

NGHIÊN CỨU TÍNH KÍCH ỨNG TRỰC TRÀNG CỦA CAO LỎNG PH TRÊN THỎ THỰC NGHIỆM

Nguyễn Xuân Huân¹, Nguyễn Đình Nhân¹,
Lê Thị Giang¹, Nguyễn Quang Duật²

¹Viện Y học cổ truyền Quân đội,

²Học viện Quân y

Tóm tắt

Mục tiêu: Khảo sát tính kích ứng trực tràng của cao lỏng PH trên thỏ thực nghiệm. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Cao lỏng PH được sản xuất và cung cấp bởi Khoa Dược-Viện Y học cổ truyền Quân đội. Nghiên cứu phòng thí nghiệm, thiết kế nghiên cứu cắt ngang và thực nghiệm trên thỏ chủng Newzeland White, có đối chứng theo ISO 10993-23:2021 về phương pháp đánh giá tính kích ứng trực tràng. **Kết quả:** Chỉ số kích ứng trực tràng của cao lỏng PH tương ứng mức không gây kích ứng. **Kết luận:** Cao lỏng PH không gây kích ứng trực tràng theo tiêu chuẩn ISO 10993-23:2021.

Từ khóa: Cao lỏng PH, kích ứng trực tràng, thực nghiệm.

RESEARCH ON RECTAL IRRITATION OF PH LIQUID EXTRACT ON EXPERIMENTAL RABBITS

Abstract:

Background: To examine the property of rectal irritation of PH extract on experimental rabbit. **Materials and method:** PH extract is manufactured and supplied by Vietnam Military Institute of Traditional Medicine. Laboratory research, cross-sectional and experimental design in controlled Newzeland White rabbits. **Results:** About rectal irritation, the irritant point of PH extract corresponding to none rectal irritation. **Conclusion:** PH extract is perfectly satisfactory in terms of rectal irritation standards as stipulated by the ISO 10993-23:2021.

Key words: PH extract, rectal irritation, experimental.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm loét đại trực tràng chảy máu (VLĐTTTCM), hay còn gọi là viêm loét đại tràng (Ulcerative colitis, UC), viêm loét đại tràng không đặc hiệu, là bệnh mạn tính, kéo dài, hay tái phát, tổn thương niêm mạc và lớp dưới niêm mạc, vị

trí chủ yếu ở trực tràng và đại tràng sigma, giảm dần cho đến đại tràng phải, gây viêm, loét và chảy máu đại trực tràng. Bệnh có nhiều biến chứng và có tỷ lệ tử vong cao. Đây là một trong những bệnh mà y học hiện đại đang gặp nhiều khó khăn, hạn chế trong điều trị.[1]

* Ngày nhận bài: 02/08/2024

* Ngày phản biện: 12/08/2024

* Ngày phê duyệt đăng bài: 24/08/2024

Theo y văn và thực tiễn lâm sàng từ trước đến nay cho thấy, y học cổ truyền đã và đang sử dụng nhiều phương pháp điều trị khác nhau đối với các chứng bệnh này như: thuốc thang, châm cứu, bấm huyệt, thuốc thụt giữ đại tràng, theo biện chứng luận trị hay kinh nghiệm đều thu được những kết quả nhất định. Trong đó, dùng thuốc thụt giữ đại trực tràng là một phương pháp được sử dụng phổ biến hơn cả vì tính ưu việt như thuốc có thể phát huy tác dụng trực tiếp lên tổn thương, tránh được cảm giác khó uống như thuốc thang, và cũng không ảnh hưởng trực tiếp đến dạ dày, giảm những ảnh hưởng không mong muốn tới chức năng gan, chức năng thận.

