

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA INDIRUBIN-3'-OXIME VÀ VIÊN NANG VINDOXIM HỖ TRỢ ĐIỀU TRỊ BỆNH UNG THƯ

Nguyễn Mạnh Cường^{1,*}, Phạm Ngọc Khanh¹, Trần Thu Hương¹, Nguyễn Ngọc Hiếu¹,
Hồ Việt Đức¹, Vũ Thị Hà¹, Nguyễn Văn Tài¹, Nguyễn Thị Hồng Vinh²

¹Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên, Viện HLKHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt,
Cầu Giấy, Hà Nội

²Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, 48 Hai Bà Trưng, Hà Nội

*Email: nmcuong_inpc@yahoo.com.vn

Đến Tòa soạn: 9/1/2013; Chấp nhận đăng: 3/8/2013

TÓM TẮT

Indirubin-3'-oxime, là sản phẩm bán tổng hợp trực tiếp từ bột chàm giàu indirubin, có khả năng ức chế enzym cyclin-dependent kinases (CDKs) và gây ra quá trình tự chết của một số dòng tế bào ung thư ở người. Từ indirubin-3'-oxime, thực phẩm chức năng VINDOXIM đã được bào chế để loại bỏ các tác nhân gây ung thư, thúc đẩy sự tự chết của các tế bào ung thư và sử dụng cho việc phòng và hỗ trợ điều trị bệnh ung thư. Nghiên cứu độc tính cấp của indirubin-3'-oxime trên chuột nhắt trắng chủng Swiss qua đường uống đã xác định hoạt chất indirubin-3'-oxime gần như không độc với LD₅₀ liều gây chết 50 % chuột thí nghiệm) có giá trị > 12,0 g mẫu thử/kg chuột. Liều dưới liều chết (LD₀) được xác định là 10,0 g/kg chuột. Thử độc tính bán trường diễn, sau khi cho thỏ uống hỗn dịch thuốc VINDOXIM liên tục trong 28 ngày với mức liều 7,2 mg hoạt chất (0,036 viên)/kg thỏ/ngày và 21,6 mg (0,108 viên)/kg thỏ/ngày, toàn bộ thỏ thí nghiệm ở nhóm chứng và 2 nhóm thử tăng cân đều và không có sự khác biệt về mức độ gia tăng trọng lượng, về chỉ sinh hóa và huyết học thỏ giữa nhóm chứng và các nhóm uống thuốc (p > 0,05). Trong 4 tuần liên tục, tất cả các chỉ số theo dõi về tình trạng chung, chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận đều nằm trong giới hạn bình thường và không có sự khác biệt rõ rệt so với nhóm chứng. Quan sát đại thể, không nhận thấy sự bất thường về màu sắc và hình dạng bên ngoài của các tổ chức tim, gan, thận, phổi và hệ tiêu hóa giữa các thỏ nhóm chứng và 2 nhóm thử sau thí nghiệm.

Từ khóa: VINDOXIM, indirubin-3'-oxime, độc tính cấp, độc tính bán trường diễn, *Strobilanthes cusia*.

1. MỞ ĐẦU

Ung thư là một trong những căn bệnh nguy hiểm, gây tử vong hàng đầu trên toàn thế giới cũng như tại Việt Nam. Thống kê cho thấy mỗi năm ở Việt Nam có thêm ít nhất 150.000 trường hợp ung thư, đứng đầu là ung thư trực tràng, dạ dày, tiền liệt tuyến và phổi ở nam giới và ung

thư vú, ung thư cổ tử cung, trực tràng và thực quản ở nữ giới. Việc tìm kiếm các phương thuốc mới để phòng và điều trị bệnh ung thư trên thế giới cũng như tại Việt Nam đang được đẩy mạnh, trong đó, việc phát hiện các dược chất mới có nguồn gốc từ thiên nhiên đang là một hướng nghiên cứu đầy tiềm năng.

