



Original Article

Safety Evaluation of Berberine-loaded Liposomes in Rats

Duong Thi Thuan¹, Nguyen Thi Quynh Trang²,
Ha Van Oanh², Nguyen Thuy Duong², Nguyen Thanh Hai³,
Jyrki Heinämäki⁴, Pham Thi Minh Hue^{2,*}

¹College of Medicine and Pharmacy, Duy Tan University, 120 Hoang Minh Thao, Da Nang, Vietnam

²Hanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

³VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

⁴Institute of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tartu, Nooruse Street 1, Tartu, Estonia

Received 29 March 2024

Revised 5 April 2024; Accepted 14 May 2024

Abstract: Berberine (BBR)-loaded liposomes have endogenous lipid-lowering and exogenous lipid-lowering, which are reported in our previous studies. However, the safety profile of BBR-loaded liposomes has not been disclosed. In this study, experiments were carried out to evaluate the potential toxicity of BBR-loaded liposomes through the methods of acute and sub-chronic oral administration in rats. Acute toxicity studies were conducted according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines No. 420 on female Wistar white rats for 14 days with a single dose of BBR-loaded liposomes equivalence with 2000 mg of BBR/kg body weight (b.w) for sighting study; 2000 mg of BBR/kg and 5000 mg of BBR/kg b.w for the main study. Sub-chronic toxicity studies were performed according to OECD guidelines No. 407 on Wistar white rats (both sexes) with daily oral doses of BBR-loaded liposomes equivalence with 150 mg, 450 mg of BBR/kg b.w for 28 days consecutively. The study results showed no signs of acute toxicity. In the sub-chronic toxicity study, there was no significant change in the general characters, body weight, and organ weights of the treated group of rats when compared to the control group of the same sex. Hematological, biochemical, and histological parameters also showed no toxic effects of BBR-loaded liposomes on rats. The overall findings of this study indicated that LD₅₀ of BBR-loaded liposomes was above 5000 mg/kg; the doses of 150 mg and 450 mg of BBR/kg b.w could be considered safe doses of BBR-loaded liposomes for oral administration.

Keywords: Acute toxicity; sub-chronic toxicity; Wistar rats; BBR-loaded liposomes.

* Corresponding author.

E-mail address: phamminhhuehup@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4595>

Đánh giá tính an toàn của liposome berberin trên chuột cống

Dương Thị Thuần¹, Nguyễn Thị Quỳnh Trang²,
Hà Vân Oanh², Nguyễn Thùy Dương², Nguyễn Thanh Hải³,
Jyrki Heinämäki⁴, Phạm Thị Minh Huệ^{2,*}

¹Trường Y Dược, Đại học Duy Tân, 120 Hoàng Minh Thảo, Đà Nẵng, Việt Nam

²Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

⁴Viện Dược, Khoa Y, Đại học Tartu, Phố Nooruse 1, Tartu, Estonia

Nhận ngày 29 tháng 3 năm 2024

Chỉnh sửa ngày 05 tháng 4 năm 2024; Chấp nhận đăng ngày 14 tháng 5 năm 2024

Tóm tắt: Liposome berberin (BBR) đã được báo cáo có tác dụng làm giảm lipid máu ngoại sinh và nội sinh trong các nghiên cứu trước của chúng tôi. Tuy nhiên, tính an toàn của liposome BBR vẫn chưa được công bố. Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được tiến hành nhằm đánh giá độc tính tiềm ẩn của liposome BBR thông qua các phương pháp nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn trên chuột cống bằng đường uống. Nghiên cứu độc tính cấp được tiến hành theo hướng dẫn của Tổ chức hợp tác kinh tế và phát triển (OECD) số 420 trên chuột cống trắng Wistar giống cái trong 14 ngày với liều đơn liposome BBR tương ứng với 2000 mg BBR/kg ở thử nghiệm thăm dò, 2000 mg BBR/kg và 5000 mg BBR/kg khối lượng chuột ở thử nghiệm chính thức. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn được thực hiện theo hướng dẫn của OECD số 407 trên chuột cống trắng Wistar hai giống với liều uống liposome BBR hàng ngày tương ứng với 150, 450 mg BBR/kg khối lượng chuột trong 28 ngày liên tục. Kết quả nghiên cứu cho thấy không có dấu hiệu độc tính cấp. Ở nghiên cứu độc tính bán trường diễn, không có sự thay đổi một cách có ý nghĩa thống kê về tình trạng chung, thể trọng chuột cũng như khối lượng các cơ quan nội tạng chuột khi so với nhóm chứng cùng giống. Các thông số huyết học, sinh hóa và mô học cho cũng thấy không có độc tính ảnh hưởng trên chuột. Liposome BBR được xác định có mức LD₅₀ > 5000 mg/kg, với liều tương ứng 150 mg và 450 mg BBR/kg an toàn khi sử dụng qua đường uống.

