

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH BÁN CẤP CỦA GEL NANO BERBERIN TRÊN CẬN LÂM SÀNG VÀ GIẢI PHẪU BỆNH Ở CHUỘT CỐNG TRẮNG

Nguyễn Ngọc Tuấn¹, Lê Quốc Chiêu¹, Nguyễn Thùy Linh²

¹Bệnh viện Bỏng quốc gia Lê Hữu Trác

²Bộ môn Giải phẫu bệnh, Học viện Quân Y

TÓM TẮT

Berberin được phân lập từ cây *Coscinium fenestratum* và một số cây trong họ *Ranunculaceae* có tác dụng chữa vết thương do bỏng. Nghiên cứu xác định độc tính bán cấp tính của gel nano Berberine do Bệnh viện Bỏng Quốc gia sản xuất qua đường uống ở chuột cống trắng; theo mô hình của OECD 423, 2008. Tiến hành trên 30 con chuột, chia thành 3 nhóm, nhóm thử liều 1 uống liều 3,5g/1kg/24h, nhóm thử liều 2 uống 10,5g/1kg/24h, nhóm chứng uống nước cất với liều 10,2ml/1kg/24h. Uống các liều liên tục trong 28 ngày. Đánh giá các biến đổi trên cận lâm sàng và giải phẫu bệnh của gan, lách và thận.

Kết quả: Không có rối loạn bất thường về xét nghiệm sinh hóa và huyết học. Trên cấu trúc vi thể của gan, lách và thận không gặp hình ảnh tổn thương.

Kết luận: Gel nano Berberin an toàn khi cho chuột cống uống trong 28 ngày với liều 3,5g/1kg/24h và 10,5g/1kg/24h.

Từ khóa: Nano Berberin, chuột cống trắng, độc tính bán cấp

ABSTRACT

Berberine is isolated from *Coscinium fenestratum* and several *Ranunculaceae* plants and it has been demonstrated to have therapeutic properties on the burn wound. The purpose of the study determined the subacute clinical toxicity of nano Berberine gel produced by the National Burn Hospital orally in rats.

Methods: The research was carried out according to The OECD 423, 2008 model. Conducted on 30 rats, divided into 3 groups, the test group administered Dose 1 3.5g/1kg/24h, the group tested Dose 2 drank 10.5g/1kg/24h, the control group administered distilled water Dose 10.2ml/1kg/24h. Taking the doses continuously for 28 days. Subclinical and pathological abnormalities in the livers, spleens, and kidneys were evaluated.

¹Chịu trách nhiệm: Nguyễn Ngọc Tuấn, Bệnh viện Bỏng quốc gia Lê Hữu Trác

Email: ngoctuan64@gmail.com

Ngày nhận bài: 30/6/2022; Ngày nhận xét: 24/8/2022; Ngày duyệt bài: 30/8/2022

DOI: <https://doi.org/10.54804/yhthvb.3.2022.145>

Results: *There were no abnormal alterations in biochemical and hematological tests. There were no lesions on the microstructure of the livers, spleens, or kidneys.*

Conclusion: *Berberine nano gel was clinically safe when given to rats orally for 28 days between 3.5g/1kg/24h and 10.5g/1kg/24h.*

Keywords: *Nano Berberine, rats, subacute toxicity*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiệu quả điều trị và an toàn là hai tiêu chí cơ bản để bất kỳ một loại thuốc nào cũng phải đáp ứng. Đối với thuốc điều trị tại chỗ vết thương, vết bỏng; tiêu chuẩn lý tưởng cần đạt là: *an toàn* (Không gây đau hoặc ít đau; Không gây dị ứng tại chỗ hay toàn thân; Không có các tác dụng phụ; Không gây hại cho mô lành, tế bào lành); *hiệu quả kháng khuẩn* (tác dụng với các vi khuẩn gây nhiễm khuẩn; Có khả năng thấm sâu vào vết bỏng); tạo thuận lợi cho liền vết thương; Dễ sử dụng, bảo quản; nguồn dược liệu phong phú, giá thành hạ.

Berberin được tách chiết từ cây vàng đắng và một số cây thuộc họ hoàng liên *Ranunculaceae*, có nhiều tác dụng điều trị. Berberin được sử dụng điều trị nhiều bệnh lý, nổi bật là nhiễm khuẩn đường ruột, vết thương, vết bỏng. Berberin nổi tiếng, được coi như một kháng sinh thực vật. Ưu thế thuốc kháng khuẩn từ thực vật như berberin bao gồm *Phổ tác dụng rộng*, *Tác dụng bền* (đã dùng từ lâu nhưng vẫn hiệu quả), *Ít độc* (dùng được vết bỏng diện rộng (toàn thân), kéo dài, không có chống chỉ định (trừ cực hiếm dị ứng), điều trị được cho trẻ sơ sinh, và phụ nữ có thai), *Chống viêm*, *hạ sốt*, *giảm đau*, do đó đắp vết thương làm mát, hạ sốt; *Kích thích liền vết thương* (thuốc sát khuẩn từ hoá chất như Betadin, Bạc không có tác dụng này, hoặc

gây đau, không thể có hạ sốt). Ngoài ra, Berberin còn có tác dụng chống ung thư và hạ đường huyết [1, 2].

Một xu hướng hiện nay là nghiên cứu bào chế các thuốc có nguồn gốc thực vật ứng dụng công nghệ nano. Ứng dụng bào chế thảo dược dưới dạng hệ tiểu phân nano có nhiều ưu điểm: a - Tăng tác dụng của thuốc do các NP có kích thước nhỏ làm tăng diện tích tiếp xúc với tế bào đích, đồng thời làm tăng khả năng hòa tan, tăng thời gian tác dụng (các NP giải phóng thuốc từ từ và kéo dài); b - Tăng độ ổn định của thuốc. c - Tăng tính an toàn [3].

Chúng tôi đã nghiên cứu hiện đại hóa thuốc Berberin bằng ứng dụng công nghệ nano trong bào chế Berberin ở dạng mới (gel). Gel nano Berberin đã khắc phục nhược điểm của dung dịch Berberin thường; đạt tiêu chuẩn cơ sở. Chúng tôi đã tiến hành đánh giá độc tính cấp để tìm LD₅₀. Tiếp theo, chúng tôi tiến hành đánh giá độc tính bán cấp của gel nano Berberin theo hướng dẫn của WHO và OECD để làm cơ sở cho phép tiến hành những bước tiếp theo cho ứng dụng trên lâm sàng.