Indirubin là một alcaloid, thành phần chính có tác dụng trị ung thư máu của bài thuốc cổ truyền Trung quốc Danggui Longui Wan [1]. Dẫn xuất của indirubin, indirubin-3'-oxime là chất được phát hiện có khả năng chống tăng sinh nhiều dòng tế bào ung thư *in vitro* như tế bào ung thư máu LH-60 [2], tế bào ung thư thanh quản Hep-2 [3], tế bào ung thư thận [4], gây ra sự tự chết theo chu trình của các tế bào bạch huyết ác tính B (IM9, Reh6), T(Jurkat, CEM-T) [5], tế bào ung thư cổ tử cung HeLa, tế bào ung thư gan HepG2, tế bào ung thư đại tràng HCT116 [6]. Một quy trình đơn giản, hiệu quả cao, thân thiện với môi trường để tổng hợp indirubin-3'-oxim từ lá cây chàm mèo *Strobilanthes cusia* đã được nghiên cứu và hoàn thiện [7]. Nhằm tạo cơ sở cho việc phát triển thuốc phòng chữa ung thư, chúng tôi đã bào chế thành công chế phẩm viên nang mềm VINDOXIM chứa indirubin-3'-oxime là thành phần chính. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu độc tính cấp của indirubin-3'-oxime và độc tính bán trường diễn của viên nang VINDOXIM trên thực nghiệm.

2. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu nghiên cứu

Hoạt chất indirubin-3'-oxime với độ tinh khiết > 97 % được tổng hợp và tinh chế theo tài liệu [7]. Viên nang mềm VINDOXIM chứa indirubin-3'-oxime 97 % ở dạng bột màu đỏ thẫm, trọng lượng viên 260 mg, hàm lượng hoạt chất indirubin-3'-oxime 40 mg/viên.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Độc tính cấp: Thử trên 60 chuột nhắt trắng chủng Swiss khỏe mạnh, cả hai giống, trọng lượng 18 - 20 g/con, do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp, chia thành 6 nhóm, mỗi nhóm 10 con. Tất cả chuột thực nghiệm được nuôi ổn định, uống nước tự do và theo dõi cân nặng trong suốt quá trình tiến hành thử nghiệm.

Độc tính bán trường diễn: Thí nghiệm được tiến hành trên 21 thỏ khỏe mạnh, cả 2 giống, cân nặng 2,0 - 2,5 kg/con do Trung tâm G1- Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp, chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm (1 nhóm chứng và 2 nhóm thử), mỗi nhóm 7 thỏ. Thỏ được cho ăn và uống nước đầy đủ trong suốt quá trình thử nghiệm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Độc tính cấp

- Chuẩn bị mẫu thử: Cân một lượng mẫu thử, nghiền kỹ, trộn đều với dung dịch hồ tinh bột 2,0 % vừa đủ để tạo thành hỗn dịch thử có nồng độ 0,2 g mẫu thử/ml dung dịch hồ tinh bột 2,0 % (hdA). Chuột được nhịn ăn 15 giờ trước khi thí nghiệm, được uống nước theo nhu cầu. Chuột đạt các yêu cầu về cân nặng được đưa vào thử nghiệm. Thử tích mẫu thử được đưa vào dưới dạng hỗn dịch theo đường uống bằng kim công đầu tù.

- Nhóm chứng: uống 0,4 ml dung dịch hồ tinh bột 2,0 % (3 lần).

- Nhóm thử 1, 2, 3, 4 và 5: uống indirubin-3'-oxime với các mức liều tương ứng là 1: 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 và 12,0 g hoạt chất/kg thể trọng chuột.

Theo dõi tình trạng chung của chuột (trạng thái, hoạt động, tiêu thụ thức ăn nước uống và số lượng chuột chết ở mỗi nhóm trong 96 giờ và đến hết thí nghiệm).

Độc tính bán trường diễn: Cho thỏ uống thuốc liều nghiên cứu, vào buổi sáng, trước khi ăn, liên tục trong vòng 28 ngày. Kiểm tra các chỉ số cân nặng, các chỉ số sinh hóa, huyết học vào các thời điểm trước, giữa và kết thúc thử nghiệm. Làm tiêu bản giải phẫu bệnh của gan và thận sau khi kết thúc giai đoạn uống thuốc.

- Nhóm chứng: uống 5 ml nước cất/kg thể trọng thỏ.

- Nhóm thử 1: uống VINDOXIM với mức liều 1: 7,2 mg indirubin-3'-oxime/kg thể trọng thỏ (5 ml hỗn dịch 0,036 viên/ml) và nhóm thử 2: uống VINDOXIM với mức liều 2: 21,6 mg/kg thể trọng thỏ (5 ml hỗn dịch 0,108 viên/ml).

