VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences

Journal homepage: https://js.vnu.edu.vn/MPS

Original Article

Evaluated Acute and Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Studies of Thanh nhiet - Nhuan trang Ba Giang Capsules

Tran Nguyen Hong[1], Chu Quynh Anh[2], Nguyen Thi Lien[1,*]

[1]*National Institute of Drug Quality Control, 48 Hai Ba Trung, Cua Nam, Hanoi, Vietnam*

[2]*Ba Giang Traditional Medicine Factory,*

Bagiaco Pharmaceutical Joint Stock Company – Lot II CN-08.1, Thanh Liem Industrial Park, Chau Son, Ninh Binh, Vietnam

Received 28th April 2025

Revised 16th September 2025; Accepted 22nd October 2025

Abstract: Thanh nhiet - Nhuan trang Ba Giang capsules (TNBG), used for the treatment of mouth ulcers, skin rash, erythema, acne, and fever, were evaluated for acute and repeated–dose toxicities in mice and rabbits, respectively. Acute toxicity results showed that the TNBG sample had very low toxicity with the maximum possible oral dose of 40.6 g/kg that did not cause poisoning or death in mice, so it was not possible to calculate the LD_{50} of the sample. In the repeated – dose toxicity study, rabbits were orally administered TNBG at the dosages of 165.0 and 494.9 mg/kg/day for 90 days. Blood samples were collected and analyzed for hematological and biochemical parameters on experimental days 0, 15, 30, 60 and 90. On the last day of the experiment, the liver and kidneys were excised, and tissue samples were paraffin-wax-embedded sections and stained with hematoxylin-eosin for histopathological exams. The hematological and serum biochemical values showed that there was no significant difference between the control and treatment groups. Moreover, no damage in the structure of both the liver and kidneys was observed.

Keywords: Acute toxicity, repeated dose toxicity, Thanh nhiet - Nhuan trang Ba Giang capsules (TNBG).

* Corresponding author.
E-mail address: nguyenlien.pharm@gmail.com

https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4787

Đánh giá độc tính cấp và độc tính liều lặp lại 90 ngày của viên nang Thanh nhiệt - Nhuận tràng Bà Giằng

Trần Nguyên Hồng[1], Chu Quỳnh Anh[2], Nguyễn Thị Liên[1,*]

[1]*Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, 48 Hai Bà Trưng, Cửa Nam, Hà Nội, Việt Nam*
[2]*Nhà máy sản xuất thuốc Y học Cổ truyền Bà Giằng,*
Công ty Cổ phần Dược phẩm Bagiaco – Lô II CN-08.1,
Khu Công nghiệp Thanh Liêm, Châu Sơn, Ninh Bình, Việt Nam

Nhận ngày 28 tháng 4 năm 2025
Chỉnh sửa ngày 16 tháng 9 năm 2025; Chấp nhận đăng ngày 22 tháng 10 năm 2025

Tóm tắt: Viên nang Thanh nhiệt - Nhuận tràng Bà Giằng (TNBG) được chỉ định điều trị loét miệng, phát ban da, ban đỏ, mụn trứng cá và hạ nhiệt, được chúng tôi tiến hành nghiên cứu đánh giá độc tính cấp trên chuột và độc tính bán trường diễn trên thỏ. Kết quả độc tính cấp cho thấy mẫu thử TNBG có độc tính rất thấp với liều tối đa có thể cho uống 40,6 g/kg không gây ngộ độc và không gây chết chuột, do đó không thể tính được LD_{50} của mẫu thử. Trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn, thỏ được uống cho uống TNBG với liều 165,0 mg/kg/ngày (tương đương với liều tối đa ở người) và 494,9 mg/kg/ngày (liều cao gấp 3 lần liều tối đa ở người) trong 90 ngày. Các mẫu máu của thỏ được thu thập và phân tích các thông số huyết học, sinh hóa vào ngày thứ 0, 15, 30, 60, 90. Ngày cuối cùng của thí nghiệm, mẫu gan và thận đã được lấy để tiến hành làm tiêu bản và nhuộm bằng hematoxylin-eosin. Các thông số huyết học và hoá sinh máu không có sự khác biệt giữa các nhóm đối chứng và điều trị. Hơn nữa, không nhận thấy bất thường về cấu trúc trên tiêu bản mô bệnh học gan và thận.

Từ khoá: Độc tính cấp, độc tính bán trường diễn, Viên nang TNBG.

1. Mở đầu

Thuốc thanh nhiệt theo y học cổ truyền là những vị thuốc có tính hàn, lương để chữa bệnh gây chứng nhiệt trong người như nhiệt độc do nhiễm khuẩn ngoài da, hô hấp, tiêu hoá, tiết niệu, sinh dục, hoặc thử nhiệt do say nắng, nắng nóng của mùa hè. Viên nang TNBG được chỉ định điều trị viêm loét miệng, phát ban da, ban đỏ, mụn trứng cá và hạ nhiệt. Diêm sinh trong bài thuốc TNBG, được chế từ lưu huỳnh tự nhiên theo phương pháp gia truyền, là một vị thuốc quý trong Đông y. Tuy nhiên, lưu huỳnh nếu điều chế không cẩn thận, không đúng cách thì độc tính chưa được chế ngự có thể gây độc. Theo y học cổ truyền, diêm sinh có tác dụng trị mụn nhọt, sát trùng, thông tiện, chỉ dưỡng, kiện gân mạnh cốt, hàn nhiệt nghịch khái, chủ hư hàn cửu lị hoạt tả [1], theo y học hiện đại lưu huỳnh cung cấp năng lượng cho ruột, tăng động ruột và gây tiêu chảy, giảm ho, hóa đàm và điều trị viêm đau khớp (thử nghiệm trên động vật) [2]. Các nghiên cứu độc tính của lưu huỳnh trên các động vật thí nghiệm cho thấy các kết quả tác động khác nhau khi sử dụng hàng ngày, trên lợn khi sử dụng liều 1000 ppm trong nước uống chỉ cho thấy tiêu

