

KH&CN TP. Hồ Chí Minh đã cấp kinh phí cho đề tài "Nghiên cứu thành phần cấu tạo, tiêu chuẩn và tác dụng tiền lâm sàng cao xương Cá sấu hoa cà ứng dụng trong điều trị bệnh tạo xương bất toàn (*Osteogenesis imperfecta*)" mà bài báo này là một phần kết quả.

Tài liệu tham khảo

1. Hà Quang Thanh, Trần Minh Thông, Nguyễn Thị Thu Hương (2015), Khảo sát mô học xương đùi chuột nhắt trắng trong mô hình gây loãng xương bằng corticoid. Kỷ yếu Hội thảo khoa học Đào tạo và Nghiên cứu khoa học ở đồng bằng sông Cửu Long-Hội nhập và phát triển bền vững, Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, trang 130-138, 2015. 2. Trần Thị Minh Tâm, Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Minh Đức (2015), Nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch của cao xương Cá sấu hoa cà, *Tạp chí Dược liệu*, 20(2), 121-126. 3. Canalis E. (2005), Mechanisms of glucocorticoid action in bone, *Current Osteoporosis Reports*, 3(3), 98. 4. Jee W. S., Yao W. (2001), Overview: Animal models of osteopenia and osteoporosis. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 1(3), 193-207. 5. O'Brien C. A., Jia D., Plotkin L. I. (2004), Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength, *Endocrinology*, 145(4), 1835-1841. 6. Ronald Ruimerman (2005), Modeling and remodeling in bone tissue, *University Press Facilities, Eindhoven*. 7. Turner A. S. (2001), Animal models of osteoporosis – necessity and limitations, *European Cells & Materials*, 1, 66-81.

Tạp chí Dược liệu, tập 21, số 1+2/2016 (Trang 84 - 92)

ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG CẢI THIỆN CHỨNG TRẦM CẢM VÀ TÍNH AN TOÀN CỦA CAO CHIẾT TỪ CÂY BAN DI THỰC TRÊN THỰC NGHIỆM

Phạm Thị Nguyệt Hằng, Lê Thị Xoan, Nguyễn Thị Phượng,
Nguyễn Minh Khởi, Nguyễn Văn Tài
Viện Dược liệu*

*Email: pnhang2004@yahoo.com

(Nhận bài ngày 19 tháng 1 năm 2016)

Tóm tắt

Cây ban Âu hay cây cỏ Thánh John (St. John's Wort) có tên khoa học là *Hypericum perforatum* L., được phân bố Châu Âu, Tây Á và Bắc Phi. Đây là một trong những thuốc có nguồn gốc từ thực vật nổi tiếng để điều trị chứng bệnh tâm thần như lo âu, trầm cảm và được sử dụng như thuốc bổ thần kinh [5]. Cây ban Âu được di thực vào Việt Nam và trồng ở một số vùng cao như Sa Pa, Mai Châu, Mộc Châu. Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã chứng minh cao chiết ban di thực có tác dụng giải lo âu trên chuột bị stress do cô lập. Nghiên cứu này nhằm đánh giá tác dụng chống trầm cảm của cao chiết ban di thực trên chuột bị stress do cô lập và đánh giá độc tính cấp, bán trường diễn của cao chiết này. Kết quả đã chứng minh cao chiết ban Âu di thực (với liều 240 mg/ kg và 480 mg/ kg) có tác dụng chống trầm cảm thông qua thử nghiệm 3 buồng. Imipramin (10 mg/ kg) và Laif (1000 mg/ kg) được sử dụng làm mẫu đối chứng dương. Đã xác định được giá trị LD₅₀ của cao ban Âu thực là 22,12 g cao/ kg thể trọng chuột. Đồng thời cao ban di thực với liều 80 mg cao/ kg và 320 mg cao/ kg không gây các thay đổi có ý nghĩa thống kê đến thể trọng, chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận cũng như mô bệnh học gan so với nhóm chứng sinh lý.

Từ khóa: Ban di thực, Chống trầm cảm, Độc tính cấp và bán trường diễn.

Summary

Evaluation of the Antidepressant-like Effect and the Safety of Acclimatized *Hypericum perforatum* L.

Hypericum perforatum L., known as St. John's wort, is distributed in Europe, West Asia and North Africa. This plant is one of the leading psychotherapeutic phytomedicines for treatment of anxiety, depression, and used as nerve tonic. *Hypericum perforatum* L. was acclimatized in some uplands of Vietnam, such as Sa Pa, Mai Chau, Moc Chau... Our previous study showed that acclimatized *Hypericum perforatum* L. extract had anti-anxiety effect in social isolated mice. The aim of this study is to evaluate the antidepressant-like effect of acclimatized *Hypericum perforatum* L. in social isolated mice. The

ng bả
o này k
nhất này
g bằng nh
nh Tấn, k
sản học
ent Oatp
porosis, k
Chocan
L. Endorn
Presi In
tửu d. h

results showed that acclimatized *Hypericum perforatum* L. extract (at the doses of 240 and 480 mg/kg, p.o.) displayed antidepressant-like activity in social isolated mice using three-chamber paradigm test. LD₅₀ of acclimatized *Hypericum perforatum* L. extract in mice was 22.12 g/kg body weight for single dose oral administration. In the subchronic study, rabbits were administered acclimatized *Hypericum perforatum* L. extract with the doses of 80 mg/kg and 320 mg/kg (p.o) for 30 days. After 15, 30, and 45 days of experiment, blood and tissue samples were taken for determination of hematological, biochemical and histopathological parameters. All parameters in *Hypericum perforatum* L. extract groups were not significantly changed as compared to respective control.

Keywords: *Acclimatized Hypericum perforatum* L., *Anti-depressant, Acute and subchronic toxicity.*

1. Mở đầu

Trầm cảm (depression) là một trong những rối loạn tâm thần chiếm tỷ lệ cao nhất hiện nay trên thế giới. Theo Tổ chức Y tế Thế giới, bệnh trầm cảm cướp đi mỗi năm trung bình 850 000 mạng người. Theo số liệu của Viện Sức khỏe tâm thần Việt Nam, khoảng 3 - 6% dân số bị mắc bệnh trầm cảm.

Cây ban Âu hay cây cỏ Thánh John (St. John's Wort) có tên khoa học là *Hypericum perforatum* L. thuộc họ Ban (Hypericaceae). Cây có nguồn gốc tự nhiên ở Châu Âu, Tây Á, Bắc Phi và cũng phân bố rộng rãi ở Bắc Mỹ và Australia [9]. Ban Âu là cây thuốc cổ truyền của các nước Châu Âu và hiện là một cây thuốc nổi tiếng nhất trong điều trị trầm cảm trên thế giới. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh hypericin và hyperforin là những hoạt chất trong cây ban Âu đóng vai trò quan trọng trong việc điều trị bệnh trầm cảm [11, 13, 14].