2.4. Các chỉ tiêu đánh giá

- Chỉ tiêu chung: Theo dõi chuột, thỏ hàng ngày về tình trạng chung, khả năng hoạt động, mức độ tiêu thụ thức ăn, nước uống, hoạt động, tình trạng phân, lông.

- Trọng lượng cơ thể thỏ.

- Chỉ số huyết học: số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hemoglobin, hematocrit.

- Chỉ số sinh hóa: GOT, GPT, creatinin, urea, protein toàn phần.

- Xét nghiệm mô học: Sau khi kết thúc thí nghiệm quan sát đại thể của một số tổ chức của các thỏ trong mỗi nhóm. Sinh thiết các tạng gan và thận để nghiên cứu hình ảnh mô bệnh học của tối thiểu 30 % trong tổng số thỏ của từng nhóm (do Bộ môn Giải phẫu bệnh – Trường Đại học Y Hà Nội thực hiện).

Thời gian thử nghiệm: Độc tính cấp: 10 ngày; Độc tính bán trường diễn: 28 ngày.

Thời điểm xét nghiệm: Lấy máu để làm các chỉ số xét nghiệm trên tại 3 thời điểm: trước thí nghiệm (t_0), sau 14 ngày (t_1) và sau 28 ngày (t_2) uống thuốc.

Xử lý kết quả nghiên cứu: theo phương pháp thống kê sinh y học, dùng phép kiểm định t-student và test “trước - sau”(Avant - Après). Số liệu được biểu diễn dưới dạng: kết quả $\pm SD$ với độ tin cậy P 95 %.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp

Phương pháp xác định độc tính cấp theo phương pháp của nhà xuất bản Y học 1996 [8-10] và OECD [13,14] nhằm mục tiêu xác định LD₅₀ của hoạt chất indirubin-3'-oxime, thành phần chính của viên nang VINDOXIM.

Sau khi cho chuột uống thuốc, qua quan sát, theo dõi biểu hiện và hoạt động của chuột sau khi uống thuốc 24 giờ và trong thời gian 7 ngày, chúng tôi nhận thấy chuột ở nhóm chứng hoạt động và ăn uống bình thường. Chuột ở nhóm thử ở các mức liều 1, 2, và 3 sau 24 giờ uống thuốc không có biểu hiện gì khác thường so với nhóm chứng và cũng không có các dấu hiệu ngộ độc. Chuột ở mức liều 4 và 5 sau khi uống thuốc có biểu hiện giảm hoạt động nhẹ. Chuột ở mức liều 4 có biểu hiện triệu chứng ngộ độc nhẹ và hồi phục tương đối nhanh hơn chuột ở mức liều 5: sau khoảng 2 giờ sau khi uống thuốc chuột có biểu hiện giảm hoạt động, nằm mết. Sau 24 giờ, không nhận thấy còn biểu hiện ngộ độc trên chuột ở nhóm 4 và 5, chuột ăn uống và hoạt động

bình thường trở lại nhưng mức độ tiêu thụ thức ăn giảm hơn so với nhóm chứng và các nhóm thử 1, 2 và 3. Sau 96 giờ theo dõi, có 2 chuột bị chết ở mức liều 5 (bảng 1).

Bảng 1. Bảng theo dõi chuột thí nghiệm thử độc tính cấp của VINDOXIM.

Nhóm chuột	Liều dùng (g mẫu thử/ kg chuột)	Số chuột thí nghiệm	Số chuột chết	Tỷ lệ chuột chết (%)
Nhóm thử 1	4,0 g/kg chuột	10	0	0
Nhóm thử 2	6,0 g/kg chuột	10	0	0
Nhóm thử 3	8,0 g/kg chuột	10	0	0
Nhóm thử 4	10,0 g/kg chuột	10	0	0
Nhóm thử 5	12,0 g/kg chuột	10	2	20,0

Thử nghiệm không xác định được LD₅₀ do mức liều tối đa có thể cho chuột uống được chỉ có 2/10 (20,0 %) chuột chết nhưng xác định được liều dưới liều chết (LD₀) là 10,0 g mẫu thử/kg. Theo phân loại độc tính của GHS (Globally Harmonised System for Classification of Chemicals) những chất có giá trị độc tính cấp LD₅₀ trong khoảng > 5000 mg/kg thể trọng, được coi là chất gần như không độc. Độc tính cấp của hoạt chất indirubin-3'-oxime trong mẫu VINDOXIM mà chúng tôi xác định được có giá trị LD₅₀ > 12,0 g mẫu thử/kg chuột nên có thể kết luận hoạt chất indirubin-3'-oxime gần như không độc.