* Tác giả liên hệ.
Địa chỉ email: nguyenlien.pharm@gmail.com

https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4787

chảy nhẹ và 0,42% trong chế độ ăn trong vài tháng không thấy xuất hiện các biểu hiện bất thường [3], còn trên gà sử dụng lưu huỳnh liều 1,2% trong chế độ ăn, cũng là giảm tỷ lệ phát triển, giảm sản suất trứng và thức ăn tiêu thụ, gây chết lượng lớn ở liều 16000 ppm [4], với các động vật có dạ cỏ khi sử dụng lưu huỳnh trong trong thức ăn 0,3 - 0,4% gây ra các độc tính, rối loạn tiểu não, yếu, mù, mất thăng bằng, động kinh và chết [5]. Ở Việt Nam, theo thông tư 13/2024/TT-BYT, phụ lục III có quy định danh mục các dược liệu có độc tính nguồn gốc khoáng vật, lưu hoàng (còn có tên gọi khác là diêm sinh, hoàng nha,…) cần đánh giá, kiểm tra độ an toàn, các độc tính trong quá trình sử dụng [6]. Hiện nay chưa có đầy đủ bằng chứng khoa học về mức an toàn hay các độc tính của chế phẩm TNBG, vì vậy chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn liều lặp lại 90 ngày của sản phẩm TNBG trên động vật thí nghiệm.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Viên nang TNBG do Công ty Công ty cổ phần Dược phẩm Bagiaco – Chi nhánh Ninh Bình sản xuất đạt tiêu chuẩn cơ sở. Thành phần 1 viên nang bao gồm: Diêm sinh chế (*Sulfur*) 120 mg, Sa sâm (*Radix Glehnia*) 80 mg, Ý dĩ (*Semen Coicis*) 78,4 mg, Xuyên bối mẫu (Bulbus Pritillariae) 72 mg, Hạt sen (*Semen Nelumhinis nuciferae*) 40 mg, Hoài sơn (*Tuber Dioscoreae persimili*) 40 mg, tá dược tinh bột sắn, magnesium stearate vừa đủ 1 viên. Liều tối đa dùng trên người là 6 viên/người/ngày. Khối lượng trung bình của bột thuốc trong viên là 0,441 g.

2.2. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

Máy xét nghiệm sinh hóa (Beckman Coulter AU 680, Mỹ);

Máy xét nghiệm huyết học (Sysmex XS-1000I, Nhật Bản);

Máy li tâm lạnh (Eppendorf 5804 R, Đức);

Máy cắt vi thể (Microm HM315, Đức);

Kính hiển vi quang học gắn camera kết nối máy tính (Nikon, Nhật Bản);

Kim cong cho uống;

Xy lanh, găng cao su, cốc thủy tinh, chày cối sứ;

Bộ kít định lượng các chỉ số huyết học và sinh hóa (Stromatolyser và Beckman Coulter);

Các hóa chất khác.

2.3. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino* cả hai giới, khỏe mạnh, 5 - 6 tuần tuổi, trọng lượng 18 - 20 g do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp. Thỏ trắng *New Zealand* cả hai giới, trưởng thành khỏe mạnh, 12 tuần tuổi, cân nặng 1,8 - 2,2 kg do Viện kiểm nghiệm Thuốc Trung ương cung cấp. Động vật được nuôi trong phòng kiểm soát nhiệt độ từ 25 ^{o}C ± 3 ^{o}C, độ ẩm tương đối từ 30 - 70 %, chu kỳ 12 h sáng/tối. Động vật được ăn uống theo nhu cầu với thức ăn công thức phù hợp dành cho chuột và thỏ. Tất cả các qui trình thực hiện trên động vật đều được tuân theo hướng dẫn về chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Đánh giá độc tính cấp

Phương pháp đánh giá độc tính cấp và xác định LD_{50} dựa theo phương pháp của Behrens và Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng thuốc Đông y, thuốc từ dược liệu với phương châm sử dụng tối thiểu số lượng động vật thí nghiệm [7, 8]:

Tiến hành thử nghiệm sơ bộ xác định mức độ độc của mẫu. Cách xử lý và chuẩn bị mẫu thử: Lấy bột thuốc trong nang, nghiền kỹ, trộn đều với nước để thu được hỗn dịch thử chứa 0,676 g mẫu thử/ml. Cách cho uống: cho chuột uống bằng kim phù hợp với thể tích 0,4 ml/20 g thể trọng/lần, 3 lần/ngày, mỗi lần cách nhau 2 giờ (tổng thể tích mẫu cho uống là 1,2 ml/ngày/20g thể trọng). Kết quả sơ bộ cho thấy, liều tối đa có thể cho uống (40,6 g bột thuốc/kg chuột, cao gấp 62,3 lần liều tối đa dùng cho người) không gây ra biểu hiện ngộ độc hay bất thường nào. Do đó thử nghiệm chính thức được tiến hành trên 2 nhóm chuột mỗi nhóm 10 chuột: nhóm chứng sinh lý uống nước; nhóm thử uống mẫu thử với

cách cho uống và liều uống là liều tối đa có thể cho uống như ở thử nghiệm sơ bộ (40,6 g bột thuốc/kg chuột).

