

PRELIMINARY TESTING OF THE BIOLOGICAL AND IMMUNE-STIMULATING EFFECTS OF PIDOTIMOD MADE IN VIETNAM ON LABORATORY ANIMALS

Nguyen Van Ru

Trung Vuong University

Email: rutsgvcnguyenvan@gmail.com

Received: 28/10/2024; Reviewed: 18/02/2025; Revised: 11/3/2025; Accepted: 22/3/2025

DOI: <https://doi.org/10.58902/tcnckhpt.v4i1.185>

Abstract: *Research on the immunostimulatory biological effects of Pidotimod produced in Vietnam on experimental animals. The research team evaluated several biological effects of the preparation on experimental animals. The testing methods were conducted according to standard procedural guidelines and biological clearance assessment methods. The obtained results include: Assessment of the effects of Pidotimod on certain biological processes, such as weight gain in mice, relative reduction in spleen weight, relative increase in thymus weight, and increase in white blood cell count. Notably, the study assessed the immunostimulatory effects on specific organs and immune system cells, including macrophage function in the mononuclear phagocyte system. Additionally, the study proposed the mechanism of action of Pidotimod in immune recovery and regulation when mice can be immunosuppressed by cyclophosphamide (CY).*

Keywords: *Macrophages; Endothelial reticulum; Pidotimod; Immune effects; Mononuclear cells; Spleen weight; Thymus weight.*

1. Đặt vấn đề

Pidotimod một hợp chất có tác dụng điều hòa miễn dịch, đã được nghiên cứu cơ bản và triển khai ứng dụng ở Đức và một số nước ở châu Âu vào năm 1994 bởi các tác giả Migliorati, Nicoletti và Riccardi (1994). Ở Việt Nam các nhà khoa học về dược đã tiến hành tổng hợp và xác định các tiêu chuẩn để triển khai bào chế thuốc. Một trong những nhiệm vụ của nhóm nghiên cứu là tiến hành thử nghiệm, đánh giá một số tác dụng sinh học của chế phẩm trên động vật thực nghiệm, nhằm mục tiêu: Đánh giá được ảnh hưởng của Pidotimod sản xuất tại Việt Nam đến một số quá trình sinh học như: trọng lượng chuột, trọng lượng tương đối lách, ức; số lượng bạch cầu; tác dụng kích thích miễn dịch trên chức năng đại thực bào của hệ lưới nội mô của Pidotimod sản xuất trong nước.

2. Tổng quan nghiên cứu

Pidotimod là hợp chất tổng hợp hóa dược đang được nghiên cứu trong những năm gần đây, chưa có trong danh mục các chuyên luận của Dược điển Việt Nam 5 (Bộ Y tế, 2017). Pidotimod là một hợp chất có tác dụng điều hòa miễn dịch (Cương và cộng sự, 2015). Hợp chất

này đã được nghiên cứu tổng hợp lần đầu tiên ở Đức và đăng tải bởi các tác giả trên tạp chí Arzneimittel Forschung Drug Research (Coppi và cộng sự, 1994). Tác dụng điều hòa miễn dịch của Pidotimod đã được công bố lần đầu tiên bởi tác giả Migliorati vào năm 1994. Sau đó, các tác giả Migliorati, Nicoletti và Riccardi (1994) đã có báo cáo kết quả ban đầu nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng về tác dụng sinh học và thử nghiệm tiền lâm sàng. Từ những kết quả nghiên cứu được công bố cho thấy Pidotimod có tác dụng điều hòa miễn dịch và đang được triển khai để sản xuất thuốc kháng virus, hỗ trợ điều trị ung thư. Để chuẩn bị ứng dụng và triển khai sản xuất thuốc này ở Việt Nam, nhóm nghiên cứu đã tiến hành sinh tổng hợp chế phẩm Pidotimod đạt tiêu chuẩn cơ sở theo đề cương của đề tài cấp Bộ Y tế. Báo cáo phân tổng hợp chất và thử nghiệm tiền lâm sàng của của chế phẩm Pidotimod sản xuất tại Việt Nam cũng đã được tiến hành công bố để chuẩn bị cho việc đăng kí sản xuất chế phẩm thuốc này (Nguyễn Văn Rư, Quách Thị Hà Vân, 2015). Do đó, trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiến hành đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch trên một số cơ quan và tế bào của hệ miễn dịch như chức

năng đại thực bào trên lưới nội mô của tế bào đơn nhân.