Từ khóa: Độc tính cấp; độc tính bán trường diễn; chuột cống trắng; liposome BBR.

1. Mở đầu

BBR từ lâu đã được sử dụng để điều trị tại chỗ các bệnh đường tiêu hóa như đau bụng, tiêu chảy [1, 2]. Trong những năm gần đây, có nhiều nghiên cứu cho thấy BBR có tác dụng làm giảm lipid máu [3-5]. Tuy nhiên, BBR bị hạn chế bởi sinh khả dụng đường uống kém (dưới 10%)

[6-8], khi sử dụng BBR dạng tự do đường uống với liều cao gây ra những tác dụng không mong muốn như: tiêu chảy, táo bón, đau bụng [9]. Độc tính của BBR nguyên liệu cũng đã được báo cáo trong một số nghiên cứu. Tùy thuộc vào dạng nguyên liệu BBR mà giá trị liều gây chết 50% số động vật thực nghiệm (LD₅₀) khác nhau. LD₅₀ của BBR sulfat khi dùng đường tiêm phúc mạc

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: phamminhhuehup@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4595>

(IP) ở chuột cống là 205 mg/kg và khi dùng đường uống dạng sulfat ở chuột cống là > 1000 mg/kg và ở chuột nhắt là 329 mg/kg [10]. LD₅₀ trên chuột nhắt của BBR hydroclorid đường tiêm tĩnh mạch là 9,0386 mg/kg, đường tiêm phúc mạc là 57,6103 mg/kg. Tuy nhiên, LD₅₀ trên chuột nhắt bằng đường uống không thể xác định vì BBR ít hấp thu qua đường ruột. Khi tăng liều từ 20,8 g/kg lên 41,6 g/kg thì nồng độ dược chất trong máu tăng từ 0,168 µg/ml lên 0,432 µg/ml và gây chết 30% [11]. Độc tính bán cấp của các alkaloid chiết từ chi *Berberis* gồm có BBR, palmatin, oxyacanthin, magnoflorin đều gây loét dạ dày trên chuột nhắt sau khi uống liều 25 mg/kg trong 7 ngày. Hơn nữa, liều 10 mg/kg và 20 mg/kg đường tiêm phúc mạc trong 1 tuần trên chuột cống đã làm giảm liên kết bilirubin với protein [12]. Liều 5-10 mg/kg đường tiêm phúc mạc trên chuột nhắt gây đái tháo đường đã gây giảm khối lượng của lách, giảm tế bào máu. Liều 10mg/kg ức chế chức năng miễn dịch tế bào và dịch thể trong khi liều 5 mg/kg chỉ ảnh hưởng đến sự tăng sinh tế bào limpho và phản ứng quá mẫn loại chậm [13]. Liều đường uống 50 mg/kg hoặc 100 mg/kg trên mèo đã gây xuất huyết cả ruột non và ruột già [10]. Báo cáo về độc tính bán trường diễn của BBR trên chuột cống cho thấy không có độc tính khi dùng đường uống ở liều 1,88 g/kg, nhưng ở liều 3,76 g/kg thì gây tổn thương gan và phổi [14].