Theo OECD 423, 2008, trong thử nghiệm độc tính bán cấp tính (nghiên cứu liều lượng lặp lại), chất thử được sử dụng cho động vật trong một tháng hoặc ít hơn, đánh giá tác động sinh hóa và bệnh lý sau 14 - 28 ngày tiếp xúc [4, 5]. Đây là

một bước đi bắt buộc đối với một chế phẩm mới để có thể ứng dụng trên lâm sàng [6].

Chúng tôi đã công bố đánh giá độc tính bán cấp trên khía cạnh lâm sàng. Trong phạm vi bài báo này, chúng tôi tiến hành đánh giá độc tính bán cấp trên khía cạnh các biểu hiện cận lâm sàng và giải phẫu bệnh động vật thực nghiệm.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và đối tượng nghiên cứu

- **Chế phẩm nghiên cứu:** Chế phẩm Gel nano Berberin đạt tiêu chuẩn cơ sở, do Bệnh viện Bông Quốc gia cung cấp.

- **Động vật thí nghiệm:** Chuột cống trắng đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, trọng lượng cơ thể từ 150 - 200 gram số lượng 30 con. Tất cả động vật thí nghiệm được nuôi dưỡng trong điều kiện phòng thí nghiệm [5, 6].

Cụ thể: Ăn thức ăn theo tiêu chuẩn thức ăn cho động vật nghiên cứu, nước (đun sôi để nguội) uống tự do. Động vật nghiên cứu được nuôi trong chuồng riêng để tránh lây chéo có thể xảy ra theo đường hô hấp và tiếp xúc. Nhiệt độ phòng $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, độ ẩm: 50 - 60%, thời gian ngày đêm (12/12 giờ) xen kẽ: 12/12 giờ. Hàng ngày theo dõi ghi chép diễn biến kết quả thí nghiệm.

- Trang thiết bị:

Máy xét nghiệm sinh hoá tự động AU 480, hãng Beckman Coulter; Máy xét nghiệm huyết học tự động Celtac, hãng Nihon Kohden.

Kính hiển vi ánh sáng (Olympus BX-50 Olympus Corporation, Tokyo, Nhật Bản)

Các kit xét nghiệm huyết học và sinh hóa máu của hãng Sysmex. các dụng cụ để xử lý mẫu bệnh phẩm mô học, nhuộm HE.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá độc tính bán trường diễn theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới, của OECD và Bộ Y tế Việt Nam về hiệu lực và an toàn thuốc [4 - 7].

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Chuột cống trắng được chia thành 3 lô, mỗi lô 10 con.

Lô chứng (n = 10): Uống nước cất với liều 10,2ml/1kg/24h.

Lô thử liều 1 (n= 10): Uống gel nano Berberin với liều 1 là 3,4ml/1kg/24h (tương đương 3,5g/1kg/24h, tương đương 0,35g/100g/24h = 0,70g/1 con 200g/24h = 0,68ml/1 con chuột cống trắng 200g). Đây là liều dùng tương đương với liều sử dụng trên người đối với các chế phẩm tại Việt Nam điều trị tiêu chảy và nhiễm khuẩn đường ruột (200-300mg/50kg/24h - người hệ số quy đổi 0,7), dạng Berberin thông thường không phải dạng nano.

Lô thử liều 2 (n = 10): Uống gel nano Berberin với liều 2 là 10,2ml/1kg/24h, tương đương 10,5g/1kg/24h, tương đương 1,05g/100g/24h; gấp 3 - 5 lần liều dùng trên người). Chuột cống trắng được uống nước hoặc uống thuốc thử trong 4 tuần liên tục, mỗi ngày một lần vào buổi sáng.

Cách cho uống: Cho uống cưỡng bức bằng dụng cụ chuyên biệt.



Ảnh 2.1. Dụng cụ và hình ảnh cho chuột uống gel bằng dụng cụ chuyên dùng

2.2.2. Chỉ tiêu đánh giá

- *Cận lâm sàng*: Bao gồm các xét nghiệm huyết học (Số lượng hồng cầu, nồng độ Hb huyết thanh, số lượng bạch cầu, tiểu cầu máu ngoại vi, hematocrit) và sinh hóa (AST, ALT, nồng độ ure, creatinin; nồng độ protein, albumin, glucose máu ngoại vi). Thời điểm: Trước khi tiến hành nghiên cứu, sau đó 2 tuần và 4 tuần (khi kết thúc nghiên cứu).

- *Mô bệnh học*: Gây mê sâu những con còn sống khi kết thúc thí nghiệm để quan sát đại thể các gan, thận và lách. Quan sát, đánh giá các biểu hiện về màu sắc, hình dạng của các tổ chức. Gan, lách và thận được cắt bỏ từ tất cả các động vật nghiên cứu, cố định trong formaldehyde 4% ngay sau khi cắt bỏ. Sau đó, các mô được khử nước trong một loạt etanol tăng dần (70, 80, 96 và 100%). Sau khi nhúng parafin, các phần ngang có độ dày 5 μ m được nhuộm bằng hematoxylin-eosin, và kiểm tra mô học được tiến hành bằng kính hiển vi ánh sáng (Olympus BX-50 Olympus

Corporation, Tokyo, Nhật Bản). Trong điều kiện hiện nay cần kiểm tra vi thể 100% những động chết trong khi thử và xác suất 30 - 50% số động vật ở mỗi lô sau khi kết thúc nghiên cứu [6].

2.3. Phương pháp xử lý kết quả nghiên cứu

Xử lý các kết quả theo phương pháp thông kê sinh y học, Các số liệu thu thập được xử lý bằng các thuật toán thống kê và phần mềm Microsoft Excel 2013, SPSS 20.0. So sánh có sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Chuột uống gel với liều dùng 220mg và 660mg/kg/24 giờ, uống liên tục trong 28 ngày không gặp chuột chết, không ảnh hưởng đến sự phát triển trọng lượng thỏ, không gây bất thường về vận động tự động, không gây các biểu hiện co giật, run, tăng tiết mồ hôi, tím tái; không gây rối loạn tiêu hóa.