Theo dõi biểu hiện của chuột (về khối lượng, hành vi, vận động, tình trạng ăn, uống, phân, nước tiểu,…) sau khi uống trong 24 giờ đầu và theo dõi hoạt động của chuột trong thời gian 7 ngày sau khi uống.

2.4.2. Đánh giá độc tính liều lặp lại 90 ngày

Nghiên cứu độc tính liều lặp lại trong 90 ngày được tiến hành theo OECD 409 trên thỏ và hướng dẫn thử nghiện tiền lâm sàng và lâm sàng các thuốc Đông y, thuốc từ dược liệu [8, 9]. Thỏ cả hai giới được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm thỏ (n = 7 con/nhóm) (tỷ lệ cái/đực trong từng nhóm 4:3), uống liên tục trong 90 ngày, gồm:

Nhóm chứng: Uống nước (5 ml/kg thỏ);

Nhóm thử 1 (T1): Uống mẫu thử với liều 165,0 mg/kg/ngày (5 ml hỗn dịch A/kg thỏ);

Nhóm thử 2 (T2): Uống mẫu thử với liều 494,9 mg/kg/ngày (5 ml hỗn dịch B/kg thỏ);

Chuẩn bị mẫu thử: Lấy 17,8 g bột thuốc, nghiền, trộn đều, thêm nước vừa đủ để thu được 156 ml hỗn dịch A. Pha loãng 40 ml hỗn dịch A với nước vừa đủ 120 ml thành hỗn dịch B.

Thỏ được theo dõi hàng ngày mức độ tiêu thụ thức ăn, khả năng vận động, tình trạng phân, lông. Trước thí nghiệm, xác định cân nặng của thỏ, các dấu hiệu toàn thân, lấy máu xét nghiệm đánh giá các chỉ số huyết học (số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hemoglobin, hematocrit), các chỉ số sinh hóa (AST, ALT, cholesterol, bilirubin, creatinin, urê, protein toàn phần). Theo dõi cân nặng của thỏ hàng tuần. Tại các thời điểm 0, 15, 30, 60, 90 ngày sau uống mẫu thử, thỏ được lấy máu để làm các xét nghiệm nêu trên. So sánh kết quả của nhóm thử và nhóm chứng theo phương pháp thống kê. Kết thúc thí nghiệm thỏ của các nhóm được tiến hành lấy tiêu bản gan, thận; biểu mô được cố định bằng Formalin 10%, nhuộm bằng dung dịch nhuộm Hematoxylin Eosin (HE) và Perioric acid Shiff (PAS) và quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400 lần.

2.5. Trình bày và xử lý số liệu

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình cộng trừ độ lệch chuẩn (mean ± SD) và được xử lý thống kê bằng phép phân tích phương sai 1 chiều (One-way ANOVA) với hậu kiểm (post-hoc) Newman-Keuls test hoặc bằng phép Student's t-test sử dụng phần mềm Prism phiên bản 8.0 (Graph Pad Software), với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$, giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

3. Kết quả nghiên cứu và bàn luận

3.1. Kết quả độc tính cấp

Quan sát biểu hiện của chuột sau khi uống hỗn dịch thử khoảng 2 giờ, tất cả chuột có biểu hiện toàn thân lông ướt bết, giảm hoạt động. Sau 24 giờ chuột ăn uống và hoạt động bình thường trở lại bình thường.

Kết quả theo dõi khối lượng chuột tại thời điểm trước thí nghiệm, ngày 1, 3 và 7 sau khi uống mẫu thử được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả theo dõi khối lượng chuột nghiên cứu độc tính cấp

Nhóm (n = 10)	Khối lượng chuột (g)				Giá trị p *(trước - sau)*
	Trước thí nghiệm	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 7	
Chứng	19,75 ± 0,58	20,15 ± 0,69	23,05 ± 0,72	29,38 ± 1,18	p > 0,001
Thử	19,74 ± 0,56	20,04 ± 1,06	22,95 ± 1,04	29,48 ± 0,65	p > 0,001
$p_{chứng\text{-}thử}$	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	

Khối lượng chuột tăng chậm vào ngày 1, nhưng dần tăng nhanh vào các ngày kế tiếp. Kết thúc thí nghiệm (ngày 7) chuột ở các nhóm thử và chứng đều tăng cân có ý nghĩa thống kê so với trước thử nghiệm ($p_{trước\text{-}sau} < 0,001$, Bảng 1). Không có sự khác biệt về cân nặng giữa nhóm

thử và nhóm chứng ở mỗi thời điểm trước thí nghiệm, ngày 1, 3 và 7 ($p > 0,05$).

3.2. Kết quả độc tính liều lặp lại 90 ngày

3.2.1. Kết quả theo dõi cân nặng thỏ

Trong thời gian thí nghiệm, tất cả các thỏ đều hoạt động bình thường, ăn uống tốt, mắt sáng, lông mượt, phân khô. Không có biểu hiện bất thường về ăn uống cũng như vận động. Khối lượng cân của thỏ được theo dõi thể hiện trong Bảng 2.