Những nghiên cứu trước đây của chúng tôi về bào chế hệ liposome để mang BBR nhằm khắc phục được hạn chế về sinh khả dụng thấp của BBR khi dùng đường uống. Kết quả cho thấy liposome BBR làm tăng nồng độ dược chất cực đại trong máu lên 2,46 lần, tăng sinh khả dụng lên 6,28 lần, có tác dụng làm giảm lipid máu nội sinh [15] và ngoại sinh [16] so với BBR tự do. Tuy nhiên, tính an toàn của liposome BBR dùng đường uống chưa được công bố. Vì vậy trong nghiên cứu này, tính an toàn của liposome BBR được đánh giá thông qua việc nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn của liposome BBR dùng đường uống trên chuột cống nhằm khẳng định thêm về khả năng ứng dụng của liposome BBR.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu và động vật thí nghiệm

2.1.1. Mẫu thử

Mẫu thử là liposome BBR được pha lại từ proliposome BBR [16] với lượng nước cất thích hợp để được các nồng độ dược chất tương ứng với các liều thử được thiết kế.

2.1.2. Hóa chất, thuốc thử

Bộ kit định lượng các thông số sinh hóa: TC, AST, ALT, glucose, creatinin, protein toàn phần (ERBA Diagnostics Mannheim – USA).

2.1.3. Động vật thí nghiệm

Chuột cống trắng chủng Wistar, cả hai giống, cân nặng từ 180-220 g, khỏe mạnh, do Học viện Quân y cung cấp.

Động vật được nuôi ổn định trong điều kiện phòng thí nghiệm ít nhất 5 ngày trước khi thực hiện nghiên cứu tại phòng nuôi động vật thí nghiệm Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Dược Hà Nội. Chuột được nuôi dưỡng trong nhiệt độ trong khoảng 22 ± 3 °C, ánh sáng tự nhiên, 30% ≤ độ ẩm ≤ 70%, cho ăn bằng thức ăn tiêu chuẩn do Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp, chu trình 12 giờ sáng/ tối, uống nước tự do.

2.1.4. Thiết bị

Máy sinh hóa TC 3300 plus (Teco Diagnostic USA). Máy xét nghiệm huyết học URIT 3000 PLUS (URIT Medical Electronic Co., Ltd– Trung Quốc). Cân phân tích AY 220 (Shimadzu - Nhật).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá độc tính cấp của liposome berberine

Đánh giá độc tính cấp của liposome BBR được tiến hành theo mô hình liều cố định (OECD/OCED 420) [17]. Chuột được chọn ngẫu nhiên, đánh dấu để cho phép nhận dạng cá thể. Chuột nhịn ăn qua đêm và uống nước tự do theo nhu cầu. Sau thời gian nhịn ăn, tiến hành cân chuột và cho sử dụng mẫu thử. Chuột cống được cho ăn trở lại 3-4 giờ sau khi dùng mẫu thử, uống

nước bình thường. Thử nghiệm xác định độc tính cấp được thực hiện theo hai giai đoạn:

+ Thử nghiệm thăm dò: nhằm xác định được liều khởi đầu trong số 5 mức liều (mỗi nhóm 1 động vật): 5, 50, 300, 2000, 5000 mg/kg phù hợp cho giai đoạn thử nghiệm chính thức. Căn cứ vào những nghiên cứu về độc tính của BBR cho thấy LD₅₀ của BBR đường uống trên chuột cống là > 1000 mg/kg [10, 14]. Vì vậy, liều thăm dò ban đầu của liposome BBR được chọn là 2000 mg BBR/kg.

+ Thử nghiệm chính thức: liều thử nghiệm là liều đã xác định sau giai đoạn thăm dò. Tổng số chuột thử trong giai đoạn này là 5 chuột đối với mỗi mức liều thử. Chuột được quan sát riêng lẻ sau khi dùng mẫu thử ít nhất một lần trong 30 phút đầu tiên, cần sự chú ý đặc biệt trong 4 giờ đầu tiên và hàng ngày sau đó, cho đến 14 ngày. Các quan sát được ghi lại một cách có hệ thống cho từng chuột. Chuột được quan sát thêm nếu chuột tiếp tục có dấu hiệu nhiễm độc. Nếu chuột rơi vào tình trạng ốm yếu và có biểu hiện đau dữ dội hoặc những dấu hiệu nghiêm trọng sẽ được hủy một cách nhân đạo. Nếu động vật bị hủy vì lý do nhân đạo hoặc được phát hiện đã chết, thời gian chết sẽ được ghi lại.