Cao lỏng PH là một chế phẩm thuốc Y học cổ truyền, sản xuất theo phương pháp chiết nước, dùng thụt giữ trực tràng và đã được nghiên cứu có tác dụng hỗ trợ điều trị viêm loét đại trực tràng chảy máu trên thực nghiệm. Để đánh giá mức độ kích ứng trực tràng của cao lỏng PH thông qua quan sát các biến đổi đại thể, vi thể của trực tràng trên thỏ thực nghiệm (theo tiêu chuẩn ISO 10993-23:2021) và làm căn cứ tiến hành đánh giá tác dụng trên lâm sàng, chúng tôi tiến hành đề tài “Nghiên cứu tính kích ứng trực tràng của cao lỏng PH trên thỏ thực nghiệm”.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Chế phẩm và hóa chất nghiên cứu

2.1.1.1. Chế phẩm nghiên cứu:

Cao lỏng PH được sản xuất tại khoa Dược-Viện Y học cổ truyền Quân đội bằng phương pháp chiết nước, tỉ lệ 1:1, đóng lọ 100mL/lọ. Thành phần: Cỏ nhọ nồi sao 50g, Tam thất sao 3g, Vỏ núc nác 25g, Chè dây 12g, Hòe hoa sao 10g, nước cất vừa đủ 100ml. Các vị dược liệu được kiểm nghiệm đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V, chế phẩm đạt tiêu chuẩn cơ sở.

2.1.1.2. Hóa chất, dụng cụ phục vụ nghiên cứu

Sonde mềm thụt trực tràng đầu tù, cỡ 14, dài 6cm, xy lanh 5 mL, gạc vô khuẩn, băng y tế, kính lúp, dung dịch NaCl 0,9%.

2.1.2. Động vật thực nghiệm

Nghiên cứu tiến hành trên thỏ chủng Newzeland White, không phân biệt giới tính, trọng lượng mỗi con từ 1,8 - 2,2kg. Số lượng 06 con.

Thỏ thực nghiệm được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm tại Khoa Nghiên cứu thực nghiệm trong 07 ngày trước khi tiến hành nghiên cứu.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu tiến hành tại Khoa nghiên cứu thực nghiệm (C15)-Viện Y học cổ truyền Quân đội. Thời gian nghiên cứu từ tháng 5/2024 đến tháng 6/2024.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu thử nghiệm kích ứng trên trực tràng được áp dụng theo tiêu chuẩn ISO 10993-23: 2021 đối với các thuốc nghiên cứu tiếp xúc với trực tràng.

Chế phẩm nghiên cứu: Cao lỏng PH, liều lượng sử dụng là 1,0ml cho mỗi trực tràng của thỏ.

2.3.1.1. Quy trình nghiên cứu

- Thỏ được nuôi trong lồng và cho ăn riêng, giữ ở nhiệt độ phòng trong vòng 1 tuần.

- 06 thỏ chia đều thành 02 lô dùng thuốc nghiên cứu và lô đối chứng, mỗi lô 03 thỏ.

- Kiểm tra sự tiết dịch trực tràng, sưng tấy hậu môn và/hoặc các dấu hiệu bất thường trước khi thực nghiệm.

- Gắn sonde trực tràng với xylanh để bơm cao lỏng PH hoặc NaCl 0,9%. Ống thông được làm ẩm bằng dung dịch NaCl 0,9% trước khi luồn vào trực tràng thỏ.

- Giữ chặt động vật bằng dụng cụ cố định hoặc bằng tay và cố định

chân sau để lộ phần hậu môn trực tràng. Nắm chặt và nâng đuôi thỏ lên để lộ đáy chậu. Nhẹ nhàng đưa ống thông đã được làm ẩm vào sâu trong trực tràng và đẩy xylanh cho toàn bộ liều 1 ml cao lỏng PH và dung dịch NaCl 0,9% vào trực tràng ở mỗi lô. Sau đó rút ống thông và vệ sinh sạch.

- Lặp lại quy trình trên với khoảng thời gian (24h) mỗi ngày trong 05 ngày liên tiếp.

- Quan sát: Ở thời điểm 24h sau lần áp dụng ban đầu và ngay trước mỗi lần điều trị, ghi lại các dấu hiệu chảy mủ, tiết dịch, ban đỏ và kích ứng ở hậu môn.