3. Nguyên vật liệu và đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu:

Pidotimod được nghiên cứu sản xuất tại Labo Hóa sinh - trường Đại học Dược Hà Nội đạt độ tinh khiết 99,99% và không có các tạp chất của tiền chất trong quá trình sản xuất (Phương pháp kiểm nghiệm: Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam (Bộ Y tế, 2017).

Hóa chất: NaCl 0,90%, Cyclophosphamid (CY), mực Pelikan 4001 (nguồn gốc Trung Quốc), nước cất 2 lần, các hóa chất đạt tiêu chuẩn dùng trong nghiên cứu y sinh (Bộ Y tế, 2017).

Thiết bị nghiên cứu: Máy đo quang UV-Vis U-5100 (Nhật Bản), Thiết bị xét nghiệm sinh hóa - bán tự động - model-chem touch (Ấn Độ) thuộc labo Hóa sinh. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Phòng nuôi chuột thuộc Labo dược lý, các Labo và các dụng cụ thí nghiệm thuộc trường Đại học Dược Hà Nội đều đạt tiêu chuẩn GLP.

Động vật thí nghiệm: Thí nghiệm được tiến hành trên chuột nhắt trắng do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp, đạt tiêu chuẩn nghiên cứu y sinh của Bộ Y tế.

Tổ chức thử nghiệm:

Chuột được chia thành 4 lô, mỗi lô 8 con như sau:

- Lô chứng sinh học: Sử dụng nước muối sinh lý (NaCl 0,90%) + Không gây suy giảm miễn dịch (SH)
- Lô chứng âm: Sử dụng nước muối sinh lý + 120 mg/kg Cyclophosphamid (CY)
- Lô thử 1 (P1): Liều thử 200 mg/kg: Pidotimod 200 mg/kg + CY
- Lô thử 2 (P2): Liều thử 400 mg/kg: Pidotimod 400 mg/kg + CY

Đến ngày thứ 13, tất cả chuột được tiêm tĩnh mạch mực pelikan.

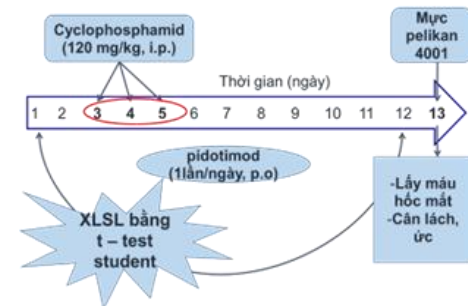
Nội dung nghiên cứu

- Theo dõi sự biến đổi trọng lượng cơ thể trong quá trình thử nghiệm.
- Xác định trọng lượng lách tương đối.
- Ảnh hưởng của Pidotimod lên trọng lượng tuyến ức tương đối của chuột thí nghiệm.
- Ảnh hưởng của Pidotimod lên số lượng bạch cầu ngoại vi.
- Ảnh hưởng của Pidotimod lên chức năng đại

thực bào của lưới nội mô.

Phương pháp nghiên cứu

Hình 1. Sơ đồ quy trình tiến hành thử nghiệm



Dựa trên phương pháp nghiên cứu của Migliorati và cộng sự (1994) với Pidotimod và một số nghiên cứu gần đây trên hệ miễn dịch của các thuốc khác, nhóm tác giả tiến hành nghiên cứu tác dụng của Pidotimod sản xuất tại Việt Nam như sau:

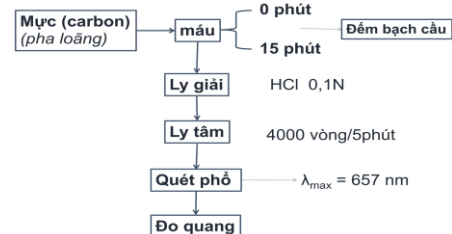
Cho chuột thí nghiệm sử dụng Pidotimod trong vòng 12 ngày liên tiếp, với 2 mức liều là 200 và 400 mg/kg.