3.2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Phương pháp xác định độc tính bán trường diễn được thực hiện theo tài liệu của A. Wallace Hayes [8] và Hướng dẫn của OECD 407 [14]. Nghiên cứu được thực hiện để đánh giá ảnh hưởng của viên nang VINDOXIM lên tình trạng chung sức khỏe của thử nghiệm, lên trọng lượng, chức năng tạo máu, chức năng sinh hóa và thay đổi mô bệnh học gan, thận thử sau khi uống dài ngày (28 ngày). Kết quả nghiên cứu cụ thể như sau.

3.2.1. Tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng của thử

Tình trạng chung: Trong thời gian thí nghiệm, tất cả các thử ở cả 3 nhóm thử đều hoạt động bình thường, ăn uống tốt, phân khô, lông mượt, không có hiện tượng rụng lông hoặc lông bị khô cứng. Không có biểu hiện gì đặc biệt ở thử thí nghiệm trong suốt thời gian nghiên cứu.

Sự thay đổi thể trọng thử: Trọng lượng của thử trước, giữa và sau khi uống thuốc được trình bày ở bảng 2.

Kết quả nghiên cứu ở bảng 2 cho thấy: sau 14 và 28 ngày uống thuốc, trọng lượng trung bình thử ở cả 3 nhóm (nhóm chứng và 2 nhóm thử) đều tăng so với trước khi nghiên cứu. Cân nặng trung bình của thử ở nhóm thử trước khi đưa vào thí nghiệm không có sự khác biệt so với nhóm chứng ($P_{\text{trước}}(T1-C)$ và $P_{\text{trước}}(T2-C) \Rightarrow 0,05$). Sau 14 và 28 ngày thử nghiệm, thử tăng cân đều ở cả nhóm chứng và hai nhóm thử nhưng không có sự khác biệt về mức độ gia tăng trọng lượng thử giữa nhóm thử và nhóm chứng ($P_{\text{sau}}(T1-C)$ và $P_{\text{sau}}(T2-C) > 0,05$). Tình trạng ăn uống, đi lại của thử diễn ra bình thường, chứng tỏ rằng VINDOXIM tại liều nghiên cứu không gây ảnh hưởng tới tăng trọng của thử thí nghiệm.

Bảng 2. Ảnh hưởng của VINDOXIM đến trọng lượng cơ thể thỏ (n = 21), xét nghiệm tại 3 thời điểm: trước thí nghiệm (t₀), sau 14 ngày (t₁) và sau 28 ngày (t₂) uống thuốc.

Nhóm (n = 7)	Kết quả cân nặng (kg)			P
	Trước TN (t ₀)	Sau 14 ngày uống thuốc (t ₁)	Sau 28 ngày uống thuốc (t ₂)	
Nhóm chứng (C)	2,07 ± 0,15	2,18 ± 0,16	2,26 ± 0,16	P _{trước-sau} = 0,047 (< 0,05)
% tăng trọng lượng so với trước thử nghiệm		↑5,31 %	↑9,18%	
Nhóm thử 1 (T1)	2,05 ± 0,16	2,14 ± 0,15	2,24 ± 0,13	P _{trước-sau} = 0,049 (< 0,05) P _{trước (T1-C)} = 0,769 (> 0,05) P _{sau (T1-C)} = 0,796 (> 0,05)
% tăng trọng lượng so với trước thử nghiệm		↑4,39 %	↑9,27 %	
Nhóm thử 2 (T2)	2,08 ± 0,15	2,16 ± 0,15	2,26 ± 0,15	P _{trước-sau} = 0,040 (< 0,05) P _{trước (T2-C)} = 0,935 (> 0,05) P _{sau (T2-C)} = 0,953 (> 0,05)
% tăng trọng lượng so với trước thử nghiệm		↑3,85 %	↑8,65 %	

3.2.2. Ảnh hưởng của VINDOXIM đến chỉ số huyết học và sinh hóa của thỏ thí nghiệm

Bảng 3. Ảnh hưởng của VINDOXIM tới các chỉ số huyết học của thỏ thí nghiệm (n = 21), xét nghiệm tại 3 thời điểm: trước thí nghiệm (t₀), sau 14 ngày (t₁) và sau 28 ngày (t₂) uống thuốc.