2.3.1.2. Đánh giá kết quả

- Đánh giá đại thể: Ở thời điểm 24h sau liều cuối cùng, mổ động vật. Bóc tách toàn bộ trực tràng, mở theo chiều dọc và kiểm tra các dấu hiệu kích ứng, tổn thương lớp biểu mô và hoại tử.

- So sánh trực tràng của thỏ thử nghiệm với trực tràng của thỏ đối chứng.

- Cố định đoạn trực tràng thỏ vào dung dịch Formol 10% để làm mô học.

- Đánh giá mô bệnh học: Chuyên gia giải phẫu bệnh đọc kết quả vi thể đánh giá bằng thang điểm sau đây:

Bảng 1. Hệ thống chấm điểm để kiểm tra bằng kính hiển vi cho trực tràng

Phản ứng	Điểm đánh giá
Biểu mô	
Bình thường, nguyên vẹn	0
Tế bào bị thoái hóa	1
Dị sản	2
Có ổ bào mòn	3
Bào mòn toàn thể	4
Thâm nhập bạch cầu	
- Không có	0
- Rất ít (tối thiểu <25)	1
- Nhẹ (25-50)	2
- Trung bình (50-100)	3
- Nhiều (đáng kể) (>100)	4
Tắc nghẽn mạch máu	
- Không có	0
- Rất ít	1
- Nhẹ	2
- Vừa	3
- Nhiều (có vỡ mạch máu)	4
Phù nề	
- Không phù nề	0
- Rất ít	1
- Nhẹ	2
- Vừa	3
- Phù nề nghiêm trọng.	4

Tính tổng điểm đánh giá bằng vi thể với tất cả các động vật trong nhóm thử nghiệm và chia tổng cho số lần quan sát để lấy điểm trung bình của nhóm thử nghiệm. Điểm tối đa là 16. Lập lại phương

pháp đánh giá với nhóm đối chứng. Lấy giá trị trung bình của nhóm thử trừ đi giá trị trung bình của nhóm chứng thì ra chỉ số kích ứng tương ứng ở bảng dưới.

Bảng 2. Bảng điểm đánh giá kích ứng trực tràng

Điểm trung bình	Loại phản ứng
0	Không kích ứng
1 - 4	Kích ứng không đáng kể
5 - 8	Kích ứng nhẹ
9 - 11	Kích ứng vừa phải
12 - 16	Kích ứng nghiêm trọng

2.3.4. Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê y sinh học bằng phần mềm Excel 2010. Số liệu được biểu diễn dưới dạng trung vị (cực tiểu-cực đại).

III. KẾT QUẢ

3.1. Đánh giá đại thể

Trong suốt quá trình nghiên cứu và tại thời điểm 24h sau liệu cuối cùng, tất cả thỏ nghiên cứu đều sống, ăn uống bình thường không

có các biểu hiện như mệt mỏi, chướng bụng, đi ngoài hoặc sung tẩy hậu môn và dịch tiết bất thường.

Tại thời điểm 24h sau liệu cuối cùng, tiến hành mổ tất cả 6 thỏ, sau đó bóc tách toàn bộ trực tràng, mở theo chiều dọc và kiểm tra, quan sát bằng mắt thường và kính lúp, ở lô chứng và lô dùng cao lỏng PH đều không phát hiện các dấu hiệu kích ứng, tổn thương lớp biểu mô và hoại tử.



Thỏ số 03 - Lô chứng



Thỏ số 06 - Lô cao lỏng PH

Hình 1. Hình ảnh đại thể trực tràng của thỏ nghiên cứu.

Nhận xét: Hình ảnh bề mặt trực tràng có lớp niêm mạc mỏng, bề mặt tương đối trơn nhẵn, không có nếp gấp lồi lõm, màu trắng hồng. Không phát hiện khác biệt giữa hai lô thỏ.