Vào ngày thứ 3, 4, 5 tiến hành tiêm CY phức tạp với liều 120 mg/kg để gây suy giảm miễn dịch ở các lô chứng âm, lô thử; Lô chứng sinh học, tiêm nước muối sinh lý thay cho CY.

Đến ngày thứ 13, tất cả chuột được tiêm tĩnh mạch mực pelikan có thành phần là carbon pha loãng với nước muối sinh lý với tỷ lệ 1/8 (nhóm trắng, không tiêm mực). Sau đó 0 phút và 15 phút, lấy máu ở hốc mắt. Bóc tách các cơ quan như lách, ức để cân và tính trọng lượng tương đối của nhóm thử so với nhóm chứng sinh học.

Phương pháp đánh giá độ thanh thải

Hình 2. Sơ đồ đánh giá độ thanh thải



Sau khi lấy máu, một phần dùng để đếm bạch cầu bằng máy tự động, phần còn lại đem ly giải bằng HCl 0,1 N sau đó ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút, trong 5 phút lấy lớp nước trong ở trên để đo quang. Tiến hành quét phổ với mẫu trắng không tiêm, thu được $\lambda_{\max} = 657$ nm. Tiến hành đo quang với các mẫu còn lại ở bước sóng 657 nm, tính độ thanh thải của các lô thí nghiệm.

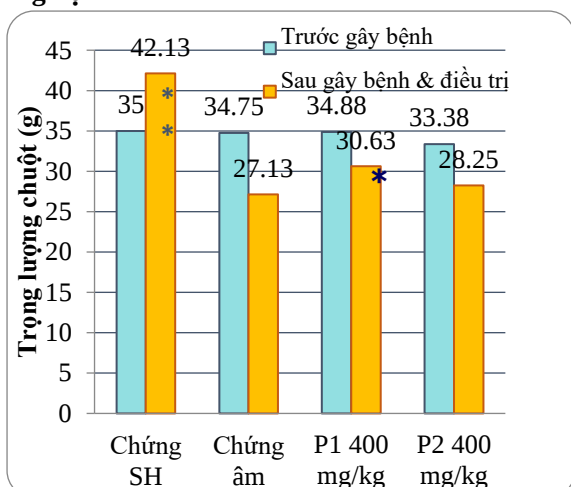
Phương pháp tính toán thống kê: Sử lý số liệu bằng T-test student bởi phần mềm Excel 16.0, sự khác nhau có ý nghĩa thống kê nếu $p < 0,05$.

4. Kết quả nghiên cứu

4.1 Sự biến đổi trọng lượng cơ thể

Tiến hành nuôi chuột theo phương pháp chuẩn của Viện Vệ sinh dịch tễ và thử thuốc để đánh giá các ảnh hưởng trên các quá trình sinh học. Sau điều trị (thử thuốc) cân các chuột bằng cân kỹ thuật có độ chính xác 0,01g, thu được kết quả trình bày trên hình 3.

Hình 3. Kết quả đo trọng lượng chuột sau thử nghiệm



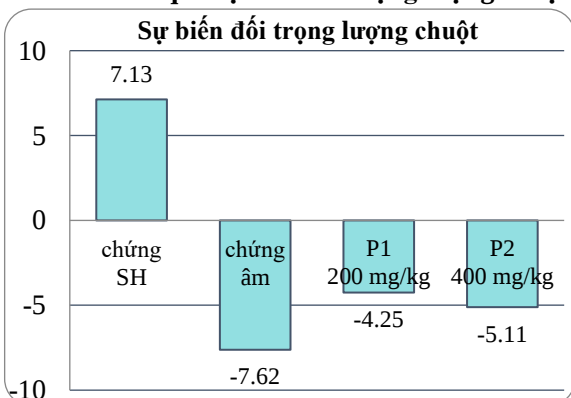
Ghi chú: (*) là kí hiệu sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các lô trước và sau thí nghiệm.