3.1. Thay đổi chỉ số xét nghiệm cận lâm sàng ở chuột trong quá trình nghiên cứu

Bảng 3.1. Thay đổi một số chỉ số huyết học chuột ở các lô nghiên cứu (n = 10)

Chỉ tiêu	Thời điểm	Lô chứng (1)	Lô uống gel nano ber liều 1 (2)	Lô uống gel nano ber liều 2 (3)	p
Hồng cầu (T/L)	t ₀ (a)	9,70 ± 1,04	10,03 ± 0,76	9,82 ± 0,79	p ₂₋₁ > 0,05
	t ₂ (b)	10,08 ± 0,73	10,22 ± 0,84	9,51 ± 1,48	p ₃₋₂ > 0,05
	t ₄ (c)	10,12 ± 1,01	10,28 ± 1,21	9,67 ± 0,82	p ₃₋₁ > 0,05
	p	p _{c-a} > 0,05; p _{b-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Hb (g/L)	t ₀ (a)	147,6 ± 14,83	150,1 ± 7,52	152,6 ± 10,67	p ₂₋₁ > 0,05
	t ₂ (b)	142,9 ± 7,08	139,7 ± 14,94	142,6 ± 20,98	p ₃₋₂ > 0,05
	t ₄ (c)	133,8 ± 21,37	129,7 ± 23,47	134,3 ± 8,11	p ₃₋₁ > 0,05
	p	p _{c-a} > 0,05; p _{b-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Bạch cầu (G/L)	t ₀ (a)	10,25 ± 3,41	10,98 ± 2,25	10,81 ± 2,74	p ₂₋₁ > 0,05
	t ₂ (b)	9,94 ± 4,72	10,43 ± 2,55	11,60 ± 6,92	p ₃₋₂ > 0,05
	t ₄ (c)	10,94 ± 2,9	11,72 ± 1,63	10,59 ± 4,03	p ₃₋₁ > 0,05
	p	p _{c-a} > 0,05; p _{b-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Tiểu cầu (G/L)	t ₀ (a)	720,5 ± 102,14	773,0 ± 143,5	683,9 ± 184,94	p ₂₋₁ > 0,05
	t ₂ (b)	777,50 ± 210,69	875,20 ± 124,6	879,7 ± 260,5	p ₃₋₂ > 0,05
	t ₄ (c)	858,4 ± 165,11	971,4 ± 200,2	836,5 ± 193,58	p ₃₋₁ > 0,05
	p	p _{c-a} > 0,05; p _{b-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Hemaetocrit (L/L)	t ₀ (a)	47,36 ± 5,45	48,35 ± 3,09	48,13 ± 3,97	p ₂₋₁ > 0,05
	t ₂ (b)	44,60 ± 2,00	44,11 ± 5,60	45,68 ± 6,62	p ₃₋₂ > 0,05
	t ₄ (c)	43,28 ± 6,73	41,91 ± 6,67	43,54 ± 3,01	p ₃₋₁ > 0,05
	p	p _{c-a} > 0,05; p _{b-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			

So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm và so sánh giữa các lô ở cùng một thời điểm, các chỉ số thay đổi không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05).

Bảng 3.2. Thay đổi một số chỉ tiêu sinh hoá ở chuột trong quá trình nghiên cứu

Chỉ tiêu	Thời điểm	Lô chứng (1)	Lô uống gel liều 1 (2)	Lô uống gel liều 2 (3)	p
AST (UI/L)	t ₀ (a)	105,95 ± 12,56	107,33 ± 18,72	103,90 ± 13,53	p ₂₋₁ > 0,05
	t ₂ (b)	111,30 ± 23,0	95,10 ± 19,0	108,80 ± 34,0	p ₃₋₂ > 0,05
	t ₄ (c)	109,5 ± 49,2	95,2 ± 34,9	105,5 ± 19,7	p ₃₋₁ > 0,05
	p	p _{c-a} > 0,05; p _{b-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
ALT (UI/L)	t ₀ (a)	39,93 ± 7,92	44,16 ± 10,46	41,40 ± 11,19	p ₂₋₁ > 0,05
	t ₂ (b)	40,30 ± 11,30	35,60 ± 10,50	37,0 ± 9,9	p ₃₋₂ > 0,05
	t ₄ (c)	42,6 ± 22,5	33,2 ± 17,4	39,2 ± 10,2	p ₃₋₁ > 0,05
	p	p _{c-a} > 0,05; p _{b-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Creatinin (µmol/L)	t ₀ (a)	48,62 ± 2,37	46,60 ± 3,76	50,39 ± 4,30	p ₂₋₁ > 0,05
	t ₂ (b)	61,50 ± 5,30	53,60 ± 5,20	58,60 ± 3,80	p ₃₋₂ > 0,05
	t ₄ (c)	131,8 ± 197,8	46,7 ± 24,1	65,6 ± 23,4	p ₃₋₁ > 0,05
	p	p _{c-a} > 0,05; p _{b-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Urea (mmol/L)	t ₀ (a)	3,85 ± 0,82	3,87 ± 0,43	3,73 ± 0,50	p ₂₋₁ > 0,05
	t ₂ (b)	4,80 ± 1,50	4,0 ± 1,0	5,8 ± 1,3	p ₃₋₂ > 0,05
	t ₄ (c)	4,90 ± 1,0	4,20 ± 1,30	4,10 ± 1,0	p ₃₋₁ > 0,05
	p	p _{c-a} > 0,05; p _{b-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Glucose (mmol/L)	t ₀ (a)	6,91 ± 0,69	7,14 ± 1,23	6,66 ± 1,00	p ₂₋₁ > 0,05
	t ₂ (b)	4,80 ± 0,70	4,20 ± 0,80	3,60 ± 0,40	p ₃₋₂ > 0,05
	t ₄ (c)	4,80 ± 1,20	5,0 ± 0,60	4,90 ± 0,80	p ₃₋₁ > 0,05
	p	p _{c-a} > 0,05; p _{b-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Protein (G/L)	t ₀ (a)	76,36 ± 4,33	76,20 ± 3,49	76,85 ± 4,18	p ₂₋₁ > 0,05
	t ₂ (b)	81,80 ± 3,90	80,10 ± 5,0	80,0 ± 3,30	p ₃₋₂ > 0,05
	t ₄ (c)	78,4 ± 3,3	74,3 ± 3,7	76,9 ± 2,6	p ₃₋₁ > 0,05
	p	p _{c-a} > 0,05; p _{b-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Albumin (G/L)	t ₀ (a)	32,95 ± 1,50	32,88 ± 1,55	33,66 ± 1,90	p ₂₋₁ > 0,05
	t ₂ (b)	35,30 ± 1,20	35,0 ± 1,60	34,60 ± 1,70	p ₃₋₂ > 0,05
	t ₄ (c)	35,4 ± 1,5	33,9 ± 2,6	34,6 ± 2,4	p ₃₋₁ > 0,05
	p	p _{c-a} > 0,05; p _{b-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			

So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm và giữa các lô ở cùng một thời điểm, hoạt độ enzyme AST thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Trị giá AST chuột bình thường nếu so sánh với ở người đều cao hơn khoảng 2 lần.