3.2. Đánh giá vi thể

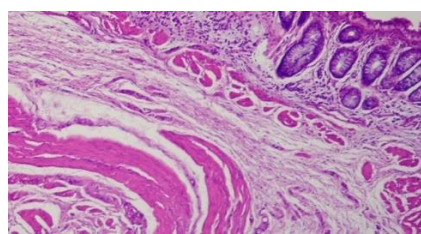
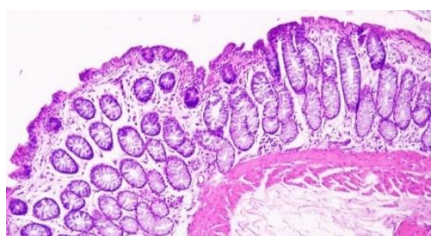
Chuyên gia giải phẫu bệnh đọc kết quả vi thể đánh giá bằng thang điểm và được tổng kết ở bảng dưới đây.

Bảng 3. Điểm kích ứng trực tràng trên thỏ nghiên cứu.

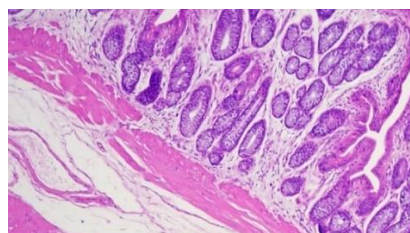
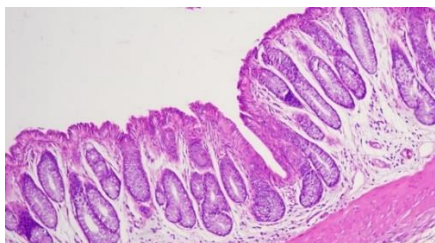
Lô	Thỏ số	Biểu mô	Thâm nhập Bạch cầu	Tắc nghẽn mạch máu	Phù nề	Tổng
Đối chứng	01	0	0	0	0	0
	02	0	1	0	0	1
	03	0	0	0	0	0
Cao lỏng PH	04	0	0	0	0	0
	05	0	0	0	0	0
	06	0	0	0	1	1

Nhận xét: Tại thời điểm kết thúc sau 5 ngày thực giữ liên tục, quan sát trực tràng của thử nghiệm cứu dưới kính hiển vi cho thấy: Niêm mạc trực tràng bình thường, còn rõ cấu trúc các lớp niêm mạc, hạ niêm mạc, cơ niêm, lớp cơ và thanh mạc. Các tuyến chế tiết được lót bởi các tế bào biểu mô có nhân đều, mịn. Chỉ có trực tràng của thử số 02-lô chứng có thâm nhiễm bạch

cầu ở mức độ rất ít và thử số 06-lô cao lỏng PH có phù nề rất nhẹ. Kết quả tổng điểm đánh giá trên vi thể trực tràng thử của cả lô thử cao lỏng PH và lô chứng thực giữ dung dịch NaCl 0,9% đều là 1 điểm. Như vậy, chỉ số kích ứng trực tràng của lô thử cao lỏng PH là 0 điểm, tương ứng với mức không gây kích ứng trực tràng theo tiêu chuẩn ISO 10993-23:2021.



Hình 2. Hình ảnh vi thể trực tràng thử số 06 - Lô cao lỏng PH (HE x 200)



Hình 3. Hình ảnh vi thể trực tràng thử số 03-Lô đối chứng (HE x 200)

IV. BÀN LUẬN

Cao lỏng PH là một chế phẩm thuốc Y học cổ truyền được bào chế từ bài thuốc kinh nghiệm với các thành phần chủ yếu gồm Cỏ nhọ nôi, Tam thất, Chè dây, Vỏ núc nác và Hòe hoa được phối ngũ cùng nhau phát huy tác dụng thanh nhiệt trừ thấp, lương huyết chỉ huyết, sáp trường chỉ tả. Chế phẩm này được chỉ định dùng theo phương pháp thực giữ đại tràng để hỗ trợ điều trị bệnh viêm loét đại trực tràng chảy máu, đây là một trong những phương pháp đã được sử dụng từ