Kết quả hình 3 cho thấy sau thí nghiệm, trọng lượng trước và sau tiêm CY đã có sự thay đổi ngược chiều giữa lô chứng SH và các lô chứng âm, P1, P2.

4.2 Sự biến đổi trọng lượng chuột

Sự biến đổi trọng lượng = (trọng lượng sau điều trị - trọng lượng trước khi tiêm CY).

Hình 4. Kết quả sự biến đổi trọng lượng chuột



Kết quả hình 4 cho thấy, trước khi tiêm CY, trọng lượng chuột ở các nhóm khác nhau không đáng kể (không có ý nghĩa thống kê). Sau khi gây suy giảm miễn dịch, trọng lượng của các nhóm chuột đã có sự thay đổi. Trong khi trọng lượng của nhóm chứng sinh học tăng, thì trọng lượng của các nhóm khác đều giảm so với ban đầu. Do đó Pidotimod làm tăng trọng lượng chuột so với nhóm chứng âm, đặc biệt ở liều 200 mg, sự tăng này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

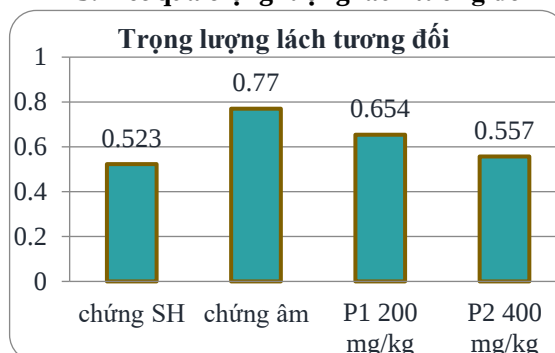
4.3 Trọng lượng lách tương đối

Công thức tính trọng lượng lách tương đối:

$$\text{Trọng lượng lách tương đối} = \frac{\text{Trọng lượng lách}}{\text{Trọng lượng chuột}} \times 100\%$$

Được sử dụng trọng lượng lách tương đối để làm giảm sự phụ thuộc của lách vào trọng lượng chuột. Vùng tủy trắng của lách là nơi trú ngụ của các tế bào lympho nên bị ảnh hưởng nhiều của CY. Kết quả trọng lượng lách tương đối của các nhóm chuột được trình bày trên hình 5.

Hình 5. Kết quả trọng lượng lách tương đối

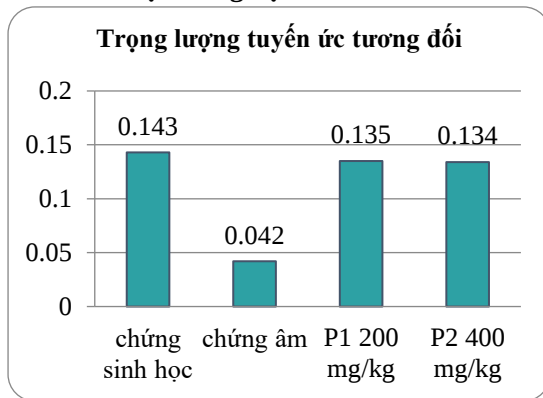


Kết quả hình 5 cho thấy có thể CY làm tăng đáng kể trọng lượng lách tương đối (32%) của nhóm chứng âm so với nhóm chứng sinh học. Các nhóm sử dụng Pidotimod cũng có tăng nhưng tăng ít hơn so với nhóm chứng âm, chứng tỏ Pidotimod có tác dụng làm hạn chế sự gia tăng trọng lượng lách của CY. Đặc biệt lô Pidotimod 400 (P2) làm giảm trọng lượng lách đáng kể (28%) so với lô chứng âm, trở về gần mức bình thường của lô chứng sinh học.

