

NGHIÊN CỨU TÍNH AN TOÀN CỦA CHẾ PHẨM KN-09
TRÊN THỰC NGHIỆM

Nguyễn Tùng Linh^{*}; Nguyễn Như Linh^{*}
Vũ Đình Tiến^{**}; Nguyễn Văn Long^{*}

TÓM TẮT

Chế phẩm ích trí kiện não KN-09 do Học viện Quân y bào chế để dự phòng và điều trị say sóng, say tàu xe và rối loạn tiền đình, đạt tiêu chuẩn cơ sở. Trước khi áp dụng trên người cần được nghiên cứu xác định tính an toàn của chế phẩm. Kết quả nghiên cứu cho thấy: chưa xác định được liều LD₅₀ của cao đặc KN-09 theo đường uống trên thực nghiệm khi cho động vật uống với mức liều cao nhất có thể đưa vào dạ dày (22,5 g/kg thể trọng). Khi cho thỏ uống ở mức liều 1,0 và 2,0 g/kg thể trọng mỗi ngày, liên tục trong 42 ngày đã không ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường của thỏ, không ảnh hưởng đến chức năng gan, thận và các chỉ số huyết học ở máu ngoại vi của động vật thực nghiệm.

^{*} Từ khoá: Chế phẩm ích trí kiện não KN-09; Tính an toàn.

STUDY OF SAFETY PROPERTIES OF KN-09
PRODUCT IN EXPERIMENT

SUMMARY

KN-09 are prepared by Vietnam Military Medical University for the supportive treatment of sea sickness, meet basic standards. Before applying on human being, it is necessary to be investigated for the safety properties. The investigated results showed that: the LD₅₀ of KN-09 has not been determined, although we have administered as high as possible the dosage for oral administration on experimental animals (22.5 g/kg body weight). When administering KN-09 orally on rabbits at the dose of 1.0 and 2.0 g/kg body weight daily, continuously administering for 42 days, didn't affect the normal growth of rabbits. It didn't influence the function of liver, kidney and spleen organs of experimental animals.

^{*} Key words: KN-09 product; Safety properties.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Say sóng là bệnh lý thường gặp khi hoạt động trên biển với tỷ lệ khá cao, có thể ảnh hưởng đến hiệu quả huấn luyện và chiến

đấu của bộ đội. Việc dùng thuốc để dự phòng và điều trị say sóng trong mỗi chuyến chưa phải là giải pháp tối ưu do tác dụng phụ: buồn ngủ, đau đầu, khô miệng,

^{*} Học viện Quân y

^{**} Bộ Y tế

Phản biện khoa học: PGS. TS. Lê Văn Sơn

rối loạn tiêu hóa, dị ứng... Vì vậy, với một số người chuẩn bị cho những chuyến đi

biển, họ thường lựa chọn biện pháp sử dụng các vị thuốc theo y học cổ truyền để

dự phòng. Đối với bộ đội hải quân hoạt động trên biển, ngoài biện pháp luyện tập, việc kết hợp sử dụng những thuốc y học cổ truyền đang là một hướng mới để nâng cao hiệu quả dự phòng và hạn chế tối đa những triệu chứng do say sóng gây ra.

Xuất phát từ nhu cầu thực tế và kế thừa bài thuốc cổ phương “Ích khí thông minh thang”, đây là bài thuốc đã được sử dụng để điều trị chứng huyễn vựng, tương tự như say sóng. Học viện Quân y đã nghiên cứu bào chế thành công trà tan Ich trí kiện não KN-09 từ bài thuốc trên. Để góp phần bước đầu làm sáng tỏ tính an toàn của chế phẩm KN-09, chúng tôi tiến hành đề tài “Nghiên cứu tính an toàn của chế phẩm KN-09 trên thực nghiệm” nhằm mục tiêu: *Xác định LD₅₀ theo đường uống và độc tính bán trường diễn của chế phẩm KN-09 trên thực nghiệm.*

NGUYÊN VẬT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên vật liệu và đối tượng nghiên cứu.

Cao đặc KN-09 do Học viện Quân y điều chế từ bài thuốc cổ phương “Ích khí thông minh thang”, đạt tiêu chuẩn cơ sở.