Các chỉ số ALT, creatinin, glucose, ure,

protein khi so sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm và giữa các lô ở cùng một thời điểm thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Chỉ số Albumin ở lô chuột chứng (uống nước muối sinh lý) giảm nhẹ. Tuy nhiên, không có sự khác biệt giữa 3 thời điểm.

3.2. Kết quả nghiên cứu giải phẫu bệnh

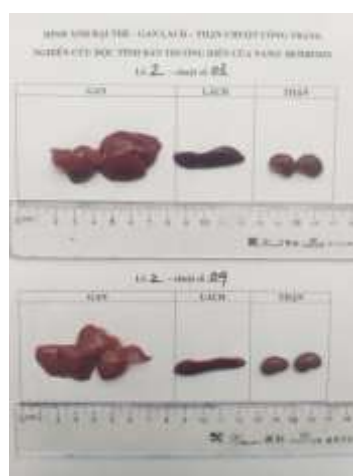
3.2.1. Hình ảnh đại thể gan, thận và lách của chuột cống trắng

Kết thúc đợt nghiên cứu, chuột được gây mê nhẹ bằng Ketamin, sau đó phẫu

tích bóc tách các cơ quan gan, lách và thận. Quan sát và so sánh đại thể bằng mắt thường và dưới kính lúp có độ phóng đại 25 lần thấy: màu sắc, hình thái của gan, lách và thận ở hai lô dùng gel nano ber không khác so với lô chứng.



Ảnh 3.1. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận của chuột cống trắng lô 1



Ảnh 3.2. Hình ảnh đại thể gan, lách và thận của chuột cống trắng lô 2



Ảnh 3.3. Hình ảnh đại thể gan, lách và thận của chuột cống trắng lô 3

2.3. Hình ảnh cấu trúc vi thể gan, lách, thận chuột cống trắng

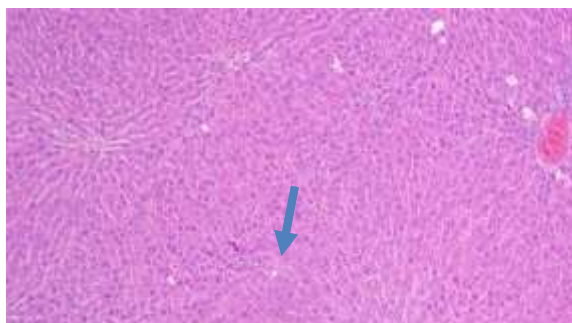
- **Hình ảnh vi thể gan chuột:** Ở cả ba nhóm cho hình ảnh gan cấu trúc bình thường. Các tế bào gan bình thường, bào tương thuần nhất, không bị thoái hóa. Cấu trúc tiểu thùy rõ; Các tế bào gan sắp xếp thành dải, thành bè; giữa các dải, các bè gan có xoang mạch. Cấu trúc khoảng cửa bình thường Mạch máu bình thường. Không thấy hình ảnh bất thường hoặc tổn thương (hình 3.1, 3.2, 3.3).

- **Hình ảnh vi thể thận chuột:** Ở cả ba nhóm cho hình ảnh vi thể cấu trúc thận bình thường. Thận màu nâu nhạt. **Cấu trúc vùng vỏ** rõ ràng; có các cầu thận, các ống thận và các mạch máu giữa các ống thận.

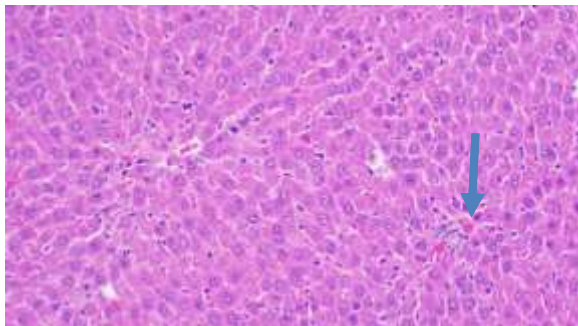
Cấu trúc vùng tủy bình thường. **Cầu thận** bình thường, khoang Bowman rõ. **ống thận** bình thường; các ống thận đều. Các tế bào biểu mô ống thận không bị thoái hóa; Các mạch máu sung huyết nhẹ. Không thấy hình ảnh tổn thương (hình 3.4, 3.5, 3.6).

- **Hình ảnh vi thể lách chuột:** Ở ba nhóm có hình ảnh tương tự. Lách màu nâu đậm. **Cấu trúc vùng tủy trắng** các nang lymphô rõ ràng. Nhu mô lách với vùng tủy trắng và tủy đỏ. Vùng tủy trắng có các nang lymphô khá đồng đều với động mạch nút lông ở trung tâm. Vùng tủy đỏ có dây Billroth và các xoang mạch. **Cấu trúc mạch máu, xoang** bình thường. Không có hình ảnh tổn thương (hình 3.7, 3.8, 3.9).