4.4 Ảnh hưởng của Pidotimod lên trọng lượng tuyến ức tương đối của chuột thí nghiệm

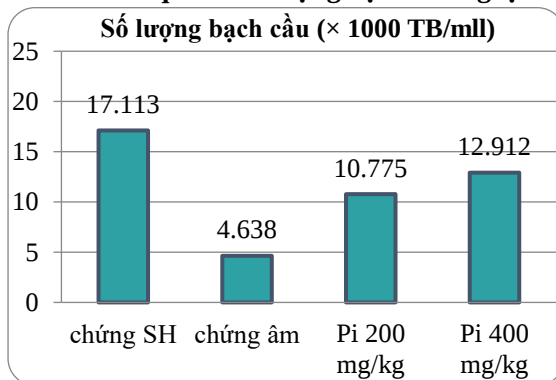
Tương tự như tiến hành đối với lách, tính trọng lượng ức tương đối của các nhóm chuột để đánh giá tác dụng của Pidotimod.

$$\text{Trọng lượng ức tương đối} = \frac{\text{Trọng lượng ức}}{\text{Trọng lượng chuột}} \times 100\%$$

Hình 6. Kết quả trọng lượng tuyến ức tương đối của chuột thí nghiệm

Kết quả hình 6 chỉ ra rằng: trọng lượng tuyến ức của nhóm chứng âm chỉ gần bằng 1/3 trọng lượng tuyến ức của nhóm chứng sinh học. Các nhóm sử dụng Pidotimod có trọng lượng tuyến ức xấp xỉ bằng nhóm chứng sinh học. Như vậy, Pidotimod ở cả 2 mức liều đều có khả năng giúp khôi phục trọng lượng lách tương đối ở chuột bị suy giảm miễn dịch về mức bình thường.

4.5. Ảnh hưởng của Pidotimod lên số lượng bạch cầu ngoại vi

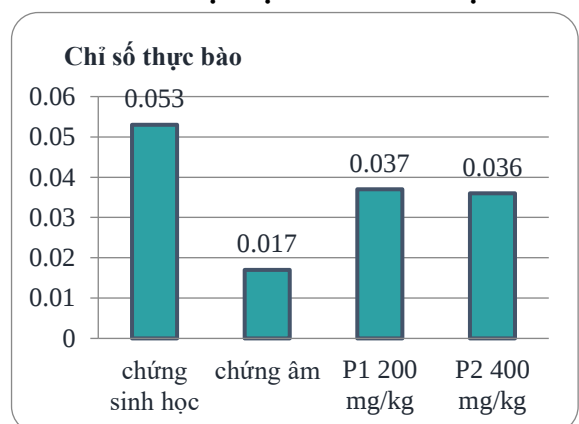
Hình 7. Kết quả về số lượng bạch cầu ngoại vi

Kết quả hình 7 chỉ ra rằng CY làm giảm số lượng bạch cầu của nhóm chứng âm xuống 3,5 lần so với nhóm chứng sinh học và Pidotimod ở cả 2 mức liều đã làm tăng số lượng bạch cầu lên khoảng 2 lần so với nhóm chứng âm, tuy nhiên vẫn chưa thể đạt như mức bình thường và việc dùng liều 400 mg/kg ở lô P2 giúp tăng số lượng bạch cầu cao hơn so với lô P1. Tuy nhiên sự khác nhau về số lượng bạch cầu giữa 2 lô này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

4.6. Ảnh hưởng của Pidotimod lên chức năng đại thực bào của lưới nội mô

Đại thực bào lưới nội mô có nhiệm vụ quan trọng là thực bào và tiêu hóa kháng nguyên, sau

đó truyền thông tin di truyền kháng nguyên cho các tế bào lympho để tạo trí nhớ miễn dịch. Vì vậy, nghiên cứu này đánh giá chức năng thực bào của các tế bào đơn nhân lưới nội mô thông qua chỉ số thực bào sau khi đưa kháng nguyên lạ là Carbon vào máu. Công thức tính chỉ số thực bào như sau: nồng độ carbon trong máu cao (OD cao) sau 15 phút thì chỉ số thực bào càng thấp, tức là khả năng bắt giữ các hạt carbon của các tế bào đơn nhân càng thấp. Kết quả về chỉ số đại thực bào của lưới nội mô của các lô chuột được thể hiện trên hình 8.