Chuột nhắt trắng (CNT) dòng Swiss trưởng thành, trọng lượng 18 - 22 g, gồm 96 con, dùng để nghiên cứu xác định độc tính cấp của cao đặc KN-09. 24 thỏ trưởng thành, trọng lượng 1,8 - 2,2 kg/con. Thỏ được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 8 con để nghiên cứu độc tính bán trường

diễn của cao đặc KN-09. Tất cả động vật thí nghiệm do Ban Chăn nuôi (Học viện Quân y) cung cấp, đủ tiêu chuẩn thí nghiệm.

Máy xét nghiệm sinh hoá tự động Chemix 180 (Sysmex). Máy xét nghiệm huyết học tự động XE2100, hãng Sysmex. Cân phân tích 10⁻⁴, model CP224S (Sartorius, Đức). Bộ dụng cụ mổ động vật cỡ nhỏ.

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Nghiên cứu độc tính cấp của cao đặc KN-09:*

Dựa theo phương pháp nghiên cứu xác định độc tính cấp của Abraham W.B. và quy định của Bộ Y tế Việt Nam về nghiên cứu độc tính của thuốc y học cổ truyền [1, 2, 4].

Thí nghiệm được tiến hành trên CNT. Chuột để đói 12 giờ trước khi thí nghiệm, chia ngẫu nhiên thành 8 lô khác nhau, mỗi lô 12 con. Cho từng lô chuột uống cao đặc KN-09 với các mức liều tăng dần để xác định liều thấp nhất gây chết 100% số chuột và liều cao nhất không gây chết chuột. Chuột được nuôi dưỡng và theo dõi tình trạng chung trong suốt 7 ngày và xác định tỷ lệ chuột chết trong 72 giờ của từng lô chuột sau uống thuốc. Tính LD₅₀ của KN-09 theo phương pháp của Livschitz P.Z.

** Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao đặc KN-09:*

Theo phương pháp Abraham, quy định của Bộ Y tế Việt Nam về hiệu lực và an toàn thuốc y học cổ truyền [1, 2].

* *Thiết kế thí nghiệm:* thỏ chia thành 3 lô, mỗi lô 8 con. Lô chứng, gồm 8 con cho uống dung dịch natri clorid 0,9%, liều 3 ml/kg/ngày, liên tục trong 42 ngày. Lô thử liều 1, gồm 8 con thỏ, cho uống cao đặc KN-09 liều 1,0 g/kg/ngày, liên tục trong 42 ngày. Lô thử liều 2, gồm 8 con thỏ, cho uống cao đặc KN-09 liều 2,0 g/kg/ngày, liên tục trong 42 ngày.

* *Các chỉ tiêu đánh giá:* theo dõi tình trạng chung, hoạt động, ăn uống, đặc biệt là trọng lượng cơ thể, điện tim, huyết học: hồng cầu, hemoglobin, bạch cầu, tiểu cầu. Sinh hóa: AST, ALT, ure, creatinin. Mô bệnh học: vào ngày thứ 42, giết thỏ, quan sát hình ảnh đại thể và làm mô bệnh học của các tạng gan, lách và thận.

Thời điểm xét nghiệm: xuất phát điểm (T_0), sau 3 tuần (T_3) và sau 6 tuần (T_6) nghiên cứu.

* *Phương pháp xử lý số liệu:* xử lý số liệu theo phương pháp thống kê thường dùng trong sinh y dược học, sử dụng phần mềm Statview 5.1.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Độc tính cấp của cao đặc KN-09 theo đường uống.

CNT được chia thành 8 lô. Cho từng lô chuột uống cao đặc KN-09 với các mức liều tăng dần từ 5 g/kg đến 22,5 g/kg (tính theo dược liệu khô tuyệt đối). Theo dõi tình trạng chuột, tỷ lệ sống và chết ở mỗi lô trong thời gian 72 giờ sau uống thuốc.

2. Độc tính bán trường diễn của cao đặc KN-09.

* *Ảnh hưởng của cao đặc KN-09 đến sự phát triển trọng lượng thỏ:*

Bảng 1: Độc tính cấp của cao đặc KN-09 theo đường uống.