Các thông số đánh giá độc tính gồm:

+ Các chỉ tiêu cảm quan như da tím tái, đỏ bừng, nổi mụn; lông: xù, lông dựng đứng, rụng lông; mắt: mắt mờ, rỉ mắt, thay đổi niêm mạc mắt; tiêu hóa: chảy nước bọt, tiêu chảy; hô hấp: thở nhanh, thở dốc, thở chậm; vận động: tăng vận động, đi lệch mình, bò lét; thần kinh: hành vi, co giật, run, ngủ lịm, hôn mê.

+ Giá trị LD₅₀ gần đúng dựa trên số chuột chết ở mức liều đã thử: Nếu ≥ 2 chuột chết trong 5 chuột thử thì LD₅₀ xếp ở mức \leq liều thử; nếu ≥ 1 chuột có biểu hiện độc rõ và/hoặc ≤ 1 chuột chết thì LD₅₀ được xếp > liều thử. Nếu các chuột đều sống thì phải thử với mức liều cao hơn mức đã thử.

Phân loại độc tính cấp dựa trên giá trị LD₅₀ gần đúng theo Hệ thống hài hòa toàn cầu (Global Harmonization System – GHS) [18].

2.2.2. Đánh giá độc tính bán trường diễn của liposome berberin

Phương pháp đánh giá độc tính bán trường diễn của liposome BBR được tiến hành theo mô

hình liều lặp lại 28 ngày (OECD/OCDE 407) [19]. Thử độc tính dài ngày nhằm xác định khả năng dung nạp của động vật thực nghiệm khi dùng mẫu thử nhiều lần.

Bố trí thực nghiệm:

Chuột mỗi giống được chia ngẫu nhiên thành 3 lô. Các lô thực nghiệm được bố trí như sau:

- Lô chứng: uống nước với thể tích 1 ml/100 g chuột.

- Lô thử liều 1: uống mẫu thử liều tương ứng 150 mg BBR/kg (liều gấp 3 lần liều có tác dụng hạ lipid máu trên mô hình gây tăng lipid máu ngoại sinh).

- Lô thử liều 2: uống mẫu thử liều tương ứng 450 mg BBR/kg (liều gấp 3 lần mức liều được áp dụng trong lô thử liều 1).

Cách tiến hành:

Chuột được cho uống mẫu thử hoặc nước cất theo đúng lô liên tục trong 4 tuần (28 ngày). Theo dõi tình trạng chung của chuột hàng ngày và cân nặng chuột thay đổi theo từng tuần. Sau 4 tuần lấy máu tĩnh mạch đuôi để xét nghiệm các thông số huyết học, sinh hóa của chuột.

Kết thúc nghiên cứu, chuột được mổ toàn bộ để quan sát cẩn thận lồng ngực và bụng cũng như quan sát đại thể các tổ chức, ưu tiên các tổ chức gan thận. Các cơ quan: gan, thận, phổi, tim, tuyến thượng thận, lách của tất cả chuột được cắt bỏ mô dính và cân lấy khối lượng ướt của chúng càng sớm càng tốt sau khi bóc tách để tránh bị khô.

Tiến hành kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan (tổn thương tế bào gan, tĩnh mạch cửa, mạch máu), thận (ống thận, tế bào thận) của 30% số chuột ở mỗi lô (mã hóa mẫu nghiên cứu để đảm bảo đánh giá khách quan). Xét nghiệm vi thể được thực hiện tại bộ môn Giải phẫu bệnh – Trường Đại học Y Hà Nội.

Nếu các con vật có biểu hiện độc, hoặc thay đổi có ý nghĩa một số thông số huyết học hoặc sinh hóa thì cần theo dõi sự phục hồi.

Thông số đánh giá:

- Tình trạng chung: da, lông, mắt, sự tiết dịch, phân, nước tiểu, hoạt động tự nhiên, hành vi, sự tiêu thụ thức ăn, nước uống. Theo dõi hằng ngày.

- Sự thay đổi khối lượng cơ thể: Theo dõi cân nặng chuột tại thời điểm trước khi bắt đầu dùng

mẫu thử (N0); 7, 14, 21, 28 ngày sau khi dùng mẫu thử (N7, N14, N21, N28).

- Các thông số huyết học: số lượng hồng cầu (RBC), nồng độ hemoglobin (HGB), tỷ lệ hematocrit (HCT), thể tích trung bình của hồng cầu (MCV), số lượng tiểu cầu (PLT), số lượng bạch cầu (WBC) và tỷ lệ % lymphocyt (LYM) tại thời điểm N28.