Theo dõi cân nặng thỏ trong quá trình thí nghiệm cho thấy: Trong suốt 90 ngày thử nghiệm cân nặng của thỏ ở nhóm chứng và hai nhóm thử đều tăng, và không có sự khác biệt cân nặng giữa các nhóm ở từng thời điểm đánh giá ($p_{ANOVA} > 0,05$). Ở thời điểm kết thúc thí nghiệm, khối lượng thỏ tăng 160 % ($p < 0,001$), 157% ($p < 0,001$), 158% ($p < 0,001$) lần lượt ở nhóm chứng, thử 1 và thử 2 so với trước thí nghiệm; khối lượng thỏ ở thời điểm kết thúc thí nghiệm cũng không thấy có sự khác biệt giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử ($p_{ANOVA} > 0,05$).

3.2.2. Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học liên quan tới chức năng tạo máu

Thỏ được lấy máu và xét nghiệm các thông số huyết học tại các thời điểm ngày 15, 30, 60, 90 tóm tắt trong Bảng 3.

Bảng 2. Kết quả theo dõi cân nặng của thỏ

	Nhóm chứng (n = 7)	Nhóm thử 1 (n = 7)	Nhóm thử 2 (n = 7)	P_{ANOVA}
Trước TN	2,02 ± 0,1	2,03 ± 0,1	1,96 ± 0,1	p > 0,05
Sau 1 tuần	2,17 ± 0,1	2,20 ± 0,1	2,12 ± 0,1	p > 0,05
Sau 2 tuần	2,26 ± 0,1	2,31 ± 0,1	2,23 ± 0,1	p > 0,05
Sau 4 tuần	2,48 ± 0,2	2,59 ± 0,1	2,39 ± 0,1	p > 0,05
Sau 8 tuần	2,81 ± 0,2	2,95 ± 0,2	2,79 ± 0,2	p > 0,05
Sau 12 tuần	3,17 ± 0,1	3,16 ± 0,2	3,01 ± 0,2	p > 0,05
Kết thúc TN	3,23 ± 0,1***	3,20 ± 0,3***	3,07 ± 0,2***	p > 0,05
*** $p < 0,001$, so sánh khối lượng cân với thời điểm trước thí nghiệm của nhóm tương ứng; P_{ANOVA}: giá trị p so sánh giữa các nhóm tại các thời điểm.				

Bảng 3. Thông số huyết học của thỏ tại các thời điểm đánh giá

Thời điểm	Nhóm *(n = 7)*	Chỉ số					Giá trị p_{ANOVA}
		Hồng cầu ($\times 10^{12}$/l)	Bạch cầu ($\times 10^{9}$/l)	Tiểu cầu ($\times 10^{9}$/l)	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dl)	
Trước thí nghiệm	Nhóm chứng	5,7 ± 0,3	8,7 ± 0,5	538,1 ± 113,6	38,5 ± 1,1	11,7 ± 0,5	p > 0,05
	Nhóm T1	5,4 ± 0,4	8,6 ± 1,8	496,9 ± 116,7	37,7 ± 2,4	11,7 ± 0,7	
	Nhóm T2	5,3 ± 0,7	8,7 ± 2,2	565,9 ± 130,1	37,7 ± 3,4	11,6 ± 1,0	
Ngày 15	Nhóm chứng	5,4 ± 0,6	8,1 ± 1,8	585,9 ± 96,9	35,6 ± 1,5	10,7 ± 0,6	p > 0,05
	Nhóm T1	5,6 ± 0,3	8,2 ± 1,3	505,0 ± 156,8	37,5 ± 2,0	11,3 ± 0,7	
	Nhóm T2	5,3 ± 0,5	8,7 ± 2,2	526,7 ± 103,3	37,1 ± 2,5	11,2 ± 0,8	
Ngày 30	Nhóm chứng	5,7 ± 0,4	10,0 ± 1,3	525,6 ± 166,9	39,2 ± 1,8	11,9 ± 0,5	p > 0,05
	Nhóm T1	5,6 ± 0,5	9,8 ± 2,0	466,3 ± 145,0	37,8 ± 1,8	11,7 ± 0,5	
	Nhóm T2	5,7 ± 0,8	9,6 ± 2,3	585,6 ± 175,7	38,5 ± 3,8	11,8 ± 1,1	
Ngày 60	Nhóm chứng	6,0 ± 0,2	9,6 ± 1,6	482,9 ± 67,1	40,3 ± 1,1	12,4 ± 0,4	p > 0,05
	Nhóm T1	6,0 ± 0,4	10,5 ± 2,5	468,0 ± 119,8	40,2 ± 1,5	12,5 ± 0,5	
	Nhóm T2	5,8 ± 0,2	9,5 ± 2,2	534,4 ± 136,9	39,5 ± 1,4	12,1 ± 0,3	
Ngày 90	Nhóm chứng	6,0 ± 0,7	9,6 ± 1,9	477,4 ± 114,5	40,2 ± 2,6	12,6 ± 0,9	p > 0,05
	Nhóm T1	6,1 ± 0,5	10,1 ± 1,7	411,7 ± 137,7	41,1 ± 2,7	13,2 ± 0,7	
	Nhóm T2	6,2 ± 0,5	9,7 ± 1,9	490,6 ± 81,5	40,8 ± 2,1	13,3 ± 0,7	

Kết quả xét nghiệm một số chỉ số huyết học cho thấy: thông số huyết học của thỏ (n=7) trong 3 nhóm tại thời điểm trước thí nghiệm; ngày 15; ngày 30; ngày 60 và ngày 90 đều không thấy có sự khác biệt giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử ($p_{ANOVA} > 0,05$); các thông số huyết học trong từng nhóm cũng không có sự thay đổi từ thời điểm bắt đầu tới thời điểm kết thúc thí nghiệm ($p > 0,05$).