Chỉ tiêu	n		Nhóm chứng	Nhóm thử T1	P _{C-T1}	Nhóm thử T2	P _{C-T2}				
Hồng cầu (x 10 ¹² / lít)	7	t ₀	5,5 ± 0,8	5,0 ± 1,6	>0.05	5,8 ± 0,4	>0.05				
		t ₁	5,0 ± 0,6	4,8 ± 1,7		5,3 ± 0,8					
		t ₂	5,4 ± 0,4	5,8 ± 0,3		5,7 ± 0,5					
Bạch cầu (x 10 ⁹ / lít)	7	t ₀	9,4 ± 2,3	7,8 ± 2,6		>0.05		7,5 ± 1,2	>0.05		
		t ₁	7,7 ± 1,6	6,7 ± 2,3				7,1 ± 1,1			
		t ₂	9,1 ± 1,9	8,7 ± 2,3				7,7 ± 1,8			
Tiểu cầu (x 10 ⁹ / lít)	7	t ₀	484,9 ± 185,6	427,4 ± 145,4				>0.05		417,6 ± 61,5	>0.05
		t ₁	457,7 ± 107,0	431,0 ± 143,2						438,5 ± 104,6	
		t ₂	588,7 ± 167,4	528,3 ± 114,5						460,6 ± 91,0	
Hematocrit (%)	7	t ₀	33,9 ± 3,4	30,2 ± 9,5	>0.05		34,5 ± 1,5			>0.05	
		t ₁	33,3 ± 1,9	29,4 ± 9,7			33,4 ± 2,1				
		t ₂	32,9 ± 2,0	34,4 ± 1,4			33,3 ± 2,4				
Hemoglobin (g/dL)	7	t ₀	11,1 ± 1,0	9,8 ± 3,1		>0.05	11,3 ± 0,5		>0.05		
		t ₁	10,5 ± 0,6	9,4 ± 3,1			9,8 ± 3,4				
		t ₂	10,6 ± 0,5	11,0 ± 0,2			11,0 ± 0,5				

Ảnh hưởng của thuốc đến chức năng tạo máu được đánh giá thông qua các chỉ số huyết học như số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hàm lượng hematocrit và hemoglobin. Kết quả thực nghiệm được thể hiện trên bảng 3.

Kết quả cho thấy, trước khi thử nghiệm các thử nghiệm được kiểm tra các thông số về huyết học cho thấy không có sự khác biệt giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử (P_{C-T1} , P_{C-T2} , thời điểm $t_0 > 0,05$). không có sự khác biệt về các thông số về huyết học trước và sau 14 và 28 ngày thử nghiệm (P_{C-T1} , P_{C-T2} thời điểm $t_1, t_2 > 0,05$) giữa từng nhóm chứng và 2 nhóm thử.

Ảnh hưởng của thuốc đến chức năng gan và thận được đánh giá thông qua định lượng các chỉ số sinh hóa: hoạt độ của các men transaminase (GOT và GPT), hàm lượng bilirubin, urea, creatinin và protein toàn phần. Kết quả nghiên cứu được trình bày trên bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của VINDOXIM tới các chỉ số sinh hóa của thử nghiệm (n = 21), xét nghiệm tại 3 thời điểm: trước thí nghiệm (t_0), sau 14 ngày (t_1) và sau 28 ngày (t_2) uống thuốc.