STT	LIỀU SỬ DỤNG (g/kg thể trọng)	n	SỐ LƯỢNG ĐỘNG VẬT CHẾT (sau 72 giờ)	SỐ LƯỢNG ĐỘNG VẬT SỐNG (sau 72 giờ)
Lô 1	5,00	12	0	12
Lô 2	7,50	12	0	12
Lô 3	10,00	12	0	12
Lô 4	12,50	12	0	12
Lô 5	15,00	12	0	12
Lô 6	17,50	12	0	12
Lô 7	20,00	12	0	12
Lô 8	22,50	12	0	12

Sau uống cao đặc KN-09 đến mức liều cao nhất có thể, tất cả chuột thí nghiệm ở các lô đều ăn uống đi lại, hoạt động bình thường. Ở những lô uống liều cao, sau khi uống 1 - 3 giờ, chuột có biểu hiện mệt mỏi, nằm chụm lại một chỗ ở góc chuồng, nhưng sau 72 giờ, chuột đã hoạt động trở lại bình thường. Phân và nước tiểu không có gì bất thường. Theo dõi sau 72 giờ, không có chuột thí nghiệm bị chết. Mức liều KN-09 cao nhất có thể đưa vào dạ dày chuột là 22,5 g/kg. Do vậy, chưa tìm thấy LD_{50} của cao đặc KN-09 trên CNT theo đường uống.

Bảng 2: Ảnh hưởng của KN-09 đối với trọng lượng thỏ.

THỜI ĐIỂM XÉT NGHIỆM	TRỌNG LƯỢNG THỎ (kg)	LÔ NGHIỆN CỨU (n = 8)			p
		Chứng (a)	KN-09 liều 1 (b)	KN-09 liều 2 (c)	
T ₀	N	8	8	8	p _{b-a} > 0,05 p _{c-b} > 0,05 p _{c-a} > 0,05
	$\bar{X}$	1,99	1,98	1,96	
	SD	0,13	0,12	0,10	
T ₃	N	8	8	8	p _{b-a} > 0,05 p _{c-b} > 0,05 p _{c-a} > 0,05
	$\bar{X}$	2,25	2,23	2,24	
	SD	0,11	0,09	0,09	
T ₆	N	8	8	8	p _{b-a} > 0,05 p _{c-b} > 0,05 p _{c-a} > 0,05
	$\bar{X}$	2,54	2,50	2,47	
	SD	0,20	0,18	0,10	
p		p ₃₋₀ < 0,05; p ₆₋₀ < 0,05; p ₆₋₃ < 0,05			

Trọng lượng của thỏ ở hai lô uống cao đặc KN-09 với lô chứng sinh học tại các thời điểm thay đổi không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. So sánh giữa các thời điểm thấy: trọng lượng thỏ của 3 lô tăng, sự thay đổi có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

** Ảnh hưởng của cao đặc KN-09 đến điện tim của thỏ:*

Bảng 3: Ảnh hưởng của cao đặc KN-09 đối với điện tim thỏ (n = 8).

CHỈ TIÊU NGHIÊN CỨU	THỜI ĐIỂM XÉT NGHIỆM	LÔ NGHIỆN CỨU (n = 8)			p
		Chứng (a)	KN-09 liều 1 (b)	KN-09 liều 2 (c)	
Tần số tim (chu kỳ/ phút)	T ₀	244,88 ± 32,75	232,00 ± 20,89	248,00 ± 26,14	p _{b-a} > 0,05
	T ₃	241,50 ± 30,19	243,00 ± 29,55	251,50 ± 32,16	p _{c-b} > 0,05
	T ₆	240,00 ± 26,45	244,75 ± 30,41	251,75 ± 31,70	p _{c-a} > 0,05

(1)		(2)			(3)
p		$p_{3-0} > 0,05$; $p_{6-2} > 0,05$; $p_{6-0} > 0,05$			
Biên độ QRS (mV)	T ₀	0,381 ± 0,063	0,393 ± 0,033	0,367 ± 0,074	$p_{b-a} > 0,05$
	T ₃	0,385 ± 0,024	0,394 ± 0,037	0,376 ± 0,067	$p_{c-b} > 0,05$
	T ₆	0,383 ± 0,044	0,391 ± 0,054	0,386 ± 0,076	$p_{c-a} > 0,05$
p		$p_{3-0} > 0,05$; $p_{6-0} > 0,05$; $p_{6-3} > 0,05$			
Sóng bất thường		Không có			

So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm và giữa các lô ở cùng một thời điểm thấy: tần số và biên độ của điện tim thỏ thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Không có sóng bất thường trên điện tim của thỏ tại các thời điểm nghiên cứu.