Dưới đây là hình ảnh minh họa

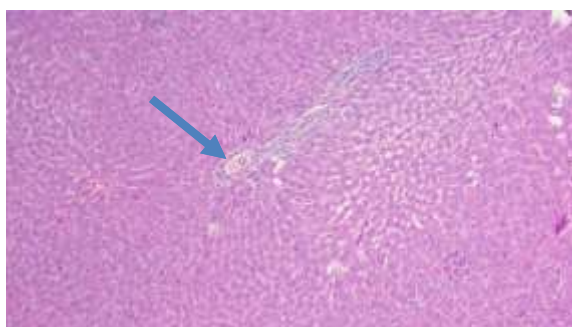


C2, H.E 10X

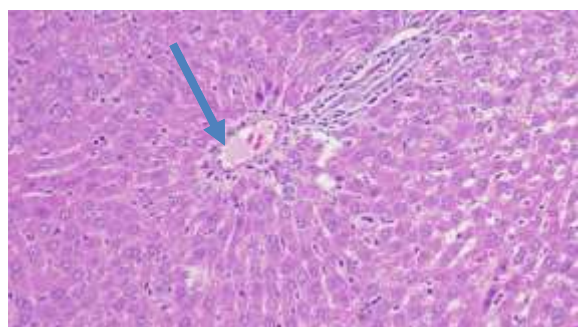


C2, H.E 20X

Hình 3.1. Hình ảnh cấu trúc vi thể gan lô 1: Các tế bào gan sắp xếp thành dải, thành bè, giữa các dải, các bè gan có xoang mạch. Các tế bào gan không bị thoái hóa. Các xoang mạch bị sung huyết nhẹ. Khoảng cửa không viêm (mũi tên xanh)

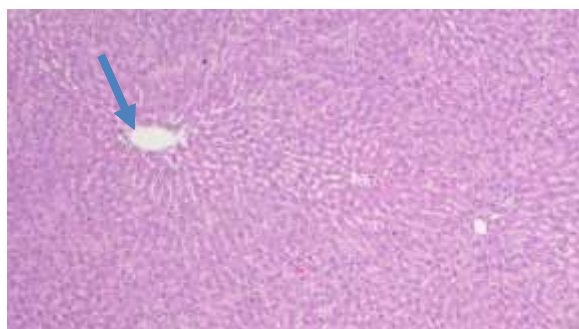


C3, H.E 10X

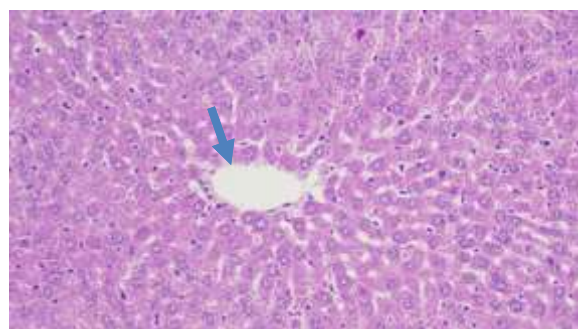


C3, H.E 20X

Hình 3.2. Hình ảnh cấu trúc vi thể lô 2: Các tế bào gan sắp xếp thành dải, thành bè, giữa các dải, các bè gan có xoang mạch. Các tế bào gan không bị thoái hóa. Các xoang mạch bị sung huyết nhẹ. Khoảng cửa không viêm (mũi tên xanh)

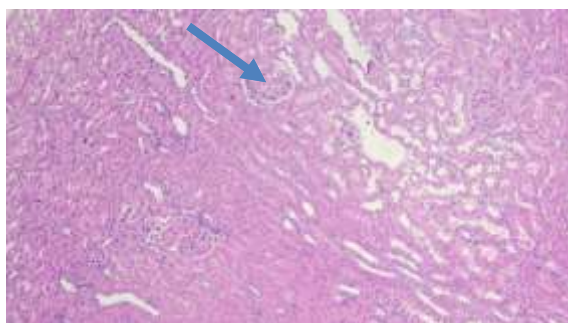


C25, H.E 10X

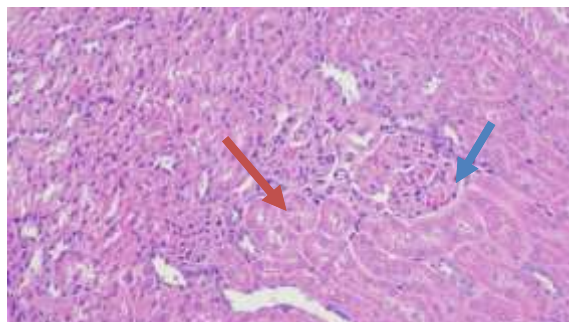


C25, H.E 20X

Hình 3.3. Cấu trúc vi thể gan lô 3. Các tế bào gan sắp xếp thành dải, thành bè, giữa các dải, các bè gan có xoang mạch. Các tế bào gan không bị thoái hóa. Các xoang mạch bị sung huyết nhẹ. Tĩnh mạch trung tâm tiêu thụ rõ, không bị sung huyết (mũi tên xanh)

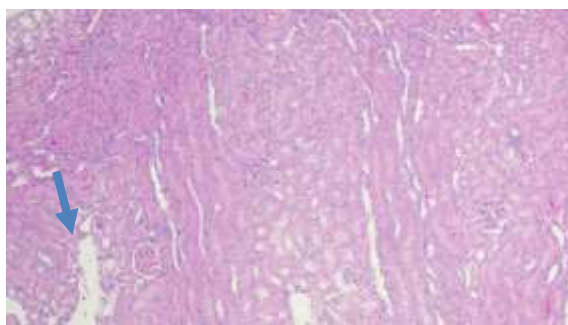


C6, H.E 10X

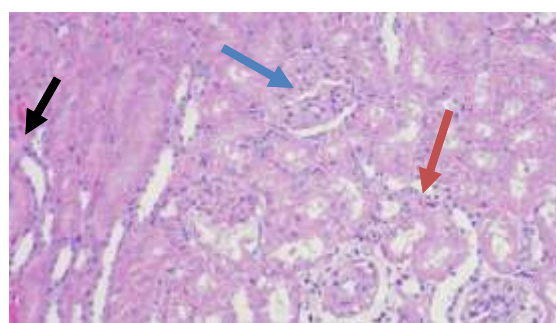


C6, H.E 20X

Hình 3.4. cấu trúc vi thể thận lô 1. Vỏ thận có các cầu thận (mũi tên xanh), các ống thận (mũi tên vàng) và các mạch máu giữa các ống thận. Các tế bào biểu mô ống thận không bị thoái hóa.