Chỉ tiêu	n		Nhóm chứng	Nhóm T1	P_{C-T1}	Nhóm T2	P_{C-T2}						
SGOT (IU/ lit)	7	t_0	34,1 ± 15,7	28,9 ± 14,3	> 0,05	25,5 ± 19,9	> 0,05						
		t_1	33,4 ± 7,2	30,6 ± 12,9		32,5 ± 10,4							
		t_2	24,0 ± 6,1	32,4 ± 18,6		19,8 ± 4,1							
SGPT (IU/ lit)	7	t_0	50,9 ± 13,1	49,2 ± 17,8		> 0,05		48,3 ± 22,4	> 0,05				
		t_1	54,3 ± 15,3	50,4 ± 19,5				51,1 ± 19,2					
		t_2	69,4 ± 12,7	63,7 ± 13,4				55,8 ± 13,3					
Creatinin (µmol/lit)	7	t_0	93,3 ± 15,2	86,3 ± 27,3				> 0,05		100,9 ± 12,6	> 0,05		
		t_1	87,7 ± 17,3	81,5 ± 28,3						90,0 ± 18,3			
		t_2	97,0 ± 13,0	111,4 ± 10,0						107,6 ± 10,6			
Urea (mmol/lit)	7	t_0	5,7 ± 1,3	5,2 ± 2,0						> 0,05		5,9 ± 0,8	> 0,05
		t_1	4,8 ± 1,3	4,5 ± 1,7								5,2 ± 1,0	
		t_2	7,2 ± 1,4	7,7 ± 1,0								7,1 ± 0,4	
Bilirubin toàn phần (µmol/lit)	7	t_0	2,6 ± 0,3	2,2 ± 0,7	> 0,05		2,3 ± 0,2					> 0,05	
		t_1	2,5 ± 0,5	2,3 ± 0,8			2,3 ± 0,5						
		t_2	2,6 ± 0,3	2,7 ± 0,2			2,7 ± 0,3						
Protein toàn phần (g/L)	7	t_0	57,7 ± 3,0	51,4 ± 17,0		> 0,05	56,5 ± 2,4		> 0,05				
		t_1	54,9 ± 2,3	49,3 ± 16,4			57,3 ± 3,1						
		t_2	59,4 ± 2,3	60,9 ± 4,6			59,1 ± 2,8						

Trước thí nghiệm, các chỉ số sinh hóa của thử ở nhóm thử và nhóm chứng không có sự khác biệt nhau (P_{C-T1} , P_{C-T2} , thời điểm $t_0 > 0,05$). Sau 14 và 28 ngày thí nghiệm cũng không nhận thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử về các chỉ số sinh hóa này (P_{C-T1} , P_{C-T2} , thời điểm $t_1, t_2 > 0,05$).

3.2.3. Ảnh hưởng của VINDOXIM tới sự thay đổi mô bệnh học gan, thận nội tạng thử thí nghiệm

Ảnh hưởng của VINDOXIM tới sự thay đổi mô bệnh học gan, thận nội tạng thử thí nghiệm được xác định nhờ giải phẫu mô bệnh và quan sát tổng quát đại thể và vi thể tổ chức mô dưới kính hiển vi. Sau khi kết thúc thời gian cho thử uống thuốc (28 ngày), lấy ngẫu nhiên mẫu gan và thận của 3 thử trên mỗi nhóm để làm tiêu bản, mã hóa và quan sát đại và vi thể tại Bộ môn Giải phẫu sinh lý bệnh - Trường Đại học Y Hà Nội có kết quả sau.

Quan sát đại thể: sau khi mổ thử, không nhận thấy có biểu hiện khác thường về hình dạng bên ngoài, màu sắc các tổ chức tim, gan, thận, phổi, dạ dày, ruột của các thử nhóm thử so với nhóm chứng sau thí nghiệm.

Quan sát vi thể: Tiêu bản gan và thận được cố định bằng Formalin 10 %, nhuộm bằng dung dịch nhuộm Hematoxylin eosin (He) và Perioric acid Shiff (PAS). Bảng 5 trình bày các mẫu gan, thận nghiên cứu và kết quả quan sát được dưới kính hiển vi.

Bảng 5. Kết quả vi thể gan và thận của thử thí nghiệm quan sát được dưới kính hiển vi.