3.2.3. Kết quả theo dõi thông số hoá sinh máu

Thỏ được lấy máu và xét nghiệm các thông số hoá sinh cũng tại các thời điểm ngày 15, 30, 60, 90 tóm tắt trong Bảng 4.

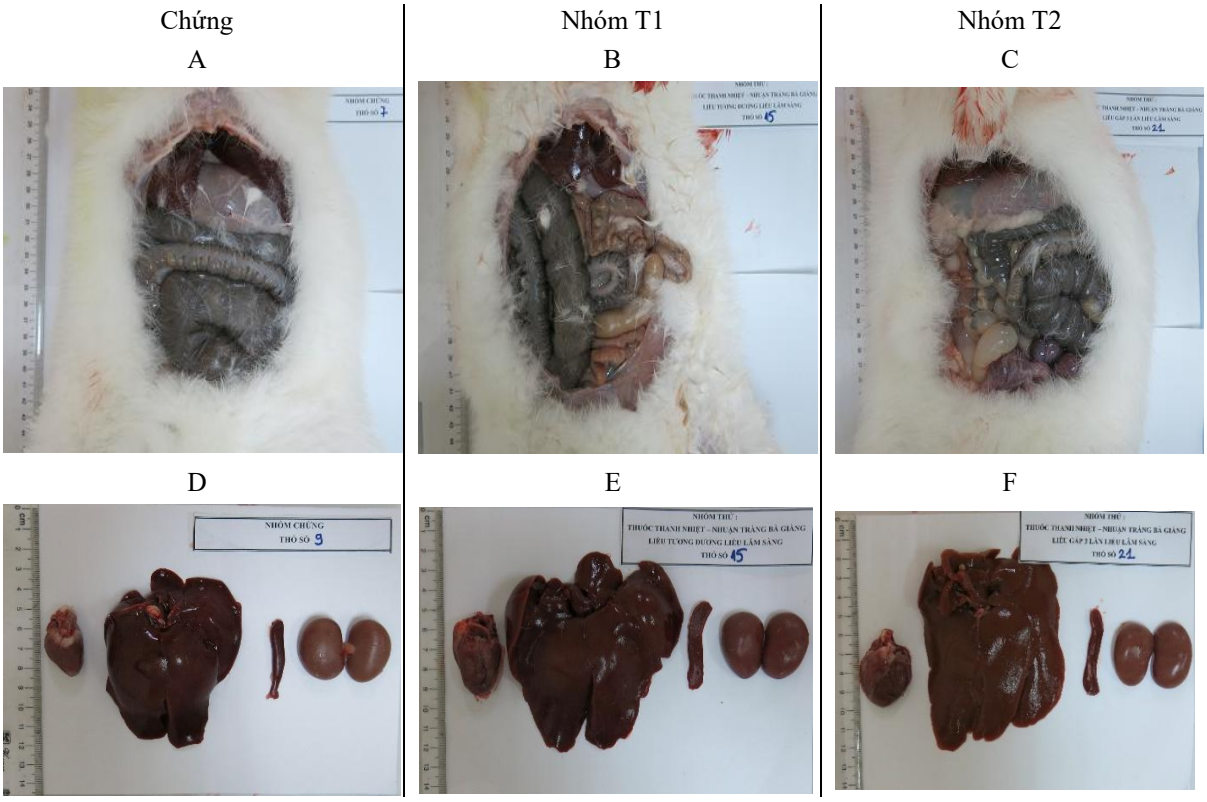
Bảng 4. Thông số hoá sinh máu của thỏ tại các thời điểm đánh giá