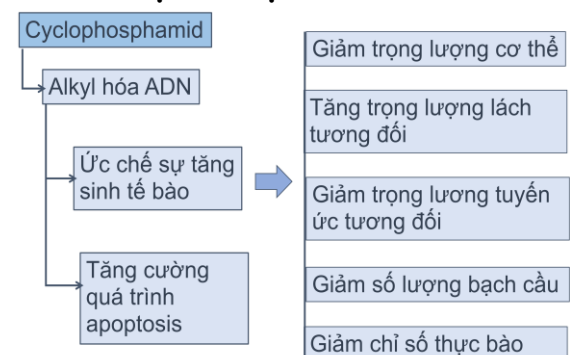
Hình 8. Chỉ số đại thực bào của lưới nội mô

Kết quả hình 8 cho thấy: chỉ số thực bào của lô chứng âm bằng khoảng 1/3 so với lô chứng sinh học. Pidotimod ở nhóm P1 200 mg/kg làm tăng chỉ số này lên khoảng 2 lần so với nhóm chứng âm và khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), có nghĩa là Pidotimod làm tăng chức năng của đại thực bào đơn nhân lưới nội mô.

5. Bàn luận

5.1 Cyclophosphamid ảnh hưởng đến một số quá trình sinh học

Hình 9 trình bày ảnh hưởng của CY đến một số quá trình sinh học miễn dịch:

Hình 9. Ảnh hưởng của CY đến một số quá trình sinh học miễn dịch

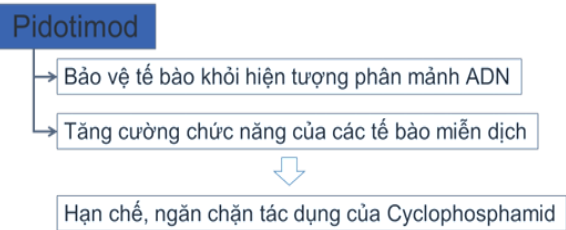
Hình 9 chỉ ra rằng kết quả thử nghiệm Pidotimod trên chuột thực nghiệm đã có tác động đến một số quá trình sinh học và miễn dịch như độ giảm trọng lượng (hình 3, 4), sự tăng trọng lượng lách tương đối (hình 5), sự giảm số lượng bạch cầu (hình 6), độ giảm trọng lượng tuyến ức (hình 7), giảm chỉ số đại thực bào của lưới nội mô (hình 8), có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$. Như vậy, vai trò gây suy giảm miễn dịch của CY đạt yêu cầu mong muốn của nghiên cứu.

5.2 Ảnh hưởng của Pidotimod và mực pelikan 4001 đến giải phẫu của các tổ chức lách và ức

Hình 10 chỉ ra rằng kết quả thử nghiệm Pidotimod trên chuột thực nghiệm đã có tác động đến một số quá trình sinh học và miễn dịch như độ giảm trọng lượng (hình 3, 4), sự tăng trọng lượng lách tương đối (hình 5), độ giảm trọng lượng tuyến ức (hình 7), giảm chỉ số đại thực bào của lưới nội mô (hình 8), có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$, trừ trường hợp sự giảm số lượng bạch cầu (hình 6), tuy mức phục hồi lượng bạch cầu chưa đạt mức có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), nhưng cũng đã có cải thiện đáng kể ở mức liều Pidotimod 400mg/kg. Kết quả nghiên cứu thu được chứng tỏ Pidotimod đã có vai trò phục hồi có hiệu quả chuột bị suy giảm miễn dịch bởi CY với mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$. Như vậy có thể đề xuất cơ chế tác dụng của Pidotimod là có khả năng phục hồi, điều hòa miễn dịch khi chuột

bị gây suy giảm miễn dịch bởi CY. Cơ chế tác dụng của Pidotimod được trình bày tóm tắt trên hình 10.