- Các thông số sinh hóa: aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), cholesterol toàn phần (TC), protein toàn phần (TP), creatinin (CRE), glucose (GLU) tại thời điểm N28.

- Quan sát, khối lượng các cơ quan và tỷ lệ so với khối lượng cơ thể chuột thực nghiệm trước khi mổ.

- Kết quả cấu trúc vi thể gan, thận của 30% số chuột ở mỗi lô.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đánh giá độc tính cấp của liposome berberin

3.1.1. Thử nghiệm thăm dò

Chuột cống trắng được uống liposome BBR với liều 2000 mg BBR/kg, 2 lần trong 24 giờ, mỗi lần cách nhau 2 giờ.

Sau khi uống mức liều là 2000 mg BBR/kg, chuột hoạt động bình thường, lông mượt, niêm mạc hồng, đồng tử mắt chuột bình thường, không có biểu hiện của khó thở hay tím tái, phân và nước tiểu bình thường. Vì vậy, mức liều 2000 mg BBR/kg được chọn để tiếp tục tiến hành thử nghiệm chính thức trên 5 chuột

3.1.2. Thử nghiệm chính thức

Với liều thử 2000 mg/kg:

Quan sát trên 5 chuột uống liposome BBR với mức liều 2000 mg BBR/kg cho thấy cả 5 chuột được thử nghiệm đều vận động và ăn uống bình thường, đồng tử mắt chuột bình thường, lông mượt, hô hấp bình thường. Như vậy, với mức liều 2000 mg BBR/kg chuột không có biểu hiện độc tính.

Thực tế nghiên cứu độc tính cấp tính của BBR đường uống trên chuột nhất chỉ ra mức liều

an toàn là 20,8 g/kg [11]. Do đó, mức liều cao hơn là 5000 mg BBR/kg được chọn để thử nghiệm, cũng là mức liều thử tới hạn trong mô hình liều cố định (OECD/OCED 420) [17].

Với liều thử tới hạn 5000 mg/kg:

Chuột cống trắng được uống liposome BBR với liều 5000 mg BBR/kg, 4 lần trong ngày, mỗi lần cách nhau 2 giờ. Sau khi uống mẫu thử với lượng lớn, một số chuột có đi ngoài phân nát nhưng sau đó nhanh chóng trở lại bình thường. Tiếp tục theo dõi chuột trong 14 ngày sau uống mẫu thử, không thấy xuất hiện triệu chứng bất thường nào, không có chuột nào chết. Các chuột đều hoạt động bình thường, phân, nước tiểu bình thường, niêm mạc hồng hào, lông mượt, phản xạ tốt với các kích thích. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của liposome BBR với liều tới hạn 5000 mg BBR/kg trên chuột cống đều không có biểu hiện độc tính, không có chuột nào chết. Do đó, giá trị LD₅₀ của liposome berberin có thể xác định gần đúng > 5000 mg/kg, không được phân loại theo GHS [18]. Kết quả xác định LD₅₀ có sự dao động giữa các nghiên cứu. Giá trị LD₅₀ là khác nhau với các đường dùng, nguồn gốc BBR và gốc muối của BBR. Trong các nghiên cứu trước đó, giá trị LD₅₀ qua đường uống của BBR sulfat ở chuột cống được báo cáo là hơn 1000 mg/kg [20]. Giá trị LD₅₀ của BBR sulfat chiết xuất từ *Berberis aristata* sau khi tiêm trong phúc mạc ở chuột cống là 205 mg/kg [21]. Trong khi đó, liều lượng an toàn của BBR khi uống ở chuột nhắt lên đến 20,8 g/kg và ở người là 2,97 g/kg [11].