Ở Việt Nam, Viện Dược liệu đã nghiên cứu di thực thành công cây ban *Hypericum perforatum* L. trong đề tài cấp Bộ Y tế "Nghiên cứu di thực và quy trình trồng trọt cây ban *Hypericum perforatum* L. để chiết xuất sản phẩm chứa hypericin" từ năm 2007 - 2011. Kết quả của đề tài cho thấy cây ban Âu di thực phù hợp với điều kiện khí hậu và đất đai của các vùng có khí hậu mát như Tam Đảo, Mai Châu, Mộc Châu, Sa Pa. Cây di thực có hàm lượng hoạt chất hypericin khá cao (> 0,1% trong khi tiêu chuẩn Dược điển châu Âu là 0,08% và tiêu chuẩn Mỹ USP 25 là 0,04%).

Với mục đích có thể nghiên cứu phát triển được sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh trầm cảm từ cây ban di thực, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành đánh giá tác dụng chống trầm cảm của cao chiết ban di thực giàu hypericin trồng tại Mai Châu, Hòa Bình và đánh giá độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của mẫu nghiên cứu này.

2. Đối tượng, nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cây ban di thực được ThS. Trần Danh Việt, Trung tâm Nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội - Viện Dược liệu cung cấp, được trồng tại Mộc Châu, Sơn La từ tháng 3/2014 đến tháng 8/2014. Điều chế cao chiết được thực hiện bởi Khoa Hóa Thực vật, Viện Dược liệu. Quy trình chiết tách cao ban di thực được mô tả tóm tắt như sau: phần trên mặt đất của cây ban di thực được thu hái vào thời điểm hoa nở khoảng 40 - 50%, được phơi và sấy khô ở 40 - 50°C đến khi đạt độ ẩm 9,54%. Lấy 1,6 kg dược liệu này xay nhỏ, chiết 3 lần bằng cồn 80% ở nhiệt độ 60°C có bổ sung vitamin C với tỷ lệ 0,1% so với dược liệu vào mỗi lần chiết để bảo quản. Dịch lọc của các lần chiết được gộp lại, cất loại dụng môi dưới áp suất giảm bằng máy cất quay ở nhiệt độ không quá 60°C rồi sấy trong tủ sấy chân không ở nhiệt độ 50°C để được cao khô. Liều cao chiết sử dụng trong nghiên cứu đánh giá tác dụng chống trầm cảm là 240 và 480 mg/kg được dựa theo những công trình nghiên cứu trên cận lâm sàng và lâm sàng đã công bố trên thế giới.

2.2. Hóa chất, thuốc thử nghiệm

Imipramin (Sigma - Aldrich, USA) được hòa tan bằng nước muối sinh lý để sử dụng theo đường tiêm phúc mạc (i.p.). Viên nén Laif[®] 900 (dạng cao chiết cồn 80% từ phần trên mặt đất của cây ban Âu, sản phẩm của công ty Seigerwald ProPhyto, Đức) và cao chiết ban Âu di thực được nghiên cứu trong cối và pha thành hỗn dịch để sử dụng theo đường uống (p.o.).

2.3. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt đực chủng *Swiss albino* 3 - 4 tuần tuổi, trọng lượng trung bình 16 - 18 g được cung cấp bởi Viện Vệ Sinh Dịch tễ Trung ương được dùng để đánh giá tác dụng chống trầm cảm.

Chuột nhất trắng chủng *Swiss albino* cả 2 giống, có trọng lượng 18 - 20 g được sử dụng để đánh giá độc tính cấp. Chuột được chăm sóc và nuôi trong phòng thí nghiệm với nhiệt độ duy trì $22 \pm 1^\circ\text{C}$, ăn uống đầy đủ, chu kỳ sáng tối là 12/12 h (chu kỳ sáng từ 7:00 - 19:00).

Thỏ trưởng thành, khỏe mạnh, cả 2 giống, trọng lượng từ 1,8 - 2,0 kg, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm được sử dụng trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn. Thỏ thí nghiệm được cung cấp bởi cơ sở Chăn nuôi và cung cấp động vật thí nghiệm - Đan Phượng - Hà Nội.

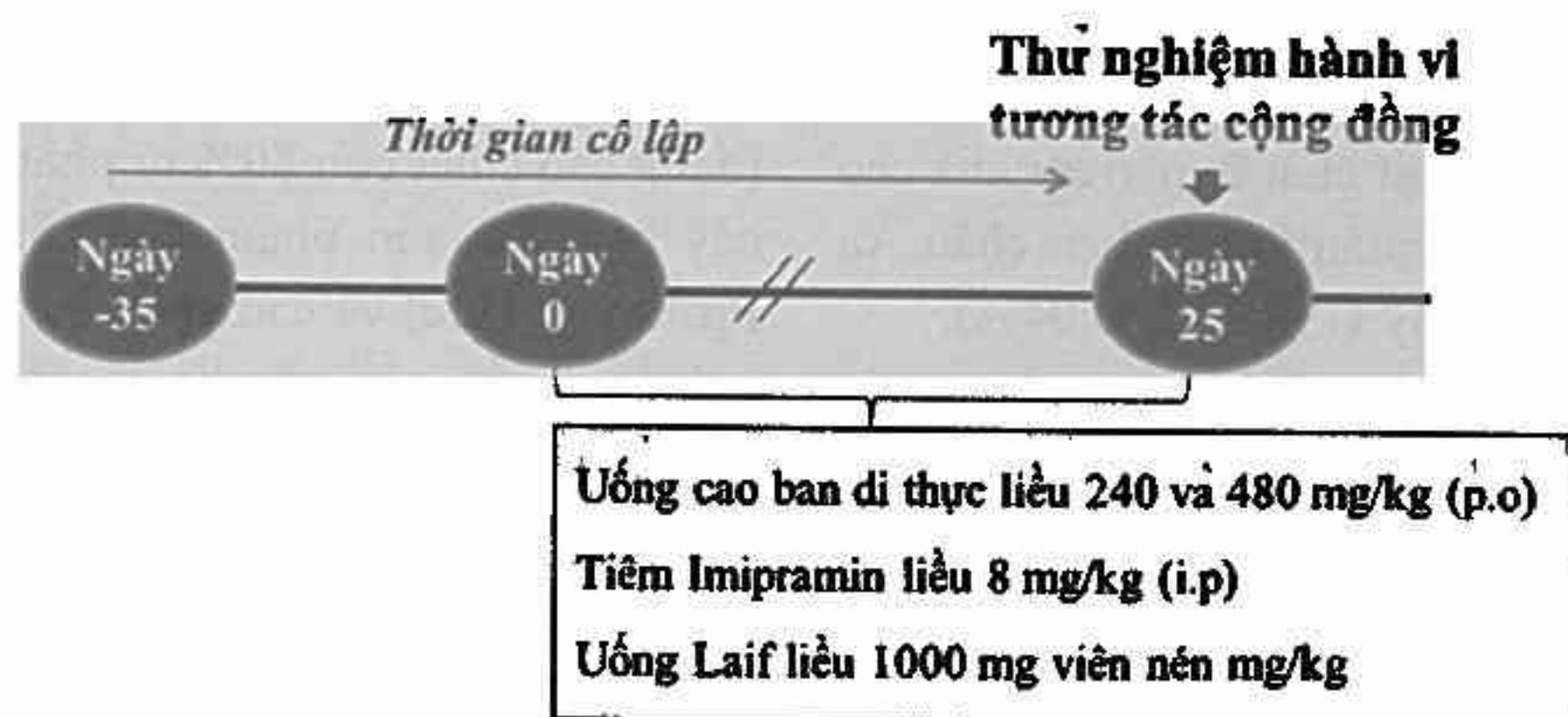
2.4. Phương pháp gây stress cô lập trên chuột và thử nghiệm hành vi tương tác cộng đồng