Cơ quan	Mã số	Nhóm chứng	Mã số	Nhóm thử 1	Mã số	Nhóm thử 2
Gan	M18	Mô gan có hình thái trong giới hạn bình thường	M1	Gan có tổn thương xơ hóa dạng ổ	M9	Hình ảnh mô gan trong giới hạn bình thường
Thận		Cầu thận sung huyết, viêm thận kẽ cục bộ		Hình ảnh thận không thấy tổn thương		Nhu mô thận trong giới hạn bình thường
Gan	M20	Mô gan có hình thái trong giới hạn bình thường	M7	Không thấy tổn thương ở gan	M13	Hình ảnh mô gan trong giới hạn bình thường
Thận		Mô thận có hình thái trong giới hạn bình thường		Hình ảnh viêm thận kẽ cục bộ		Hình ảnh nhu mô thận trong giới hạn bình thường
Gan	M21	Hình ảnh viêm gan khoảng cửa	M8	Hình ảnh viêm gan khoảng cửa	M14	Viêm gan hoại tử
Thận		Hình ảnh mô thận trong giới hạn bình thường		Hình ảnh viêm thận kẽ cục bộ		Hình ảnh mô thận trong giới hạn bình thường

Bảng 5 cho thấy, có một mẫu thận ở nhóm chứng (M18) và một mẫu thận ở nhóm uống thuốc (M8) bị xung huyết và viêm thận kẽ cục bộ. Ở các nhóm uống thuốc khác, mẫu cấu trúc thận bình thường, không có tổn thương ở thận. Các mẫu gan ở nhóm chứng (M21), ở nhóm uống thuốc (M1, M8) bị tổn thương, xơ hóa dạng ổ hoặc viêm gan khoảng cửa, mẫu gan M14 có biểu hiện viêm gan hoại tử. Kết quả giải phẫu vi thể bệnh học cho thấy có cả những triệu chứng viêm trên mẫu gan thận thử ở nhóm chứng, như vậy có khả năng các nhóm thử thí nghiệm chưa phải ở điều kiện hoàn toàn khỏe mạnh.

4. KẾT LUẬN

Trong thử nghiệm này, chúng tôi đã xác định được liều gây chết 50 % chuột nhắt trắng chủng Swiss qua đường uống LD₅₀ của hoạt chất indirubin-3'-oxime có giá trị > 12,0 g mẫu thử/kg chuột. Theo phân loại độc tính của GHS, những chất có giá trị độc tính cấp LD₅₀ trong khoảng > 5000 mg/kg thể trọng, được coi là chất gần như không độc. Do vậy, có thể kết luận hoạt chất indirubin-3'-oxime gần như không độc.

Thử độc tính bán trường diễn, sau khi cho thỏ uống hỗn dịch thuốc VINDOXIM liên tục trong 28 ngày với mức liều 7,2 mg hoạt chất (0,036 viên)/kg thỏ/ngày và 21,6 mg (0,108 viên)/kg thỏ/ngày, chúng tôi nhận thấy không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê về chỉ sinh hóa và huyết học giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử ở các thời điểm xét nghiệm. Sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc, toàn bộ thỏ thí nghiệm ở nhóm chứng và 2 nhóm thử tăng cân đều và không có sự khác biệt về mức độ gia tăng trọng lượng thỏ giữa nhóm chứng và các nhóm uống thuốc ($p > 0,05$). Trong 4 tuần liên tục, tất cả các chỉ số theo dõi về tình trạng chung, chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận đều nằm trong giới hạn bình thường và không có sự khác biệt rõ rệt so với nhóm chứng. Quan sát đại thể, không nhận thấy sự bất thường về màu sắc và hình dạng bên ngoài của các tổ chức tim, gan, thận, phổi và hệ tiêu hóa giữa các thỏ nhóm chứng và 2 nhóm thử sau thí nghiệm.

