uống hàng ngày trong 28 ngày với hai liều 1120,56 và 3361,68 mg/kg thể trọng/ngày đối với chức năng gan, thận, các chỉ số máu bao gồm số lượng hồng cầu, hematocrit, hemoglobin, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, tỉ lệ bạch cầu lympho. Tuy nhiên, chuột uống HS liều cao (3361,68 mg/kg/ngày) sau bốn tuần có số tiểu cầu giảm nhẹ so với trước khi uống. Do vậy, sản phẩm có thể tiếp tục được nghiên cứu để có thể sử dụng trên người.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn ông Nguyễn Văn Tam, tác giả của bài thuốc và xin trân trọng cảm ơn Công ty cổ phần Đông Nam

Được Vĩnh Phúc đã cung cấp sản phẩm cho đề tài trong suốt thời gian nghiên cứu. Cảm ơn Viện Nghiên cứu Y học Đinh Tiên Hoàng đã cung cấp kinh phí nghiên cứu cho đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyen-Tien T, Do DC, Le XL, et al. Risk factors of dengue fever in an urban area in Vietnam: a case-control study. *BMC Public Health*. 2021/04/07 2021;21(1):664. doi:10.1186/s12889-021-10687-y
2. Islam MA, Hemo MK, Marzan AA, et al. A short communication of 2022 dengue outbreak in Bangladesh: a continuous public health threat. *Annals of medicine and surgery (2012)*. Jun 2023;85(6):3213-3217. doi:10.1097/ms9.0000000000000623
3. Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học; 2004.
4. Thanabhorn S, Jaijoy K, Thamaree S, et al. Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from *Lonicera japonica* Thunb. *Journal of ethnopharmacology*. Oct 11 2006;107(3):370-3. doi:10.1016/j.jep.2006.03.023
5. Siharat C, Nirush L, Srisawat U, et al. Acute and subchronic toxicity study of the water extract from root of *Imperata cylindrica* (Linn.) Raeusch. in rats. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 03/01 2007;29
6. Jung YK, Shin D. *Imperata cylindrica*: A Review of Phytochemistry, Pharmacology, and Industrial Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*. Mar 7 2021;26(5). doi:10.3390/molecules26051454
7. Zhang RX, Li MX, Jia ZP. *Rehmannia glutinosa*: review of botany, chemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology*. May 8 2008;117(2):199-214. doi:10.1016/j.jep.2008.02.018
8. Shang X, Pan H, Li M, et al. *Lonicera japonica* Thunb.: ethnopharmacology,

phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *Journal of ethnopharmacology*. Oct 31 2011;138(1):1-21. doi:10.1016/j.jep.2011.08.016

9. Bộ Y tế. Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 “Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu”.

10. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS NO. 423 Acute Oral Toxicity –

Acute Toxic Class Method, adopted 17/12/2001

11. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS NO. 407 Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents, adopted 03/10/2008.

12. Mourão CF, Lowenstein A, Mello-Machado RC, et al. Standardization of Animal Models and Techniques for Platelet-Rich Fibrin Production: A Narrative Review and Guideline. *Bioengineering*. 2023;10(4):482.

Summary

ASSESSMENT ACUTE AND SUBACUTE TOXICITY OF HEMOSHIELD IN EXPERIMENTAL ANIMALS

The study aimed to evaluate the acute and subacute toxicity of the HemoShield (HS) - a product of Vinh Phuc Pharmaceutical Company (VPO Pharco.) on mice and rats. Study the on the acute toxicity of the water extract on mice using the acute and subacute toxicity test methods according to the guidelines of the Ministry of Health and the OECD. Study the acute and sub acute toxicity of capsules on rats according to the instructions of the Ministry of Health. Research results show that with a dose of 5.0 g/kg of mouse body weight, no mouse died. HemoShield extract (1120.6 mg/kg mouse body weight/day) and dose 3 times the clinical dose of human (3360.7 mg/kg mouse body weight/day) for 4 consecutive weeks of taking the HS. All monitoring indicators of general condition, weight, hematopoietic function, liver function and kidney function are within normal limits, liver and kidney histopathology have no obvious differences compared to control group ($p > 0.05$). The number of platelets in mice taking high doses of the drug after 4 weeks decreased significantly compared to the control group but no bleeding symptom appeared in the tissues. Therefore, the HemoShield product is safe and can be used for further human studies at a dose not exceeding 171 mg/kg body weight.

Keywords: Dengue fever, HemoShield (HS), acute toxicity, semi-chronic toxicity.