Mô hình chuột cô lập được tiến hành theo công bố trước đây [3]. Chuột được nuôi riêng rẽ trong từng chuồng, các chuồng được bố trí sao cho không có sự tiếp xúc với nhau. Nhóm chứng sinh lý (chuột bầy đàn) gồm các chuột được nuôi trong cùng một chuồng (10 con/ chuồng). Sau 5 tuần, chuột cô lập được cho uống nước (chứng bệnh lý) hoặc điều trị bằng cao chiết ban di thực (với liều 240 và 480 mg/kg) hoặc chứng dương Imipramin (8 mg/kg) và Laif (1000 mg/kg).

Sau 14 và 21 ngày điều trị nhóm nghiên cứu đã tiến hành đánh giá tác dụng giải lo âu của cao chiết ban di thực [2]. Tiếp theo, vào ngày điều trị thứ 25, sau khi uống mẫu nghiên cứu 1 giờ, chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng chống trầm cảm bằng thử nghiệm 3 buồng (three-chamber paradigm test). Chuột được nuôi cô lập trong suốt quá trình nghiên cứu. Thử nghiệm được tiến hành theo phương pháp đã được công bố trong các nghiên cứu của tác giả Kaidanovich-Beilin và

cộng sự [7]. Đây cũng là thử nghiệm thường quy dùng đánh giá tác dụng chống trầm cảm tại phòng thí nghiệm của GS Kinzo Matsumoto thời gian gần đây, đã được nhóm nghiên cứu áp dụng triển khai tại Khoa Dược lý Sinh hóa, Viện Dược liệu.

Hệ thống thí nghiệm gồm một bể nhựa trong suốt (30 x 100 cm) được ngăn thành 3 khoang, gồm khoang ở giữa (30 x 20 cm), khoang phải bằng khoang trái (30 x 40 cm). Ba khoang này được nối với nhau bằng hai cửa nằm trên bề mặt sàn (10 x 10 cm). Tại khoang phải và trái có chứa một hộp lưới hình trụ có đường kính 10 cm. Phía trên hộp lưới được đặt nắp và quây kín để tránh chuột trèo lên. Phía trên hộp nhựa 100 cm là một camera ghi lại hành vi của chuột. Thử nghiệm được tiến hành gồm 2 giai đoạn. Ở giai đoạn làm quen, chuột thí nghiệm được đặt vào khoang giữa, và được tự do đi lại giữa các khoang trong vòng 5 phút để làm quen với môi trường mới. Ở giai đoạn đánh giá, chuột được đưa vào khoang giữa. Một chuột khỏe mạnh, đồng giới, trọng lượng sai khác không quá 4 g được nhốt trong 1 hộp lưới. Hộp lưới còn lại được để trống. Chuột thí nghiệm được tự do đi lại ở cả 3 khoang trong vòng 10 phút. Camera theo dõi hành vi, số lần vào ra mỗi ngăn, thời gian chuột ở trong mỗi ngăn được ghi lại, sau đó được phân tích bởi người làm thí nghiệm. Trong ngày thử nghiệm chuột được cho uống thuốc 60 phút trước khi tập (đối với nhóm chứng Imipramin, thuốc được tiêm phúc mạc trước khi tập 30 phút). Sau khi tiến hành thí nghiệm với mỗi chuột, dụng cụ thí nghiệm được lau sạch bằng cồn 70%. Bài tập được thực hiện 1 lần duy nhất.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm

2.5. Nghiên cứu độc tính cấp

Độc tính cấp theo đường uống của cao chiết ban di thực được thực hiện theo phương pháp thường quy [1, 3]. Cao ban di thực được nghiền với nước đến nồng độ thích hợp có thể bơm trực tiếp vào dạ dày chuột. Chuột được cho uống thuốc thử liệu khác nhau với thể tích 0,2 ml/10g thể trọng chuột. Tìm liều tối đa mà không có chuột nào của lô thí nghiệm chết (LD_{0}) và liều tối thiểu để 100% chuột của lô thí nghiệm chết (LD_{100}). Thử thêm 3 liều trung gian giữa 2 liều nói trên để xác định LD_{50} . LD_{50} được tính theo phương pháp Behrens - Karber. Chuột được để ở phòng thí nghiệm với nhiệt độ duy trì $22 \pm 1^{\circ}C$, ăn uống đầy đủ, chu kỳ sáng tối là 12/12 h (chu kỳ sáng từ 7:00 - 19:00) đảm bảo để mọi hoạt động của chuột bình thường. Hành vi, hoạt động, ăn uống, bài tiết của chuột và số chuột sống, chết trong 03 ngày được theo dõi. Chuột chết được mổ để đánh giá tổn thương đại thể.

2.6. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Thỏ được nuôi ổn định ít nhất 3 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm. Thỏ được cho uống nước đun sôi để nguội (nhóm sinh lý, $n = 10$) hoặc uống cao chiết ban di thực liều 80 mg cao/kg (tương đương liều tác dụng dược lý, $n = 10$) và 320 mg cao/kg thể trọng thỏ (tương đương liều gấp 4 lần liều tác dụng, $n = 11$) với thể tích là 5ml/kg thể trọng. Thỏ được cho uống cao chiết ban di thực liên tục trong 30 ngày. Để theo dõi chức năng gan, thận, chức năng tạo máu, thỏ được lấy máu vào 4 thời điểm khác nhau: trước khi dùng mẫu thử (N0), sau khi uống 15 ngày (N15), 30 ngày (N30) và sau khi ngừng uống 15 ngày (N45).

2.6.1. Theo dõi chức năng gan:

- Định lượng AST, ALT theo phương pháp Reitman - Franker dùng cơ chất L- aspartat và L- alanin.

- Định lượng protein toàn phần bằng phương pháp Biuret.

- Định lượng bilirubin bằng phương pháp so màu.