Lời cảm ơn. Các tác giả cảm ơn Sở Khoa học Công nghệ Hà Nội (Đề tài số 01C-08/11-2011-2) và Bộ Khoa học và Công nghệ (52/2011/HĐ-NĐT) đã tài trợ thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Laurent M., Nicole G., Leandros A. S., Gerhard E. - *Indirubin, the red shade of indigo*, Roscoff: Life, progress editions, France, 2006, p. 135-156.
2. Nguyen Manh Cuong, Bui Huu Tai, Dang Hoang Hoan, Tran Thu Huong, Young Ho Kim, Jae-Hee Hyun, Hee-Kyoung Kang - Inhibitory Effects of Indirubin Derivatives on the Growth of HL-60 Leukemia Cells, *Natural Product Communications*, **5** (1) (2010) 103-106.
3. Kameswaran T. R., Ramanibai R. - Indirubin-3-monoxime induced cell cycle arrest and apoptosis in Hep-2 human laryngeal carcinoma cells, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **63** (2) (2009) 146-154.
4. Frank G. E. Perabo, Gregor Landwehrs, Christian Frössler, Doris H. Schmidt, Mueller S. C. - Antiproliferative and apoptosis inducing effects of indirubin-3'-monoxime in renal cell cancer cells, *Urologic Oncology: Seminar and Original Investigations* **29** (2011) 815-820.
5. Amel C., Sandrine K. G., Regine C., Chien W. W., Valerie M., Carine D., Cedric B., Isabelle T., Martine F. - Indirubin derivatives inhibit malignant lymphoid cell proliferation, *Leukemia & Lymphoma* **50** (12) (2009) 2049-2060.
6. Jie Shi, Han-Ming Shen – Critical role of Bid and Bax in indirubin-3'-monoxime – induced apoptosis in human cancer cells, *Biochemical Pharmacology* **75** (2008) 1729-1742.
7. Nguyễn Mạnh Cường, Hồ Việt Đức, Nguyễn Văn Tài, Phạm Ngọc Khanh, Trần Thu Hương, Vũ Thị Hà, Nguyễn Thị Bích Thảo - Cải tiến phương pháp tổng hợp indirubin-3'-

- oxim từ bột chàm giàu indirubin và ứng dụng tạo chế phẩm hỗ trợ điều trị bệnh ung thư, Tạp chí Hóa học **50** (5A) (2012) 320-322.
8. Wallace Hayes A. - Principles and Method of Toxicology, 4th Edition, Taylor & Francis, Philadenphia, 2001.
 9. Abraham W. B. - Techniques of animal and clinical toxicology, Med. Pub. Chicago 1978, pp. 55-68.
 10. Bộ Y tế - Quy chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực thuốc cổ truyền, Quyết định QĐ 371/BYT-QĐ ngày 12/3/1996.
 11. Đỗ Tất Lợi - Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học, 2001.
 12. Đỗ Trung Đàm - Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc, Nhà xuất bản Y học, 1996.
 13. OECD - Test Guideline for the Testing of Chemicals / Section 4: Health Effects Test No. 425: Acute oral toxicity – Up and Down procedure, 2001.
 14. OECD - Test Guideline for the Testing of Chemicals. Repeated dose 28-day Oral toxicity Study in Rodents, OECD 407, 2008.
 15. WHO - Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines, Manila, Phillipin. 1993. p.35.
 16. WHO - General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine, 2000.

ABSTRACT

CHRONIC AND SUB-CHRONIC TOXICITY OF INDIRUBIN-3'-OXIME AND THE SOFT CAPSULE VINDOXIM FOR SUPPORT OF CANCER TREATMENT

Nguyen Manh Cuong^{1,*}, Pham Ngoc Khanh¹, Tran Thu Huong¹, Nguyễn Ngọc Hiếu¹,
Ho Viet Duc¹, Vu Thi Ha¹, Nguyen Van Tai¹, Nguyen Thi Hong Vinh²

¹*Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi*

²*National Institute of Drug Quality Control, 48 Hai Ba Trung, Hanoi*

*Email: nmcuong_inpc@yahoo.com.vn

Indirubin-3'-oxime, a semisynthesized derivative of indirubin-rich *Indigo naturallis*, is a selective and potent inhibitor of cyclin-dependent kinases (CDKs) and can induce apoptosis and tumor cell death in several human cancer cell lines. From indirubin-3'-oxime, soft capsule VINDOXIM, a functional product is made for elimination of cancer causing agents, promoting of the apoptosis process of cancer cells, and prevention as well as support for the cancer treatment. The acute oral toxicity test on rats has shown that indirubin-3'-oxime is well tolerated up to LD₅₀ 12.0 g/kg body weight/day oral dosage level and non-toxic to mice under the present experimental conditions. The LD₀ (Infralethal Dose) of indirubin-3'-oxime is 10.0 g/kg body weight. The chronic toxicity study was carried out on rabbits with the oral dosage of indirubin-3'-oxime from 7.2 mg/kg – 21.6 mg/kg body weight/day for 28 days. The results showed that

indirubin-3'-oxime did not induce death or adverse effects in activity, feed consumption or body weight gain. There were not significant changes in heamotology and biochemical parameters between control and experiment rabbit groups.

Keywords: VINDOXIM, indirubin-3'-oxime, chronic and subchronic toxicity, *Strobilanthes cusia*