lâu trong điều trị bệnh của Y học cổ truyền. Chương tạp chứng, sách Cảnh nhạ toàn thư cho rằng: đại trường ở vị trí xa nhất nên các thuốc uống rất khó tác dụng tới. Bệnh viêm loét đại trực tràng chảy máu có đặc điểm sinh lý bệnh đặc biệt là tổn thương bắt đầu từ trực tràng trở lên, có thể lan rộng toàn bộ niêm mạc đại tràng, trong đó tổn thương ở trực tràng và đại tràng sigma là thường gặp nhất. Vì vậy, liệu pháp thực giữ tại chỗ tương đối thích hợp đối trong điều trị tại chỗ đối với căn bệnh này. Việc sử dụng

thuốc điều trị tại chỗ thông qua đường trực tràng có thể giúp khắc phục được những vấn đề mà thuốc đường uống gặp phải như sự ảnh hưởng của axit, kiềm, các enzym trong đường tiêu hóa hay sự kích ứng của thuốc đối với dạ dày, cũng như tránh được cảm giác đắng, chất khó uống gặp phải khi uống thuốc YHCT. Thông qua thụt giữ giúp thuốc tác dụng trực tiếp vị trí tổn thương tại đại trực tràng, gia tăng sự hấp thu và độ sinh khả dụng của thuốc, nâng cao tác dụng, giảm phản ứng viêm của đại tràng. [2]

Theo phân loại, thụt giữ đại tràng thuộc phương pháp ngoại trị theo Y học cổ truyền, dung dịch cao lỏng PH sẽ được lưu giữ và tiếp xúc trực tiếp với niêm mạc trực tràng trong khoảng thời gian nhất định, vì vậy cần thiết phải tiến hành thử nghiệm đánh giá độc tính tại chỗ về tính kích ứng trực tràng theo quy định của Bộ Y tế Việt Nam cũng như quốc tế.[3],[4] Tiêu chuẩn ISO 10993-23:2021, do Tổ chức Tiêu chuẩn Quốc tế (ISO) phát triển, là phần được xuất bản vào năm 2021, cung cấp quy trình thử nghiệm để đánh giá về khả năng gây kích ứng của các chế phẩm y tế. Tiêu chuẩn này liên quan đến tất cả các chế phẩm y tế tiếp xúc trực tiếp hoặc gián tiếp, bất kể bản chất và thời gian tiếp xúc với cơ thể. Thông qua các thử nghiệm để xem xét các nguy cơ tiếp xúc gây kích ứng tiềm ẩn. Một số chế phẩm y tế được thử nghiệm được phát hiện có khả năng gây kích ứng da hoặc niêm mạc. Về mặt này, các nhà sản xuất có nghĩa

vụ đánh giá về tác động tiêu cực khi nó tiếp xúc với mô người trước khi đưa ra thị trường. Tính kích ứng trực tràng là một thành phần thiết yếu trong các đánh giá ban đầu đối với một chế phẩm dùng theo đường trực tràng. [5]

Đối chiếu theo yêu cầu của tiêu chuẩn ISO 10993-23:2021 quy định, chế phẩm cao lỏng PH có độ kiềm toan là 5,2 nằm trong giới hạn (2-11,5) đảm bảo yêu cầu tiến hành thử nghiệm kích ứng trực tràng. Áp dụng quy trình thử nghiệm về đánh giá tính kích ứng trực tràng, nghiên cứu này lựa chọn tiến hành trên đối tượng là thỏ chủng Newzeland White với số lượng là 03 thỏ cho mỗi lô. Thỏ là động vật rất nhạy cảm với các yếu tố ngoại cảnh, đặc biệt là đường tiêu hóa, chỉ cần thức ăn không vệ sinh hoặc không phù hợp rất dễ dẫn đến tình trạng rối loạn tiêu hóa như chướng bụng đầy hơi hoặc ỉa chảy và thỏ có thể bị chết, chính vì vậy chúng rất thích hợp đối với các thử nghiệm này để cung cấp cho chúng ta thông tin về tính kích ứng có thể có của chế phẩm y tế được thử nghiệm. Về liều lượng dung dịch thụt trực tràng đối với thỏ trong nghiên cứu này được căn cứ theo khuyến cáo của tiêu chuẩn ISO 10993-23:2021 và tác giả Đỗ Trung Đàm là 1mL/trực tràng/lần, với lượng dung dịch này là phù hợp để lưu giữ trong trực tràng thỏ một thời gian mà không gây ra phản ứng bài tiết ngay tức thì, giúp tạo điều kiện cho các dung dịch nghiên cứu tiếp xúc trực tiếp với bề mặt niêm mạc trực tràng, nhờ đó có thể đánh giá được các phản