2.6.2. Theo dõi chức năng thận:

- Định lượng creatinin bằng phương pháp Jaffe.

- Định lượng ure bằng phương pháp Rappoport dùng enzym urease.

2.6.3. Theo dõi chức năng tạo máu:

- Phân tích số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, giá trị hematocrit, nồng độ huyết sắc tố, % lympho trên máy phân tích máu tự động SYSMEX KX21 - Mỹ.

2.6.4. Xét nghiệm mô bệnh học:

Sau 30 ngày uống mẫu thử và sau 15 ngày ngừng uống, lấy ngẫu nhiên mỗi lô 3 con để cắt và đọc tiêu bản gan, thận. Xét nghiệm vi thể gan, thận được thực hiện bởi Bộ môn giải phẫu bệnh lý - Trường Đại học Y Hà Nội.

2.7. Xử lý số liệu

Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình cộng/ trừ độ lệch chuẩn $SD: M \pm SD$. (M: giá trị trung bình từng lô, SD: độ lệch chuẩn) và được so sánh thống kê sử dụng phần mềm Excel 2010. Kết quả được xem là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

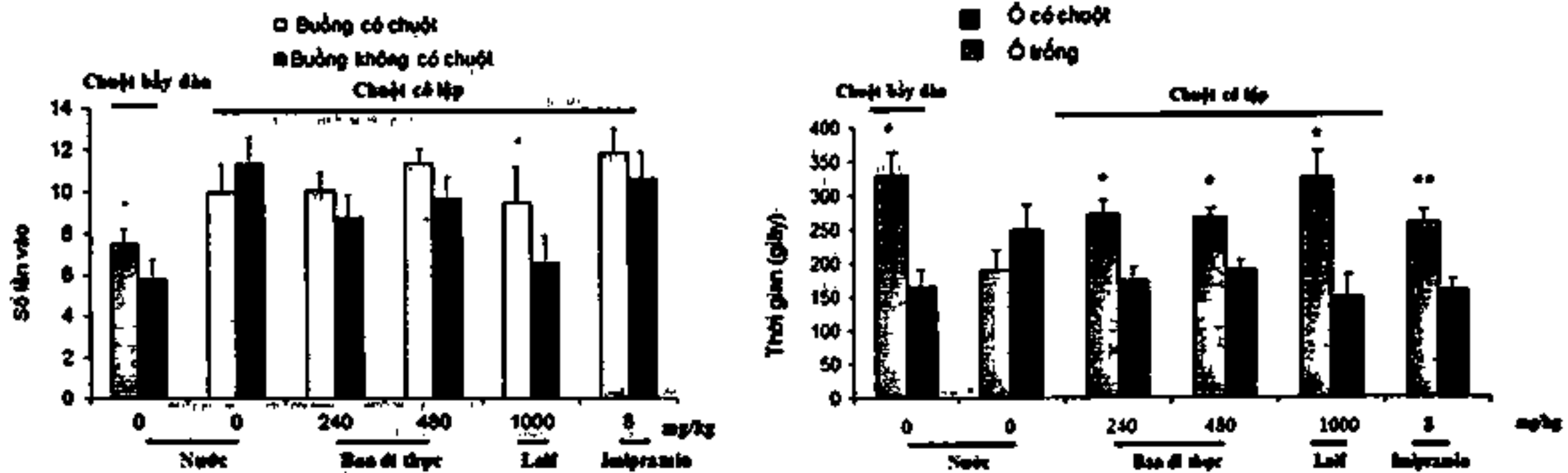
3. Kết quả

3.1. Cao chiết ban di thực cải thiện hành vi tương tác cộng đồng trên chuột bị stress cô lập

Sau khi được điều trị bằng thuốc 25 ngày, hành vi tương tác cộng đồng của chuột được đánh giá bằng thử nghiệm 3 buồng. Kết quả hình 2 đã cho thấy, chuột bày đàn có số lần và thời gian viếng thăm vào buồng có chuột cùng loại nhiều hơn so với buồng trống ($p < 0,05$). Đối lập với chuột bày đàn, chuột cô lập không được điều trị có số lần và thời gian ở 2 buồng này không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê, thậm chí chuột cô lập có xu hướng thích vào buồng không có chuột hơn so với ô có chuột đồng loại đang được nhốt trong hộp lưới. Trong suốt quá trình thử nghiệm, không phát hiện thấy chuột cô lập hung hãn tấn công chuột cùng loại. Chuột cô lập sau khi điều trị bằng ban di thực với liều 240 mg/kg và 480 mg/kg đã cho thấy hành vi tương tác cộng đồng được cải thiện rõ rệt, được thể hiện bằng thời gian các con chuột này ở buồng có chuột cao hơn so với ở buồng không có chuột ($p < 0,05$). Số lần lô chuột điều trị bằng ban di thực với liều 240 mg/kg và 480 mg/kg bước vào

buồng có chuột có xu hướng tăng so với nhóm không được điều trị, tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Chế phẩm ban Âu Laif (1000 mg/kg) có số lần và thời gian bước vào buồng có chuột cao hơn so với buồng không có chuột ($p < 0,05$). Thuốc chuẩn Imipramin (8 mg/kg) cũng cho thấy tác dụng cải thiện hành vi

tương tác cộng đồng trên chuột cô lập ($p < 0,01$), được thể hiện bằng tăng thời gian bước vào buồng có chuột so với buồng không có chuột. Số lần chuột điều trị bằng Imipramin bước vào buồng có chuột có xu hướng tăng so với buồng không có chuột, tuy nhiên, sự khác biệt này chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p = 0,17$).



Hình 2. Ảnh hưởng của cao chiết ban Âu đi thực lên hành vi tương tác cộng đồng của chuột cô lập trên thử nghiệm 3 buồng

3.2. Độc tính cấp

Theo dõi chuột được cho uống cao chiết ban đi thực với các liều khác nhau, thấy rằng ở liều 9,29 g cao/kg thể trọng chuột, tất cả các chuột đều khỏe mạnh, hoạt động, ăn uống, bài tiết bình thường. Từ liều 13,94 g - 31,43 g cao/kg thể trọng, một số chuột bắt đầu có biểu hiện run rẩy,

co giật, sau đó 4 chân duỗi thẳng cứng đờ, có những chuột sẽ qua được cơn co giật, số chuột chết tập trung trong khoảng 24 giờ đầu. Ở liều càng cao chuột chết càng nhanh (Bảng 1). Những chuột còn sống sót vẫn hoạt động, bài tiết bình thường, ăn uống lúc đầu ít hơn, sau đó thì bình thường.