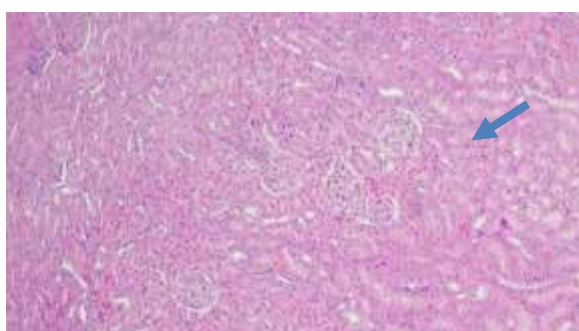


C12, H.E 10X

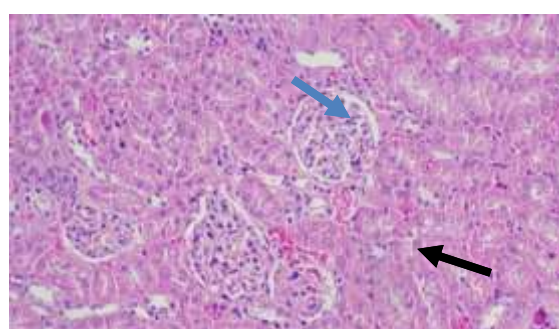


C12, H.E 20X

Hình 3.5. cấu trúc vi thể thận lô 2. Vỏ thận có các cầu thận (mũi tên xanh), các ống thận (mũi tên vàng) và các mạch máu giữa các ống thận không bị thoái hóa. Các mạch máu sung huyết nhẹ (mũi tên đen)

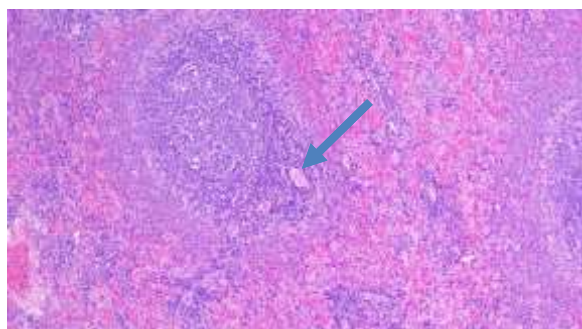


C32, H.E 10X

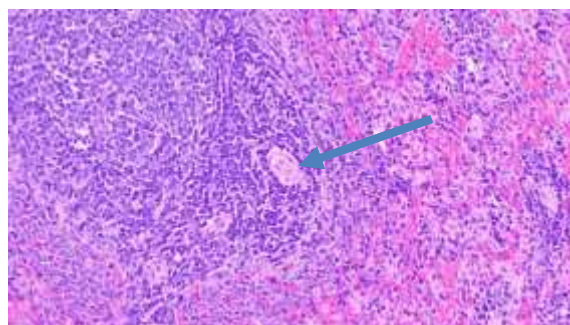


C32, H.E 20X

Hình 3.6. Cấu trúc vi thể thận lô 2. Vỏ thận có các cầu thận (mũi tên xanh), các ống thận (mũi tên vàng) và các mạch máu giữa các ống thận không bị thoái hóa. Các mạch máu sung huyết nhẹ (mũi tên đen)

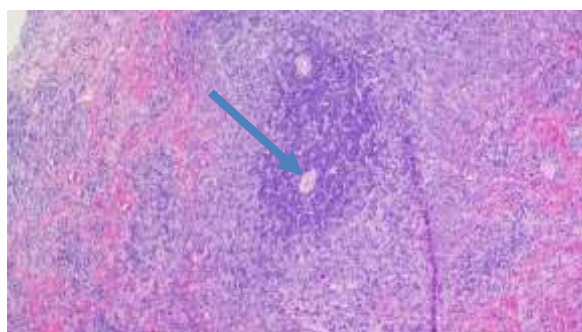


C8, H.E 10X

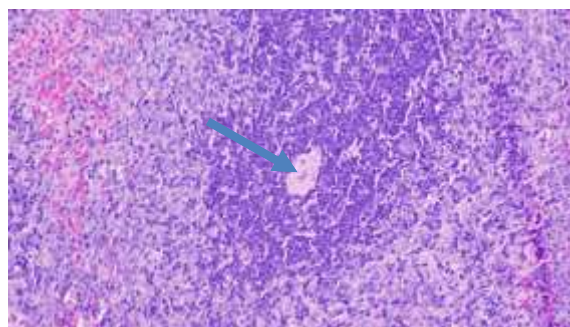


C8, H.E 20X

Hình 3.7. cấu trúc vi thể lách lô 1. Nhu mô lách với vùng tủy trắng và tủy đỏ. Vùng tủy trắng có các nang lympho khá đồng đều với động mạch bút lông ở trung tâm (mũi tên xanh). vùng tủy đỏ có dây billroth và các xoang mạch.

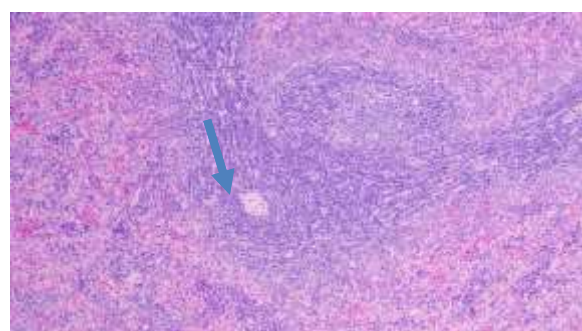


C4, H.E 10X

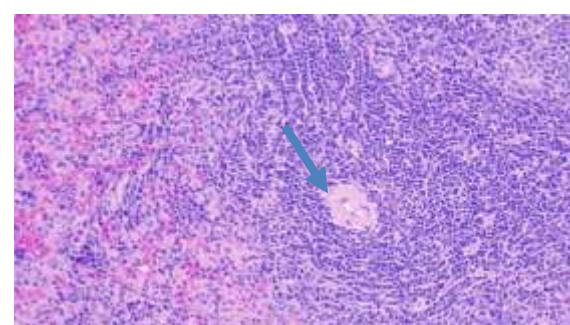


C4, H.E 20X

Hình 3.8. Cấu trúc vi thể lách lô 2. Nhu mô lách với vùng tủy trắng và tủy đỏ. Vùng tủy trắng có các nang lympho khá đồng đều với động mạch bút lông ở trung tâm (mũi tên xanh). vùng tủy đỏ có dây billroth và các xoang mạch.