* Ảnh hưởng đến một số chỉ tiêu về huyết học của thỏ:

Bảng 4: Ảnh hưởng của cao đặc KN-09 đến một số chỉ tiêu về huyết học của thỏ.

CHỈ TIÊU NGHIÊN CỨU	THỜI ĐIỂM XÉT NGHIỆM	LÔ NGHIÊN CỨU (n = 8)			
		Chứng (a)	KN-09 liều 1 (b)	KN-09 liều 2 (c)	
Hồng cầu (T/l)	T ₀	5,92 ± 1,01	5,70 ± 0,97	5,86 ± 1,07	$p_{b-a} > 0,05$
	T ₃	5,81 ± 1,01	5,62 ± 1,24	5,74 ± 1,35	$p_{c-b} > 0,05$
	T ₆	5,79 ± 1,03	5,66 ± 1,01	5,98 ± 1,10	$p_{c-a} > 0,05$
p		$p_{3-0} > 0,05$; $p_{6-0} > 0,05$; $p_{6-3} > 0,05$			
Huyết sắc tố (g/l)	T ₀	114,88 ± 11,97	131,13 ± 18,83	117,3 ± 15,29	$p_{b-a} > 0,05$
	T ₃	113,38 ± 10,23	119,88 ± 17,03	115,38 ± 13,38	$p_{c-b} > 0,05$
	T ₆	125,68 ± 18,23	124,63 ± 18,70	122,25 ± 19,52	$p_{c-a} > 0,05$
p		$p_{3-0} > 0,05$; $p_{6-0} > 0,05$; $p_{6-3} > 0,05$			
Bạch cầu (G/l)	T ₀	5,23 ± 1,11	4,93 ± 0,96	5,37 ± 1,43	$p_{b-a} > 0,05$
	T ₃	5,15 ± 1,22	5,52 ± 1,28	5,28 ± 1,59	$p_{c-b} > 0,05$
	T ₆	4,87 ± 1,02	4,94 ± 1,04	4,90 ± 1,46	$p_{c-a} > 0,05$
p		$p_{3-0} > 0,05$; $p_{6-0} > 0,05$; $p_{6-3} > 0,05$			
Tiểu cầu (G/l)	T ₀	274,25 ± 55,86	311,75 ± 80,75	321,25 ± 61,40	$p_{b-a} > 0,05$
	T ₃	290,63 ± 79,08	300,00 ± 49,43	297,13 ± 78,83	$p_{c-b} > 0,05$
	T ₆	287,38 ± 51,41	313,63 ± 50,23	323,38 ± 74,64	$p_{c-a} > 0,05$
p		$p_{3-0} > 0,05$; $p_{6-0} > 0,05$; $p_{6-3} > 0,05$			

So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm và giữa các lô ở cùng một thời điểm, số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, số lượng bạch cầu và tiểu cầu thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng đối với chức năng gan, thận thử nghiệm:*

Bảng 5: Hoạt độ enzyme AST và ALT của các lô thử nghiệm cứu.

CHỈ TIÊU NGHIÊN CỨU	THỜI ĐIỂM XÉT NGHIỆM	LÔ NGHIÊN CỨU (n = 8)			p
		Chứng (a)	KN-09 liều 1 (b)	KN-09 liều 2 (c)	
AST (U/l)	T ₀	59,26 ± 21,32	63,54 ± 21,44	64,84 ± 10,03	p _{b-a} > 0,05
	T ₃	57,98 ± 20,54	63,15 ± 20,41	66,31 ± 19,24	p _{c-b} > 0,05
	T ₆	57,41 ± 20,96	65,33 ± 20,59	55,84 ± 19,76	p _{c-a} > 0,05
p		p ₃₋₀ > 0,05; p ₆₋₀ > 0,05; p ₆₋₃ > 0,05			
ALT (U/l)	T ₀	114,13 ± 19,27	115,75 ± 20,80	123,75 ± 19,65	p _{b-a} > 0,05
	T ₃	117,13 ± 21,63	110,63 ± 14,16	115,25 ± 19,27	p _{c-b} > 0,05
	T ₆	124,13 ± 17,77	108,75 ± 17,51	124,25 ± 23,01	p _{c-a} > 0,05
p		p ₃₋₀ > 0,05; p ₆₋₀ > 0,05; p ₆₋₃ > 0,05			