Hình 10. Đề xuất cơ chế tác dụng, ảnh hưởng của Pidotimod là có khả năng phục hồi, điều hòa miễn dịch khi chuột bị gây suy giảm miễn dịch bởi CY



6. Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá được ảnh hưởng của Pidotimod đến một số quá trình sinh học về: mức độ tăng trọng lượng chuột, độ giảm trọng lượng lách tương đối, mức độ tăng trọng lượng tuyến ức tương đối, mức độ tăng số lượng bạch cầu. Bước đầu đã đánh giá được tác dụng kích thích miễn dịch trên một số cơ quan và tế bào của hệ miễn dịch như chức năng đại thực bào trên lưới nội mô của tế bào đơn nhân.

Kết quả nghiên cứu cũng đề xuất cơ chế tác dụng, ảnh hưởng của Pidotimod là có khả năng phục hồi, điều hòa miễn dịch khi chuột bị gây suy giảm miễn dịch bởi CY.

Tài liệu tham khảo

Bo Y te, (2017). *Duoc dien Viet Nam V*. Ha Noi: Nxb Y học.

Cuong, N. V. & Ru, N. V. (2015) Tong quan ve Pidotimod (chat moi lam thuoc co tac dung bien doi dap ung sinh hoc) trien vong nghien cuu va ung dung o nuoc ta (Khoa luan tot nghiep Duoc si, Truong Dai hoc Duoc Ha Noi).

Ru, N. V. & Van, Q. T. H. (2015). Thu nghien tac dung kích thích mien dich cua Pidotimod tong hop tren dong vat thi nghiem, *Tap chi duoc hoc*, 55(5), 26-31.

Coppi, G. & Manzardo, S. (1994). "Experimental immunological screening tests on Pidotimod.

Arzneimittel-Forschung Drug Research, 44(12A), 1411-1416.

Migliorati, G., D'Adamio, L., Coppi, G., Nicoletti, I., & Riccardi, C. (1992). Pidotimod stimulates natural killer cell activity and inhibits thymocyte cell death. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 14(4), 737-748. <https://doi.org/10.3109/08923979209009231>.

Migliorati, G., Nicoletti, I., & Riccardi, C. (1994), Immunomodulating activity of Pidotimod. *Arzneimittel Forschung Drug Research*, 44(12a), 1421-1424.

THỬ NGHIỆM ĐÁNH GIÁ BƯỚC ĐẦU TÁC DỤNG SINH HỌC VÀ KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH CỦA PIDOTIMOD SẢN XUẤT TẠI VIỆT NAM TRÊN ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM

Nguyễn Văn Rư

Trường Đại học Trung Vương

Email: rutsgvcnguyenvan@gmail.com

Ngày nhận bài: 28/10/2024; Ngày phản biện: 18/02/2025; Ngày tác giả sửa: 11/3/2025;

Ngày duyệt đăng: 22/3/2025

DOI: <https://doi.org/10.58902/tcnckhpt.v4i1.185>

Tóm tắt: Nghiên cứu đánh giá tác dụng sinh học kích thích miễn dịch của Pidotimod sản xuất tại Việt Nam trên động vật thí nghiệm. Nhóm nghiên cứu đánh giá một số tác dụng sinh học của chế phẩm trên động vật thực nghiệm. Các phương pháp thử nghiệm được thực hiện theo sơ đồ quy trình chuẩn và phương pháp đánh giá độ thanh thải sinh học. Kết quả đã thu được gồm: Đánh giá được ảnh hưởng của Pidotimod đến một số quá trình sinh học về mức độ tăng trọng lượng chuột, độ giảm trọng lượng lách tương đối, mức độ tăng trọng lượng tuyến ức tương đối, mức độ tăng số lượng bạch cầu. Đặc biệt, đánh giá được tác dụng kích thích miễn dịch trên một số cơ quan và tế bào của hệ miễn dịch như chức năng đại thực bào trên lưới nội mô của tế bào đơn nhân. Đồng thời, đề xuất được cơ chế tác dụng của Pidotimod về khả năng phục hồi, điều hòa miễn dịch khi chuột bị gây suy giảm miễn dịch bởi CY.

Từ khóa: Đại thực bào; Lưới nội mô; Pidotimod; Tác dụng miễn dịch; Tế bào đơn nhân; Trọng lượng lách; Trọng lượng tuyến ức.