C26, H.E 10X



C26, H.E 20X

Hình 3.9. Cấu trúc vi thể lách lô 3. Nhu mô lách với vùng tủy trắng và tủy đỏ. Vùng tủy trắng có các nang lympho khá đồng đều với động mạch bút lông ở trung tâm (mũi tên xanh). Vùng tủy đỏ có dây Billroth và các xoang mạch.

4. BÀN LUẬN

4.1. Tính an toàn của chế phẩm gel nano Berberin trên lâm sàng

Chuột uống gel với liều dùng tương đương 3,5g/1kg/24h và 10,5g/1kg/24h, uống liên tục trong 28 ngày không gặp chuột chết, không ảnh hưởng đến sự phát triển trọng lượng thỏ, chuột vẫn sinh hoạt bình thường.

4.2. Tính an toàn của chế phẩm trên diễn biến cận lâm sàng và giải phẫu bệnh

Kết quả nghiên cứu cho thấy các xét nghiệm đánh giá chức năng gan, thận và tạo máu không bị ảnh hưởng.

- Xét nghiệm huyết học cho thấy chức năng tạo máu (số lượng hồng cầu, hàm lượng Hb, số lượng bạch cầu, tiểu cầu, chỉ số Hematocrit không bị rối loạn. Chỉ số hồng cầu và tiểu cầu ở chuột cống trắng trong nghiên cứu đều cao hơn so với chỉ số ở người. Tuy nhiên, khi so sánh chỉ số trong từng nhóm trong quá trình nghiên cứu, cũng như so sánh giữa các nhóm (chứng và nghiên cứu) trong cùng thời điểm không thấy sự khác biệt có ý nghĩa, $p > 0,05$.

- Gan là một trong những cơ quan nội tạng có kích thước lớn và rất quan trọng trong cơ thể. Gan không chỉ có chức năng chuyển hóa, phân giải các chất dinh dưỡng mà còn thanh lọc, đào thải các độc tố ra khỏi cơ thể (trong đó có tham gia chuyển hoá thuốc). Theo dõi chức năng gan là một biện pháp cơ bản để đánh giá sự an toàn của một chế phẩm thuốc. Xét nghiệm đánh giá chức năng gan trong nghiên cứu là protein, albumin huyết thanh, enzym chuyển hóa AST và ALT, urea, creatinin.

Protein có vai trò quan trọng trong việc xây dựng nên tất cả các tế bào và mô, quan trọng cho sự tăng trưởng cơ thể, phát triển và bảo vệ sức khỏe. Protein là thành phần cấu trúc của hầu hết các bộ phận, các enzyme và hormone điều hoà hoạt động của cơ thể

Albumin là một loại protein huyết thanh quan trọng, chiếm khoảng 60 - 80% tổng số protein trong cơ thể. Albumin được sản xuất bởi gan, duy trì ổn định nồng độ trong máu để thực hiện nhiều chức năng quan trọng. Khi albumin máu thay đổi biểu hiện sự tổn thương hoặc rối loạn hoạt động của cơ thể, đặc biệt chức năng tổng hợp protein của gan. Enzym ALT, AST bình thường, chứng tỏ không có hủy hoại tế bào gan. Các chỉ số ALT, AST đều có ý nghĩa trong việc chẩn đoán, phát hiện và điều trị sớm các bệnh lý ở gan.

Ure là sản phẩm thoái hóa của protein, được lọc qua cầu thận và đào thải ra ngoài cơ thể qua nước tiểu. Tất cả các rối loạn chức năng gan **đều sẽ làm** quá trình chuyển hóa NH_3 thành urê bị suy giảm nhiều hay ít

Xét nghiệm Ure máu bản chất là xét nghiệm máu để định lượng nồng độ Ure Nitrogen có trong máu. Chỉ số Ure máu thường được dùng để đánh giá tình trạng chức năng của gan và thận. Creatinin là sản phẩm của sự thoái hóa creatin trong các cơ, được đào thải qua thận.

Trong nghiên cứu, các xét nghiệm chức năng gan của chuột cống không bị rối loạn. Biểu hiện các xét nghiệm protein, albumin (khả năng tổng hợp protein, albumin của gan không rối loạn), các enzym chuyển hóa của gan, urea, creatinin đều không rối loạn.

- Thận là cơ quan quan trọng trong thải trừ thuốc. Các xét nghiệm đánh giá chức

năng thận gồm ure, creatinin, protein. Xét nghiệm chỉ số Ure và Creatinin trong máu sẽ giúp chẩn đoán chính xác tình trạng hoạt động của thận. Chỉ số Creatinin trong máu được dùng để đánh giá chức năng thận. Khi nồng độ Creatinin tăng cao, có nghĩa đang có rối loạn chức năng thận. Nguyên nhân do khi chức năng thận suy giảm thì khả năng lọc Creatinin sẽ giảm, dẫn tới nồng độ chất này trong máu sẽ tăng cao hơn bình thường

Trong quá trình điều trị, xét nghiệm đánh giá chức năng của thận bình thường. Biểu hiện urea, creatinin bình thường.

Kết quả trên xét nghiệm hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu trên cấu trúc vi thể 3 tạng gan lách và thận. Kết quả nghiên cứu cho thấy cho thấy không có sự khác biệt giữa lô chứng với 2 lô nghiên cứu. Kiểm tra giải phẫu bệnh khi kết thúc nghiên cứu cho thấy không hiển thị bất kỳ sự thay đổi bệnh lý ở gan, thận và lách. Cần nhấn mạnh đây là 3 tạng quan trọng của cơ thể, đóng vai trò chuyển hóa, đào thải thuốc.

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của gel nano Berberin quy đổi ra liều trên người là 110mg/kg/24 giờ không gây bất cứ sự thay đổi nào trên đối tượng nghiên cứu về các chỉ số giải phẫu bệnh gan, lách thận [8].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các nghiên cứu đã công bố về Berberin.

Một nghiên cứu cho thấy ở chuột bị tiểu đường sau 16 tuần sử dụng Berberine ở nồng độ > 50, 100 và 150mg/kg gây tổn thương mô gan nhưng những triệu chứng này không xuất hiện ở chuột khỏe mạnh [9].