So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm và giữa các lô ở cùng một thời điểm, hoạt độ enzyme AST và ALT thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 6: Hàm lượng creatinin (mmol/l) máu thử ở các lô nghiên cứu.

CHỈ TIÊU NGHIÊN CỨU	THỜI ĐIỂM XÉT NGHIỆM	LÔ NGHIÊN CỨU (n = 8)			p
		Chứng (a)	KN-09 liều 1 (b)	KN-09 liều 2 (c)	
Creatinin (μmol/l)	T ₀	59,57 ± 14,36	55,88 ± 18,33	57,25 ± 14,36	p _{b-a} > 0,05
	T ₃	50,63 ± 9,47	51,00 ± 11,53	54,63 ± 15,64	p _{c-b} > 0,05
	T ₆	50,50 ± 11,86	57,25 ± 13,21	58,25 ± 13,97	p _{c-a} > 0,05
p		p ₃₋₀ > 0,05; p ₆₋₀ > 0,05; p ₆₋₃ > 0,05			
Ure (mmol/l)	T ₀	3,87 ± 1,20	4,11 ± 1,34	3,56 ± 1,13	p _{b-a} > 0,05
	T ₃	3,81 ± 1,47	3,95 ± 1,18	4,36 ± 1,33	p _{c-b} > 0,05
	T ₆	3,76 ± 1,51	4,13 ± 1,26	3,75 ± 0,99	p _{c-a} > 0,05
p		p ₃₋₀ > 0,05; p ₆₋₀ > 0,05; p ₆₋₃ > 0,05			

So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm và so sánh giữa các lô ở cùng một thời điểm thấy: hàm lượng creatinin và ure máu thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

** Mô bệnh học gan, thận và lách của thỏ thí nghiệm:*

Kết thúc đợt nghiên cứu, gây mê thỏ bằng ketamin, sau đó phẫu tích bóc tách cơ quan gan, lách và thận. Quan sát và so sánh đại thể thấy: màu sắc, hình thái của gan, lách và thận ở hai lô uống cao đặc KN-09 không khác so với lô chứng. Hình ảnh mô bệnh học của các tạng gan, lách và thận của lô nghiên cứu không có sự thay đổi bất thường. Như vậy, cao đặc KN-09 dùng đường uống liên tục trong 42 ngày đã không gây tổn thương trên gan, thận, lách của thỏ.

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu về tính an toàn của chế phẩm KN-09, chúng tôi rút ra kết luận sau: chế phẩm KN-09 có độ an toàn cao khi sử dụng dài ngày trên thực nghiệm.

- Độc tính cấp: chưa xác định được liều LD_{50} của cao đặc KN-09 theo đường uống trên thực nghiệm, mặc dù đã cho động vật uống với mức liều cao nhất có thể đưa vào dạ dày (22,5 g /kg thể trọng).

- Độc tính bán trường diễn: uống cao đặc KN-09 ở mức liều 1,0 và 2,0 g/kg thể trọng mỗi ngày, uống liên tục trong 42 ngày đã không ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường của thỏ. Không ảnh hưởng đến chức năng gan, thận và các chỉ số huyết học ở máu ngoại vi của động vật thực nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Abrham W.B.* Techniques of animal and clinical toxicology. Med. Pub. Chicago. 1978, pp.55-68.
2. *Bộ Y tế.* Quy định về nghiên cứu dược lý các thuốc y học cổ truyền dân tộc. Quyết định 371/QĐ-BYT.
3. *Đỗ Tất Lợi.* Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Y học. 2005.
4. *Đỗ Trung Đàm.* Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc. NXB Y học. Hà Nội. 1996.
5. *Võ Văn Chi.* Từ điển cây thuốc Việt Nam. NXB Y học. Hà Nội. 1997.