ứng của trực tràng đối với dung dịch nghiên cứu. [5], [6]

Kết quả nghiên cứu này cho thấy, trong suốt quá trình nghiên cứu cả hai lô thử đều không có các biểu hiện bất thường, hậu môn không sưng nề, không có dịch tiết bất tất cả các thử đều sống sau khi kết thúc 5 ngày liên tục thụt giữ trực tràng. Thông qua quan sát đánh giá đại thể trực tràng của thử cho thấy không có sự khác biệt rõ rệt giữa lô chứng thụt giữ dung dịch nước muối đẳng trương và lô thử thụt giữ cao lỏng PH. Đánh giá trên vi thể, chỉ số kích ứng trực tràng của lô thử thụt giữ cao lỏng PH là 0 điểm, tương ứng với mức không gây kích ứng trực tràng. Lô chứng có 01 thử có thâm nhiễm bạch cầu mức độ rất ít và lô thử cao lỏng PH có 01 trực tràng thử có biểu hiện phù nề rất ít, đây có thể liên quan đến ảnh hưởng của sonde thụt tiếp xúc trực tràng, đặc biệt là khi thực hiện trên động vật thực nghiệm là thử - một loài động vật rất nhạy cảm.

V. KẾT LUẬN

Qua quá trình đánh giá tính kích ứng trực tràng của cao lỏng PH trên thử thực nghiệm theo phương pháp đánh giá tính kích ứng trực tràng tiêu chuẩn ISO 10993-23:2021, chúng tôi rút ra được các kết luận sau:

- Không phát hiện các dấu hiệu kích ứng, tổn thương lớp biểu mô và hoại tử trên đại thể trực tràng của thử nghiên cứu được thụt giữ cao lỏng PH liên tục trong 05 ngày với liều lượng 1mL/trực tràng thử.

- Chỉ số kích ứng trực tràng của lô thử thụt giữ cao lỏng PH khi

đánh giá trên vi thể là 0 điểm, tương ứng với mức không gây kích ứng trực tràng.

Như vậy, cao lỏng PH được nghiên cứu không gây kích ứng trên thử thực nghiệm, có thể định hướng tiếp tục nghiên cứu sử dụng an toàn trên lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Charles N. Bernstein, Michael Fried, J. H. Krabshuis và cs (2010), World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of IBD in 2010, Inflammatory Bowel Diseases, 16 (1):112-124.

2. 吴笑,夏俊东,方珂 (2021), 溃疡性结肠炎中西医结合治疗临床研究进展[J]. 中西医结合研究, 13(02): 118-121.

Ngô Tiêu, Hạ Tuấn Đông, Phương Khả (2021), “Nghiên cứu lâm sàng đông Tây y điều trị viêm loét đại trực tràng”. *Đông Tây y kết hợp nghiên cứu*, 13 (02): 118-121

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

4. OECD (2002), “Guideline for testing of chemicals: Acute Dermal Irritation/Corrosion”, *OECD* 404.

5. ISO 10933-23 (2021), Rectal mucosa irritation test, Biological evaluation of medical devices - Part 23: Test for irritation, p.46-48.

6. Đỗ Trung Đàm (2014), Phương pháp xác định độc tính của thuốc, NXB Y học, Hà Nội, p20-22.