Bảng 1. Số liệu thử độc tính cấp của cao chiết ban đi thực

| Lô thí nghiệm | Liều uống (g/kg) | n | Số chuột chết / lô | d | z | d x z |
|---------------|------------------|----|--------------------|------|-----|--------|
| 1 | 39,29 | 10 | 10 | | | |
| 2 | 31,43 | 10 | 8 | 7,86 | 9,0 | 70,74 |
| 3 | 23,23 | 10 | 7 | 8,20 | 7,5 | 61,50 |
| 4 | 18,58 | 10 | 3 | 4,65 | 5,0 | 23,23 |
| 5 | 13,94 | 10 | 2 | 4,64 | 2,5 | 11,61 |
| 6 | 9,29 | | 0 | 4,65 | 1,0 | 4,65 |
| | | | | | | 171,73 |

Giá trị LD₅₀ thu được là: LD₅₀ = 22,12 ± 1,79 g cao/kg thể trọng chuột.

3.3. Độc tính bán trường diễn

3.3.1. Tình trạng chung và cân nặng động vật thí nghiệm:

Ở các lô uống mẫu thử và lô chứng hoạt động ăn uống, bài tiết của các thỏ vẫn bình thường, không có sự khác biệt nào. Không có thỏ nào chết. Trọng lượng thỏ ở tất cả các lô

đều tăng lên so với ban đầu, sự tăng lên này giữa lô chứng và lô thử là như nhau, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, tuy nhiên có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê của lần sau so với ban đầu trong cùng một lô. Điều này cho thấy mẫu thử không có ảnh hưởng đến cân nặng thỏ (Bảng 2).

Bảng 2. Trọng lượng thí nghiệm ở các thời điểm theo dõi. **: Trọng lượng khác nhau có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$ so với lần 1 trong cùng 1 lô. *Trọng lượng khác nhau có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ so với lần 1 trong cùng 1 lô

| Lô nghiên cứu | Trọng lượng (kg) | | | |
|---------------|------------------|--------------|--------------|---------------|
| | Lần 1 | Lần 2 | Lần 3 | Lần 4 |
| Lô 1 | 1,98 ± 0,09 | 2,20 ± 0,06* | 2,22 ± 0,07* | 2,23 ± 0,05* |
| Lô 2 | 2,05 ± 0,04 | 2,18 ± 0,06 | 2,22 ± 0,08* | 2,31 ± 0,06** |
| Lô 3 | 2,01 ± 0,04 | 2,12 ± 0,04 | 2,16 ± 0,07* | 2,37 ± 0,10* |

3.3.2. Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học:

Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học được trình bày trong Bảng 3 cho thấy, sau 15 ngày, 30 ngày uống thuốc và sau ngừng thuốc 15 ngày, tất cả các xét nghiệm đánh giá như số lượng hồng cầu, số lượng bạch cầu, số lượng

tiểu cầu, nồng độ hemoglobin, giá trị hematocrit ở cả 2 lô cao chiết ban di thực (liều 80 mg cao/kg và 320 mg cao/kg) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng ở cùng thời điểm cũng như so sánh với trị số trước khi dùng thuốc ($p > 0,05$).

Bảng 3. Các chỉ số huyết học của các lô thí nghiệm. p (chứng - thử) ở tất cả các lô đều $> 0,05$; p (trước - sau) ở tất cả các lô $> 0,05$

| Chỉ số | | N0 | N15 | N30 | N45 |
|--------------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Bạch cầu ($10^3/mm^3$) | Sinh lý | 6,69 ± 0,37 | 7,53 ± 0,52 | 7,66 ± 0,53 | 7,16 ± 0,59 |
| | BDT 80 mg/kg | 7,57 ± 0,41 | 8,29 ± 0,60 | 8,51 ± 0,63 | 8,93 ± 1,08 |
| | BDT 320 mg/kg | 6,79 ± 0,57 | 7,33 ± 0,70 | 8,02 ± 0,53 | 6,76 ± 1,00 |
| Hồng cầu ($10^6/mm^3$) | Sinh lý | 5,34 ± 0,22 | 5,43 ± 0,14 | 5,21 ± 0,15 | 4,86 ± 0,16 |
| | BDT 80 mg/kg | 5,73 ± 0,18 | 5,66 ± 0,24 | 5,22 ± 0,27 | 4,86 ± 0,16 |
| | BDT 320 mg/kg | 5,45 ± 0,16 | 5,26 ± 0,10 | 5,12 ± 0,15 | 5,29 ± 0,15 |
| Tiểu cầu ($10^6/mm^3$) | Sinh lý | 237,70 ± 64,06 | 258,80 ± 30,37 | 248,61 ± 39,19 | 258,00 ± 54,56 |
| | BDT 80 mg/kg | 318,86 ± 44,17 | 327,06 ± 47,11 | 374,67 ± 34,84 | 394,71 ± 44,10 |
| | BDT 320 mg/kg | 362,0 ± 33,61 | 376,55 ± 71,27 | 391,45 ± 71,15 | 349,29 ± 46,74 |
| Hemoglobin (g/dl) | Sinh lý | 10,94 ± 0,37 | 11,06 ± 0,40 | 11,14 ± 0,57 | 10,01 ± 0,22 |
| | BDT 80 mg/kg | 11,5 ± 0,25 | 11,3 ± 0,55 | 11,25 ± 0,74 | 11,04 ± 0,26 |
| | BDT 320 mg/kg | 11,45 ± 0,42 | 10,97 ± 0,37 | 10,37 ± 1,00 | 10,37 ± 0,38 |
| Hematocrit (%) | Sinh lý | 35,46 ± 1,19 | 35,88 ± 1,22 | 32,82 ± 0,67 | 34,52 ± 0,73 |
| | BDT 80 mg/kg | 37,5 ± 0,92 | 36,55 ± 1,22 | 36,67 ± 1,61 | 36,22 ± 0,89 |
| | BDT 320 mg/kg | 36,34 ± 0,98 | 34,59 ± 0,40 | 35,69 ± 1,00 | 36,30 ± 1,07 |
| Lympho bào (%) | Sinh lý | 53,66 ± 2,31 | 53,28 ± 2,56 | 49,01 ± 3,23 | 42,50 ± 6,56 |
| | BDT 80 mg/kg | 51,11 ± 3,07 | 52,59 ± 2,31 | 48,00 ± 4,18 | 42,77 ± 3,96 |
| | BDT 320 mg/kg | 53,01 ± 2,37 | 53,08 ± 3,89 | 50,71 ± 2,98 | 50,31 ± 5,89 |

3.3.3. Kết quả theo dõi các chỉ số thuộc chức năng gan và thận:

Kết quả từ Bảng 4 cho thấy, sau 15 ngày, 30 ngày uống mẫu thử và sau ngừng uống mẫu thử 15 ngày, tất cả các xét nghiệm đánh giá chức năng gan: nồng độ bilirubin, nồng độ protein, hoạt độ

enzym AST và ALT huyết thanh và chức năng thận: nồng độ ure và nồng độ creatinin huyết thanh ở cả 2 lô cao chiết ban di thực (liều 80 mg cao/kg và 320 mg cao/kg) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng ở cùng thời điểm cũng như trị số trước khi dùng thuốc ($p > 0,05$).