Một nghiên cứu sử dụng dịch chiết thân rễ cây hoàng liên *Rhizoma Coptidis* (RC alkaloids) có hoạt chất chủ yếu là

Berberin với hàm lượng 156mg/kg, bằng đường uống, trong 90 ngày cho chuột Sprague Dawley. Kết quả cho thấy không có triệu chứng ngộ độc lâm sàng, không có bất kỳ ảnh hưởng nào đến trọng lượng cơ thể và tỷ lệ tử vong, trọng lượng nội tạng, phân tích nước tiểu, các thông số huyết học, hoại tử tổng thể và mô bệnh học ở bất kỳ động vật nào. Kết luận là độc tính của Berberin là tối đa. Liều lượng RC alkaloids được khuyến cáo hiện nay là tương đối an toàn [10].

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của Berberin nhận thấy dịch chiết từ rễ cây *Rhizoma coptidis* - Hoàng liên chân gà chứa hoạt chất Berberin với 1,88g/kg trên chuột Sprague Dawley không có tác dụng phụ, không có bất kỳ ảnh hưởng nào đến các yếu tố sinh hóa máu. Kết quả có trong xét nghiệm Ames đánh giá khả năng gây đột biến ADN vi khuẩn của hoá chất âm tính, xét nghiệm vi nhân micronucleus trên chuột và xét nghiệm tinh trùng chuột không có bất thường [11].

Berberine làm giảm trọng lượng gan của chuột mắc bệnh tiểu đường. Berberine làm giảm bớt sự tiến triển bệnh lý của gan và phục hồi sự gia tăng glycogen và chất béo trung tính trong gan về gần mức kiểm soát [9, 12, 13].

Một nghiên cứu đánh giá Berberine có thể làm giảm độc tính cấp tính trên gan do DOX (tác nhân hóa trị liệu phổ rộng) gây ra ở chuột. Berberin đã cải thiện tình trạng tổn thương gan và thận do DOX bằng cách giảm nồng độ ALT, AST, giảm các tổn thương quan sát được về mặt mô học, chẳng hạn như xuất huyết và hoại tử khu trú của các mô gan và thận do DOX gây ra [14].

Mahmoudi và cộng sự (2016) đánh giá tác dụng gây độc miễn dịch của berberine ở mức 5 và 10mg/kg/ngày, IP, trong 14

ngày ở chuột BALB. Kết quả cho thấy Berberine mức 10mg/kg làm giảm trọng lượng lách [15].

Điều trị chuột với mức 50mg/kg Berberine đã chứng minh Berberine không có tác dụng độc hại rõ ràng đối với thận và gan [16].

5. KẾT LUẬN

Chuột uống Gel nano Berberin với liều dùng dùng tương đương 3,5g/1kg/24h và 10,5g/1kg/24h, uống liên tục trong 28 ngày đã làm không ảnh hưởng đến các chỉ số huyết học (hồng cầu, Hb, bạch cầu, tiểu cầu, hematocrit) và sinh hóa (ure, glucose, protein, albumin, creatinin, AST, ALT); không ảnh hưởng đến cấu trúc giải phẫu của gan, lách và thận.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Feng X., S.A., Jafari Set all; Berberine in Cardiovascular and Metabolic Diseases: From Mechanisms to Therapeutics. *Theranostics*, 2019. 16, 9(7): p. 1923-1951.
- Anna Och; Rafał Podgórski, R.N., Biological Activity of Berberine-A Summary Update; 2020, 12(11), 713. *Toxins*, 2020. 12(11): p. 713.
- Mirhadi E., R.M., Malaekheh-Nikouei B.; Nano strategies for berberine delivery, a natural alkaloid of Berberis. *Biomed Pharmacother.*, 2018. 104: p. 465-473.
- OECD. OECD guidelines for testing of chemicals; Guideline 407: Repeated dose 28 - day oral toxicity in rodents. Organization of Economic and Cooperation Development, Paris, 1995.
- OECD guideline for testing chemicals, OECD/OCDE 423; Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, Adopted 3rd October 2008.
- Bộ Y Tế (2015). Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu, QĐ 141/BYT-QĐ ngày 27/10/2015.
- WHO (1993), Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines, Manila, Philipin, pp 35 - 41.
- Shannon Reagan-Shaw, Dose translation from animal to human studies revisited, *The FASEB journal*, 2008; vol. 22 no. 3 659-661.
- Ji Yin Zhou, Shi Wen Zhou, et al; Chronic effects of berberine on blood, liver glucolipid metabolism and liver PPARs expression in diabetic hyperlipidemic rats; *Biol Pharm Bull.* 2008 Jun;31(6):1169-76.
- Yi J, Ye X, Wang D, He K, Yang Y, Liu X, et al. Safety evaluation of main alkaloids from rhizoma coptidis. *J Ethnopharmacol.* 2013;145:303-310.
- Ning N, Wang YZ, Zou ZY, Zhang DZ, Wang DZ, Li XG. Pharmacological and safety evaluation of fibrous root of rhizoma coptidis. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;39:53-69.
- Seyede Zohre Kamrani Rad, Maryam Rameshrad and Hossein Hosseinzadeh, Toxicology effects of Berberis vulgaris (barberry) and its active constituent, berberine: a review, *Iran J Basic Med Sci.*, 2017. 20(5): p. 516-529.
- Nitika Singh and Bechan Sharma; Toxicological Effects of Berberine and Sanguinarine; *Front. Mol. Biosci.*, 19 March 2018.
- Xueyan Chen, Yu Zhang, Zhongning Zhu, Huanlong Liu, Huicai Guo, Chen Xiong, Kerang Xie, Xiaofei Zhang, Suwen Su, Protective effect of berberine on doxorubicin-induced acute hepatorenal toxicity in rats; *Molecular Medicine Reports*; May-2016; Volume 13 Issue 5; Pages: 3953-3960.
- Mahmoudi M, Zamani Taghizadeh Rabe S, Balali-Mood M, Karimi G, Memar B, Rahnama M, et al., Immunotoxicity induced in mice by subacute exposure to berberine. *J Immunotoxicol.*, 2016. 13: p. 255-262.
- Jiang Z, LF., Ong ES, Li SFY., Metabolic profile associated with glucose and cholesterol-lowering effects of berberine in Sprague-Dawley rats. *Metabolomics*, 2012. 8: p. 1052-1068.