Thời điểm	Nhóm *(n = 7)*	AST (U/l)	ALT (U/l)	Bilirubin toàn phần (mmol/l)	Albumin (g/l)	Cholesterol (mmol/l)	Glucose (mmol/l)	Urê (mmol/l)	Creatinin (µmol/l)	Giá trị p_{ANOVA}
Trước thí nghiệm	Nhóm chứng	34,8 ±7,0	57,1 ± 14,6	1,0 ± 0,1	37,4 ±0,8	2,0 ± 0,1	6,3 ± 0,3	4,2 ± 0,2	89,9 ±6,1	p > 0,05
	Nhóm T1	28,4 ±6,8	57,6 ± 13,5	1,2 ± 0,2	38,3 ±1,4	2,1 ± 0,5	6,5 ± 0,6	4,2 ± 0,8	89,9 ±6,9	
	Nhóm T2	30,2 ± 12,0	63,3 ± 16,6	1,2 ± 0,2	38,1 ± 1,3	2,1 ± 0,4	6,8 ± 0,7	3,9 ± 0,5	88,2 ± 13,4	
Ngày 15	Nhóm chứng	48,7 ± 15,3	72,3 ± 7,5	1,1 ± 0,4	38,9 ± 2,3	2,0 ± 0,3	5,7 ± 0,3	4,8 ± 0,7	88,5 ± 12,0	p > 0,05
	Nhóm T1	37,6 ± 9,9	64,5 ± 18,5	1,0 ± 0,4	38,3 ± 1,4	1,9 ± 0,5	5,7 ± 0,5	4,5 ± 0,6	98,5 ± 9,2	
	Nhóm T2	45,7 ± 13,6	76,3 ± 15,2	1,3 ± 0,5	38,5 ± 1,1	2,0 ± 0,2	5,9 ± 0,6	4,6 ± 0,5	93,4 ± 6,8	
Ngày 30	Nhóm chứng	52,4 ± 17,5	71,6 ± 19,0	1,6 ± 0,7	38,4 ± 2,2	1,6 ± 0,6	7,1 ± 0,5	5,2 ± 0,9	93,9 ± 13,6	p > 0,05
	Nhóm T1	46,0 ± 22,7	70,8 ± 19,2	1,5 ± 0,6	37,4 ± 1,6	1,4 ± 0,5	6,9 ± 0,6	4,7 ± 0,9	102,3 ± 7,8	
	Nhóm T2	55,5 ± 22,9	81,0 ± 16,5	1,7 ± 0,5	37,6 ± 2,0	1,8 ± 0,4	6,6 ± 0,6	5,0 ± 0,9	98,6 ± 9,6	
Ngày 60	Nhóm chứng	37,4 ± 13,2	78,0 ± 17,0	1,0 ± 0,4	39,1 ± 1,1	2,1 ± 0,5	6,7 ± 0,4	5,5 ± 1,2	94,2 ± 7,0	p > 0,05
	Nhóm T1	41,7 ± 15,0	74,6 ± 26,9	1,1 ± 0,3	38,3 ± 1,2	1,7 ± 0,7	7,0 ± 0,4	5,1 ± 0,6	102,0 ± 12,9	
	Nhóm T2	43,5 ± 18,3	77,5 ± 22,2	1,0 ± 0,3	37,9 ± 2,0	2,2 ± 0,7	7,1 ± 0,6	4,6 ± 0,9	97,5 ± 13,2	
Ngày 90	Nhóm chứng	38,7 ± 9,4	64,9 ± 23,7	1,6 ± 0,5	43,1 ± 2,7	1,7 ± 0,7	5,8 ± 0,7	4,6 ± 0,8	85,3 ± 10,2	p > 0,05
	Nhóm T1	35,6 ± 16,4	69,2 ± 18,0	1,6 ± 0,3	41,7 ± 2,2	1,5 ± 0,6	5,5 ± 0,5	5,2 ± 0,5	91,2 ± 10,0	
	Nhóm T2	33,8 ± 14,8	65,9 ± 21,5	1,6 ± 0,3	40,7 ± 1,8	1,7 ± 0,5	5,6 ± 0,7	4,7 ± 0,5	89,6 ± 10,8	

Kết quả xét nghiệm một số chỉ số hoá sinh máu cho thấy: thông số hoá sinh của thỏ (n = 7) trong 3 nhóm tại thời điểm trước thí nghiệm; ngày 15; ngày 30; ngày 60 và ngày 90 đều không thấy có sự khác biệt giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử ($p_{ANOVA} > 0,05$); các thông số hoá sinh trong từng nhóm cũng không có sự thay đổi từ thời điểm bắt đầu tới thời điểm kết thúc thí nghiệm ($p > 0,05$).

3.2.4. Kết quả hình ảnh đại thể cơ quan

Sau khi kết thúc thí nghiệm thỏ được chụp lại hình ảnh đại thể: không có biểu hiện khác thường về hình dạng bên ngoài, màu sắc của các tổ chức tim, gan, thận, phổi, dạ dày, ruột giữa nhóm thử với nhóm chứng (Hình 3).