Bảng 4. Các chỉ số sinh hóa của các lô thí nghiệm. p (chứng - thử) ở tất cả các lô đều $> 0,05$; p (trước - sau) ở tất cả các lô $> 0,05$

| Chỉ số | Lô | N0 | N15 | N30 | N45 |
|-----------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| ALT (U/l) | Sinh lý | 39,12 ± 1,28 | 47,99 ± 10,28 | 41,12 ± 3,14 | 42,74 ± 1,78 |
| | BDT 80 mg/kg | 37,75 ± 3,38 | 45,97 ± 7,08 | 49,14 ± 6,88 | 47,39 ± 5,49 |
| | BDT 320 mg/kg | 39,24 ± 1,67 | 44,11 ± 4,80 | 41,12 ± 3,14 | 44,29 ± 4,14 |
| AST (U/l) | Sinh lý | 42,70 ± 2,90 | 47,16 ± 14,09 | 41,39 ± 2,77 | 49,15 ± 5,31 |
| | BDT 80 mg/kg | 49,71 ± 6,33 | 59,43 ± 11,84 | 57,67 ± 3,71 | 57,43 ± 7,47 |
| | BDT 320 mg/kg | 44,47 ± 2,18 | 52,93 ± 9,70 | 52,67 ± 5,32 | 48,55 ± 0,58 |

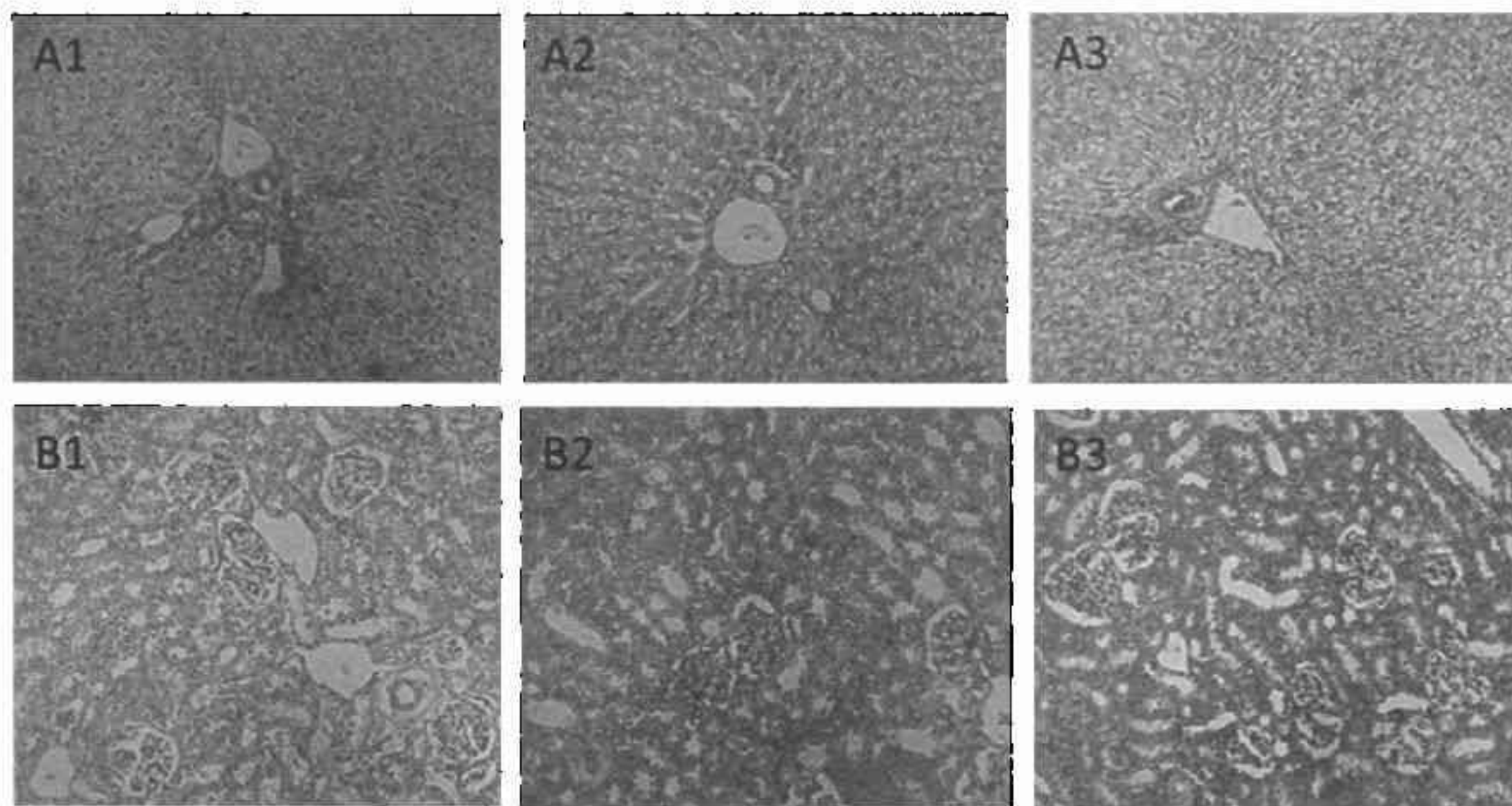
| | | | | | |
|------------------------------------|---------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$) | Sinh lý | $0,82 \pm 0,12$ | $0,57 \pm 0,04$ | $0,86 \pm 0,12$ | $0,59 \pm 0,06$ |
| | BDT 80 mg/kg | $0,73 \pm 0,05$ | $0,71 \pm 0,07$ | $0,76 \pm 0,08$ | $0,66 \pm 0,06$ |
| | BDT 320 mg/kg | $0,89 \pm 0,07$ | $0,75 \pm 0,03$ | $0,86 \pm 0,10$ | $0,70 \pm 0,07$ |
| Protein tp (g/dl) | Sinh lý | $58,29 \pm 1,97$ | $57,59 \pm 2,86$ | $59,38 \pm 2,66$ | $60,00 \pm 2,05$ |
| | BDT 80 mg/kg | $58,82 \pm 2,01$ | $60,29 \pm 2,29$ | $58,22 \pm 2,41$ | $62,14 \pm 3,66$ |
| | BDT 320 mg/kg | $61,85 \pm 1,97$ | $58,8 \pm 1,69$ | $58,24 \pm 0,70$ | $63,49 \pm 1,21$ |
| Ure (mg/dl) | Sinh lý | $5,99 \pm 0,70$ | $3,04 \pm 0,39$ | $4,29 \pm 0,59$ | $4,29 \pm 0,65$ |
| | BDT 80 mg/kg | $6,09 \pm 0,32$ | $5,00 \pm 0,68$ | $4,43 \pm 0,70$ | $5,15 \pm 0,41$ |
| | BDT 320 mg/kg | $6,21 \pm 0,41$ | $5,56 \pm 0,45$ | $5,96 \pm 1,09$ | $5,35 \pm 0,57$ |
| Creatinin ($\mu\text{mol/l}$) | Sinh lý | $108,63 \pm 4,24$ | $86,82 \pm 3,29$ | $121,56 \pm 6,95$ | $101,20 \pm 5,95$ |
| | BDT 80 mg/kg | $104,27 \pm 7,80$ | $89,72 \pm 3,81$ | $106,12 \pm 3,34$ | $92,64 \pm 5,95$ |
| | BDT 320 mg/kg | $103,84 \pm 3,72$ | $91,57 \pm 4,30$ | $109,47 \pm 4,25$ | $103,16 \pm 0,91$ |

3.3.4. Kết quả xét nghiệm mô học:

Về đại thể các cơ quan, tất cả các thỏ ở cả 3 lô được mổ để quan sát không thấy có thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan tim, phổi, gan lách, thận và hệ thống tiêu hóa.

Hình ảnh vi thể gan cho thấy, sau 30 ngày uống thuốc và sau 15 ngày ngừng thuốc, lô uống cao chiết ban di thực (liều 80 mg cao/ kg và 320 mg cao/ kg) có các tế bào gan đều bình thường,

có kích thước đều, tĩnh mạch trung tâm và xoang mạch không xung huyết, không có thoái hóa, hoại tử, khoảng cửa không viêm. Kết quả xét nghiệm vi thể thận cũng cho thấy, các lô thí nghiệm đều có cầu thận kích thước đều, mô kẽ không viêm, ống thận không có tổn thương, không xung huyết. Không có sự khác biệt về cấu trúc vi thể gan, thận giữa lô dùng thuốc với lô chứng.



Hình 3. Ảnh tiêu bản gan, thận sau 30 ngày dùng thuốc (HE.20x).

A1: gan thỏ chứng sinh lý; A2: gan thỏ uống cao chiết ban di thực liều 80 mg/ kg; gan thỏ uống cao chiết ban di thực liều 320 mg/ kg; B1: thận thỏ chứng sinh lý; B2: thận thỏ uống cao chiết ban di thực liều 80 mg/ kg; B3: thận thỏ uống cao chiết ban di thực liều 320 mg/ kg

4. Bàn luận

Rối loạn hành vi tương tác cộng đồng và nhận thức cộng đồng là đặc trưng của nhiều chứng rối loạn tâm thần như trầm cảm, tự kỷ, rối loạn lưỡng cực (bipolar disorders), tâm thần phân liệt. Để phát triển các liệu pháp điều trị cho các bệnh

tâm thần nêu trên, các nhà khoa học sử dụng các mô hình động vật và các thử nghiệm phù hợp. Thử nghiệm 3 buồng đã được sử dụng rộng rãi để đánh giá ái lực cộng đồng và trí nhớ cộng đồng trên chuột [7]. Đánh giá hành vi tương tác cộng đồng bằng thử nghiệm 3 buồng là một trong

những thử nghiệm phù hợp với mô hình chuột cô lập [12]. Đây là thử nghiệm một phần được dùng để nghiên cứu bệnh tự kỷ, nhưng thường được sử dụng để nghiên cứu trầm cảm. Nguyên lý của thử nghiệm này là dựa trên sự lựa chọn của chuột, chuột có xu hướng thích vào buồng có chuột đồng loại hay thích một mình. Theo đó "tính hòa đồng" trong trường hợp này được định nghĩa là khuynh hướng viếng thăm chuột khác khi được so sánh với thời gian một mình tại một buồng có điều kiện tương tự. Kết quả của chúng tôi cho thấy, chuột cô lập ở nhóm chứng bệnh lý không có sự khác biệt về số lần và thời gian ở 2 buồng (buồng có chuột cùng loại và buồng trống), thậm chí chuột cô lập có xu hướng thích vào buồng không có chuột hơn so với ô có chuột đồng loại. Điều này chứng tỏ đã chuột cô lập có sự thiếu hụt trong hành vi tương tác cộng đồng - một trong những biểu hiện đặc trưng của chứng trầm cảm.

Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh cao chiết ban Âu và các hoạt chất của nó như hypericin, hyperforin và adhyperforin có tác dụng chống trầm cảm trên mô hình động vật thực nghiệm được đánh giá bằng các thử nghiệm chuột bởi cưỡng bức và thử nghiệm treo đuôi chuột [5, 15]. Do vậy, với mục đích chứng minh tác dụng chống trầm cảm của cây ban di thực tại Việt Nam, nhóm nghiên cứu đã quyết định lựa chọn một thử nghiệm đánh giá tác dụng chống trầm cảm chưa được nghiên cứu trên cây ban, đó là thử nghiệm 3 buồng. Kết quả đã cho thấy:

Đối với nhóm chuột cô lập được uống cao chiết ban Âu di thực (liều 240 mg/kg và 480 mg/kg) và Imipramin (8 mg/kg), hành vi tương tác cộng đồng được cải thiện rõ rệt được biểu hiện thông qua thời gian chuột ở buồng có chuột cao hơn so với ở buồng không có chuột. Đặc biệt hơn, chế phẩm Ban Âu Laif (1000 mg/kg) cũng thể hiện sự cải thiện tương tác cộng đồng mạnh hơn, thông qua cả hai tiêu chí: số lần và thời gian bước vào buồng có chuột cao hơn so với buồng không có chuột ($p < 0,05$). Ban Âu đã được sử dụng làm thuốc điều trị chống trầm cảm được thương mại phổ biến trên thị trường châu Âu (trong đó có sản phẩm Laif® 900 đang được bán

tại Đức). Rất nhiều công trình nghiên cứu đã chứng minh tác dụng chống trầm cảm của ban Âu. Hai thành phần chính phân lập từ ban Âu được chỉ ra có tác dụng chống trầm cảm là hypericin và hyperforin. Một số cơ chế tác dụng có thể là do ức chế sự tạo thành cytokin interleukin 6 và 1 β ở bạch cầu đơn nhân, dẫn đến làm giảm giải phóng corticotropin, do đó giảm sự tạo thành cortisol [14], hoặc có thể ức chế tái thu hồi serotonin, norepinephrin và dopamin dẫn đến giảm mức độ biểu hiện của beta adrenoreceptor và tăng mức độ biểu hiện của receptor serotonin 5-HT_{2A} và 5-HT_{1A} [11, 13]. Hơn nữa, tác dụng chống trầm cảm còn được chứng minh trên các thử nghiệm lâm sàng. Theo thống kê, có khoảng 35 - 40 bài báo nghiên cứu lâm sàng, trong đó có 26 nghiên cứu được so sánh với giả dược và 14 nghiên cứu so sánh với thuốc chuẩn điều trị trầm cảm. Phần lớn các nghiên cứu đều chỉ ra rằng ban Âu có hiệu quả chống trầm cảm được so sánh với imipramin, fluoxetin [6, 10, 16, 17].