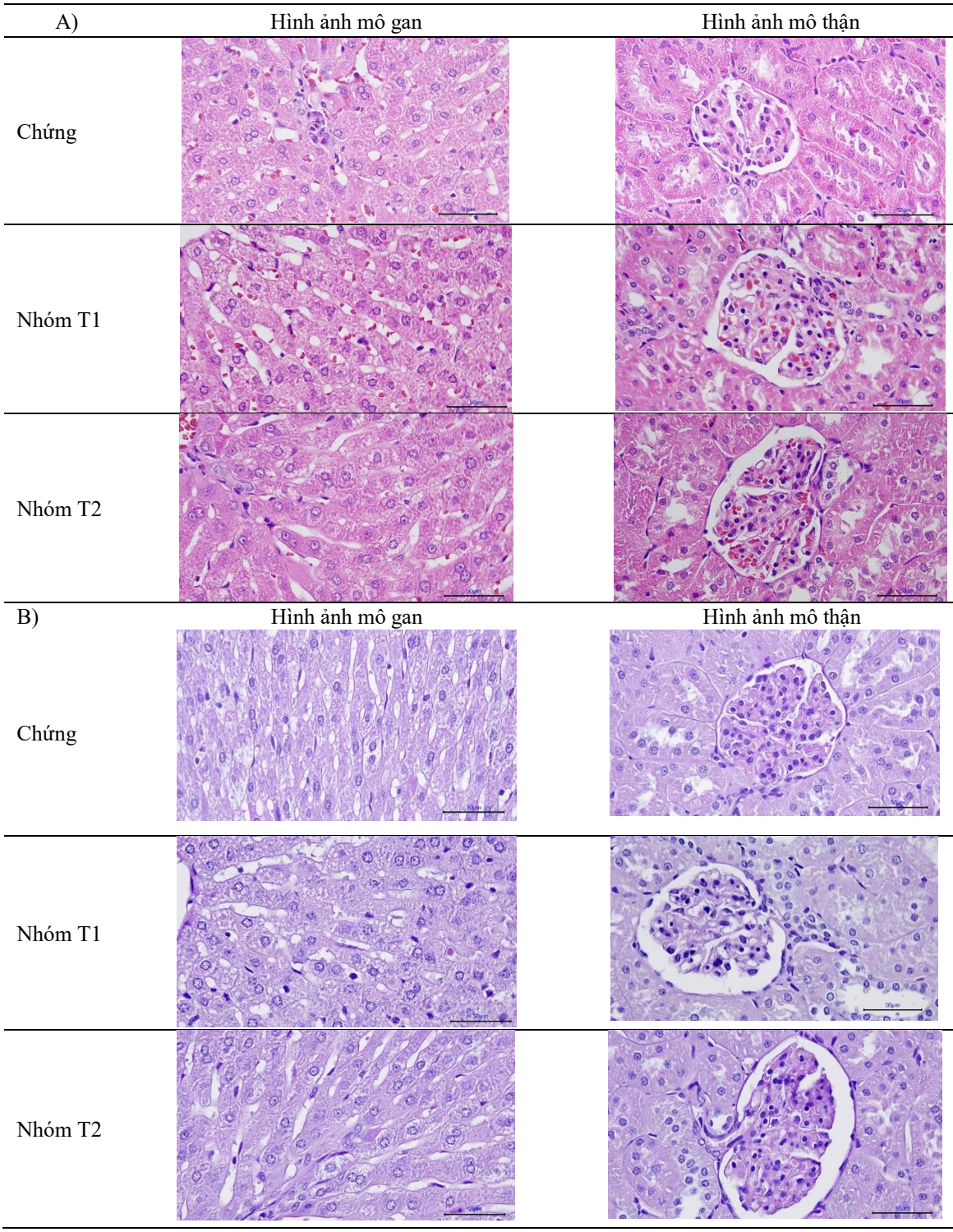
Hình 1. Hình ảnh đại thể cơ quan của thỏ các nhóm (A-C) và hình ảnh tim, gan, lách, thận (D-F). Trong đó, A&D- Nhóm chứng; B&E- Nhóm Thử 1; C&F-Nhóm Thử 2.

Kết quả hình ảnh đại thể và các cơ quan tim, gan, lách, thận của các thỏ sau khi sử dụng mẫu thử tại thời điểm kết thúc thí nghiệm không thấy có dấu hiệu bất thường so với nhóm chứng.

3.2.5. Kết quả giải phẫu mô bệnh gan và thận

Kết quả quan sát vi thể do Khoa Giải phẫu sinh lý bệnh – Bệnh viện Quân Y 103 thực hiện cho thấy: Hình ảnh vi thể cho thấy các thỏ thử nghiệm đều có gan và thận không bị tổn thương, hình ảnh cấu trúc trong giới hạn bình thường. Không có các triệu chứng bất thường liên quan đến mẫu thử. Cụ thể: Trên các mảnh cắt của mô gan cho thấy cấu trúc gan không bị đảo lộn, nhận rõ các tiểu thùy với tĩnh mạch trung tâm và các khoảng cửa. Tại các khoảng cửa không thấy tăng sinh xơ, không thấy tăng sinh ống mật và cũng không thấy xâm nhập viêm. Các tế bào gan có hình thái bình thường, không thấy hoại tử tế bào gan (Hình 4). Trên các mảnh cắt từ mô thận cho thấy các cầu thận, ống thận có hình thái bình thường. Trong các cầu thận nhận rõ khoang Bowman, không thấy tăng sinh tế bào cuộn mao mạch cầu thận, màng đáy cuộn mao mạch cầu thận không dày. Các ống thận có cấu trúc, hình thái trong giới hạn bình thường, mô đệm không thấy xâm nhập viêm, không xơ hóa. Các tế bào ống thận không lắng đọng glycogen, không thoái hóa, không hoại tử (Hình 4).

Theo phương pháp Behrens với khái niệm là một con vật đã chết ở một liều nào đó thì cũng chết ở các liều cao hơn, cũng như một con vật sống ở một liều nào đó thì cũng sống sót ở liều thấp hơn. Với kết quả của nghiên cứu độc tính cấp trên chuột nhắt trắng của chế phẩm TNBG có thể thấy liều gây chết 50 % động vật thí nghiệm (LD_{50}) không xác định được, và liều không gây chết chuột (LD_0) (liều đặc nhất có thể cho uống) là 40,6 g bột thuốc/kg chuột. Theo phân loại độc tính của GHS [10], mẫu thử viên nang TNBG có độc tính thấp dưới ngưỡng phân loại.



Hình 2. Hình ảnh giải phẫu tiêu bản gan, thận của thỏ sau khi kết thúc thí nghiệm. Hình ảnh tiêu bản được quan sát ở độ phóng đại 400 lần, với tiêu bản gan (hình trái) và tiêu bản thận (hình phải) được nhuộm HE (A) và nhuộm PAS (B).