Trong một nghiên cứu trước của chúng tôi đã chứng minh, cao chiết ban di thực có tác dụng giải lo âu trên mô hình chuột cô lập, được đánh giá bằng thử nghiệm không gian mở và thử nghiệm mê lộ chữ thập nâng cao [2]. Hành vi lo lắng, hoảng sợ cũng được phát hiện thấy ở bệnh trầm cảm. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cùng với những bằng chứng đã công bố về tác dụng chống trầm cảm của ban Âu có thể kết luận rằng cây ban Âu di thực về Việt Nam vẫn giữ được tác dụng chống trầm cảm trên mô hình động vật.

Mặc dù vậy, một số công trình nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra một số tác dụng phụ không phổ biến hoặc nhẹ như khô miệng, chóng mặt, táo bón, vấn đề về dạ dày - ruột, và nhầm lẫn [18]. Hypericin là chất có tính nhạy cảm với ánh sáng mạnh vì vậy một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng ban Âu có thể gây ảnh hưởng đến da và mắt do tính nhạy cảm với ánh sáng [4, 8]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, giá trị LD₅₀ của cao ban thực là 22,12 cao/kg thể trọng chuột. Theo cách tính liều an toàn khi thử nghiệm dược lý thì giá trị LD₅₀ của cao ban Âu di thực gấp 92,17 lần liều có tác dụng dược lý trên chuột [3]. Hơn nữa,

trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn khi nghiên cứu trên thỏ, với liều 80 mg cao/ kg và 320 mg cao/ kg thể trọng/ ngày, trong 30 ngày, không thấy có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến thể trọng, chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận cũng như mô bệnh học gan, thận trong suốt quá trình uống cũng như sau khi ngừng uống 15 ngày. Như vậy, cao chiết ban di thực thể hiện tương đối an toàn về độc tính cấp và an toàn về độc tính bán trường diễn (với liều tương đương và liều gấp 4 lần liều tác dụng dược lý). Kết quả nghiên cứu này cũng hoàn toàn phù hợp với các công bố trên thế giới cho rằng ban Âu không thể hiện những dấu hiệu nghiêm trọng về độc tính cấp và bán trường diễn [5, 9].

5. Kết luận

Từ những kết quả nghiên cứu trên, có thể rút ra một số kết luận sau:

- Về tác dụng chống trầm cảm: Kết hợp với

các công trình đã công bố có thể kết luận cao ban di thực có tác dụng chống trầm cảm trên chuột trầm cảm do stress cô lập.

- Về độc tính cấp: giá trị LD₅₀ của cao ban thực là 22,12 (18,61 – 25,62) g cao/ kg thể trọng chuột.

- Về độc tính bán trường diễn: Cao ban di thực với liều 80 mg cao/ kg và 320 mg cao/ kg không ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến thể trọng, chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận cũng như mô bệnh học gan, thận trong suốt quá trình uống cũng như sau khi ngừng uống 15 ngày.

Lời cảm ơn: Kết quả thu được trong nghiên cứu này là sản phẩm của đề tài cấp Bộ Y tế 2013-2015: Nghiên cứu chế phẩm hỗ trợ điều trị trầm cảm từ cây ban di thực (*Hypericum perforatum* L.). Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí nghiên cứu của Bộ Y tế.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Trung Đàm (1996), Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc. Nxb Y học – Hà Nội.
2. Phạm Thị Nguyệt Hằng, Lê Thị Xoan, Nguyễn Minh Khoi (2015). Study on anxiolytic effect of *Hypericum perforatum* L. acclimatized in Vietnam, *Journal of Medicinal Materials*, 20(5), 302 – 307.
3. Viện Dược liệu (2008). Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ thảo dược. NXB Khoa học và Kỹ thuật, 352 - 363.
4. Brockmöller J., Reum T., Bauer S., Kerb R., Hübner W. D., Roots I. (1997), Hypericin and pseudohypericin: Pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans. *Pharmacopsychiatry*, 30(2), 94-101.
5. Bukhari I. A., Dar A. (2014), Behavioral profile of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) extract. A comparison with standard antidepressants in animal models of depression, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 17(8), 1082-1089.
6. Harrer G., Hubner W. D., Podzuweit H. (1993), Effectiveness and tolerance of the hypericum preparation LI 160 compared to maprotiline. Multicentre double-blind study with 102 outpatients, *Nervenheilkunde*, 12, 297-301.
7. Kaidanovich-Beilin O., Lipina T., Vukobradovic I., Roder J., Woodgett J. R. (2011). Assessment of social interaction, behaviors, *Journal of Visualized Experiments*, 48, 2473.
8. Lane-Brown M. M. (2000), Photosensitivity associated with herbal preparations of St John's wort (*Hypericum perforatum*), *Medical Journal of Australia*, 172, 302.
9. Linde K. (2009), St. John's wort - an overview, *Forsch Komplementmed*, 16(3), 146 -55.
10. Martínez B., Kasper S., Ruhmann B., et al. *Hypericum* in the treatment of seasonal affective disorders, *Nervenheilkunde*, 12, 302-307.
11. Müller W., Rossol R. (1993), Effects of hypericum extract on the expression of serotonin receptors. *Nervenheilkunde*, 12, 357-358.
12. Teegarden S. (2015), Behavioral Phenotyping in rats and mice. Labome.com, doi. <http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.2.122>.
13. Teufel-Mayer R., Gleitz J. (1997), Effects of long-term administration of hypericum extracts on the affinity and density of the central serotonergic 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors, *Pharmacopsychiatry*, 30 (2), 113-116.
14. Thiele B., Ploch M., Brink I. (1993), Modulation of cytokine expression by hypericum extract, *Nervenheilkunde*, 12: 353-356.
15. Tian J., Zhang F., Cheng J., Guo S., Liu P., Wang H. (2014), Antidepressant-like activity of adhyperforin, a novel constituent of *Hypericum perforatum* L., *Scientific Reports*, 4, 5632.
16. Wheatley D. (1997), LI 160, an extract of St. John's wort, versus amitriptyline in mildly to moderately depressed outpatients—a controlled 6-week clinical trial, *Pharmacopsychiatry*, 30(2), 77-80.
17. Schrader E. (2000), Equivalence of St John's wort extract (Ze 117) and fluoxetine: a randomized, controlled study in mild-moderate depression, *International Clinical Psychopharmacology*, 15(2), 61-68.
18. Schulz V. (2006), Safety of St. John's Wort extract compared to synthetic antidepressants, *Phytotherapy*, 13(3), 199-204.