Kết quả độc tính liều lặp lại trên thỏ uống hỗn dịch mẫu thử liên tục trong 90 ngày với 2 mức liều khác nhau là 165,0 mg /kg thỏ/ngày (tương ứng với mức liều tối đa dùng cho người là 6 viên/người/ngày) và 494,9 mg /kg thỏ/ngày (cao gấp 3 lần so với liều dùng tối đa ngoại suy cho người), mẫu thử không ảnh hưởng đến cân nặng, thể trạng, hoạt động của thỏ thí nghiệm. Thỏ khỏe mạnh, tăng cân. Các chỉ số sinh hóa (AST, ALT, albumin, bilirubin toàn phần, cholesterol, urê, creatinin, glucose) và các chỉ số huyết học (hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, bạch cầu, tiểu cầu) không có sự khác biệt ở thời điểm trước thử nghiệm; sau 15 ngày; 30 ngày; 60 ngày và 90 ngày uống mẫu thử giữa nhóm thử nghiệm so với nhóm chứng. Kết quả phân tích hình ảnh tiêu bản đều không nhận thấy bất thường ở các tổ chức tim, gan, thận, phổi, lách và hệ tiêu hóa của thỏ thí nghiệm khi quan sát đại thể cũng như không nhận thấy tổn thương mô bệnh học của gan, thận khi so sánh giữa hai nhóm thử nghiệm và nhóm chứng.

Mặc dù viên nang Thanh nhiệt - TNBG có chứa thành phần Diêm sinh chế có nguồn gốc từ lưu huỳnh thuộc Danh mục dược liệu có độc tính nguồn gốc khoáng vật do Bộ y tế ban hành tuy nhiên Diêm sinh sau khi được chế biến và phối trộn vào công thức thuốc theo phương pháp gia truyền đã giảm được độc tính. Các kết quả thử độc tính đều đã cho thấy thuốc không gây biểu hiện độc tính cấp, sử dụng dài ngày (90 ngày) không gây ảnh hưởng xấu tới thể trạng, chỉ số sinh hóa, huyết học, mô bệnh học gan thận của động vật thí nghiệm.

Trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn chúng tôi cũng mới chỉ đánh giá được mẫu thử ở 2 mức liều (liều tương đương với liều dùng tối đa trong một ngày ngoại suy từ người hay liều lâm sàng và liều gấp 3 lần liều lâm sàng) mỗi mức liều mới chỉ thử trên 07 động vật thử nghiệm. Số mức liều thử và số lượng động vật thí nghiệm trong nghiên cứu này tuy còn ít nhưng cơ bản đáp ứng yêu cầu theo các hướng dẫn và quy định hiện hành [8, 9]. Các dữ liệu thu được từ nghiên cứu này là cơ sở bước đầu cho những nghiên cứu lâm sàng trong tương lai để đánh giá đầy đủ tính an toàn và hiệu quả của thuốc trên người.

4. Kết luận

Các kết quả nghiên cứu độc tính cho thấy viên nang Thanh nhiệt - TNBG dùng với liều tối đa có thể cho uống 40,6 g/kg chuột không gây biểu hiện độc tính cấp trên chuột nhắt trắng. Sử dụng thuốc liên tục trong 90 ngày với 2 mức liều tương đương liều dùng tối đa trên người và liều gấp 3 lần liều dùng tối đa trên người không gây biểu hiện bất thường, không ảnh hưởng tới sự tăng trọng, chỉ số sinh hóa, huyết học, mô bệnh học gan và thận của thỏ. Từ kết quả thực nghiệm có thể thấy viên nang Thanh nhiệt - TNBG khi sử dụng đúng liều chỉ định đảm bảo về độ an toàn.

Tài liệu tham khảo

[1] D. A.Tich, Shen-nong's Herbal Classics, Hong Duc Publishing House, 2021, pp. 219-220.
[2] J. O. Hall, Chapter 35 - Sulfur, in Veterinary Toxicology (Third Edition), Ramesh C. Gupta, Editor, Academic Press, 2018, pp. 483-487.
[3] D. W. Paterson, R. C. Wahlstrom, G. W. Libal, O. E. Olson, Effects of Sulfate in Water on Swine Reproduction and Young Pig Performance, Journal of Animal Science, Vol. 49, No. 3, 1979, pp. 664-667.
[4] A. W. Adams, F. E. Cunningham, L. L. Munger, Some Effects on Layers of Sodium Sulfate and Magnesium Sulfate in Their Drinking Water1, Poultry Science, Vol. 54, No. 3, 1975, pp. 707-714.
[5] K. Kandylis, Toxicology of Sulfur in Ruminants: Review. Journal of Dairy Science, Vol. 67, No. 10, 1984, pp. 2179-2187.
[6] Ministry of Health, Circular 13/2024/TT-BYT List of Toxic Medicinal Herbs Used as Medicines, 2024.
[7] D. T. Dam, Methods for Determining the Toxicity of Drugs, Medical Publishing House, 2014.
[8] Ministry of Health, Guidelines for Preclinical Testing of Oriental Medicines and Medicines from Medicinal Herbs (Issued with Decision No. 141/QD-K2DT Dated October 27, 2015 of the Ministry of Health), 2015.
[9] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (Section 4), Test No. 409: Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Non-Rodents, 1998.
[10] United Nations Economic Commission for Europe, Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), United Nations, 2023.