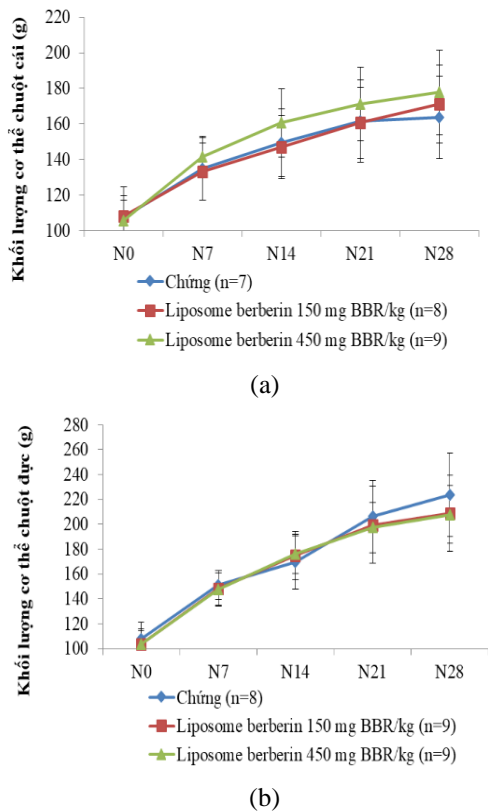
3.2. Đánh giá độc tính bán trường diễn của liposome berberin

3.2.1. Tình trạng chung

Trong thời gian tiến hành thí nghiệm, chuột cống trắng ở lô chứng và 2 lô uống mẫu thử đều hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, ăn uống tốt, phân khô.

3.2.2. Ảnh hưởng của liposome berberin đến khối lượng cơ thể chuột

Khối lượng cơ thể chuột tại thời điểm trước khi dùng mẫu thử, sau 7, 14, 21, 28 ngày sau khi dùng mẫu thử được trình bày trong Hình 1 (a, b).



Hình 1. Khối lượng cơ thể (a) chuột cái và (b) chuột đực ở các lô nghiên cứu (Số liệu biểu diễn dưới dạng M ± SD).

Bảng 1. Thông số huyết học của chuột ở các lô nghiên cứu (Số liệu biểu diễn dưới dạng M ± SD)

Giống	CÁI			ĐỰC			
	Lô	Liposome BBR		Chứng	Liposome BBR		
		Liều	150 mg BBR/kg		450 mg BBR/kg	150 mg BBR/kg	450 mg BBR/kg
	n	7	8	9	8	9	9
RBC (10 ¹² /L)		6,34 ± 0,87	6,27 ± 0,83	6,37 ± 0,46	5,95 ± 0,72	6,27 ± 0,93	6,15 ± 0,68
HGB (g/dL)		13,10 ± 2,75	14,01 ± 1,81	14,43 ± 1,23	13,66 ± 1,51	14,18 ± 1,92	13,83 ± 1,83
HCT (%)		28,36 ± 5,17	26,26 ± 3,63	27,46 ± 2,45	25,16 ± 3,69	26,76 ± 4,69	26,07 ± 3,16
MCV (fL)		43,10 ± 2,30	42,01 ± 1,74	43,11 ± 1,28	42,28 ± 3,22	42,66 ± 2,08	42,44 ± 1,28
WBC (10 ⁹ /L)		11,61 ± 1,29	10,50 ± 2,95	11,08 ± 2,49	8,84 ± 3,56	12,32 ± 4,1	10,28 ± 1,95
LYM (%)		14,06 ± 3,25	14,93 ± 1,72	16,98 ± 2,71	17,64 ± 2,27	16,70 ± 1,86	15,99 ± 3,27
PLT (10 ⁹ /L)		266,86 ± 50,29	235,13 ± 33,92	250,56 ± 37,28	264,38 ± 39,52	243,89 ± 29,18	256,44 ± 39,98

Số liệu ở Bảng 1 cho thấy các chỉ huyết học của chuột cống cả 2 giống đực và cái không có sự khác biệt tại thời điểm sau khi uống mẫu thử

Hình 1 cho thấy, trong 28 ngày nghiên cứu, cân nặng chuột cống cả hai giống đực và cái tăng đều ở cả 3 lô. Không có sự khác biệt về khối lượng chuột ban đầu hay tỷ lệ tăng khối lượng chuột giữa 2 lô chuột cống uống liposome BBR liều tương ứng 150 mg BBR/kg và 450 mg BBR/kg so với lô chứng cùng giống tại các thời điểm nghiên cứu ($p > 0,05$). Như vậy, liposome BBR liều tương ứng 150 mg BBR/kg và 450 mg BBR/kg không ảnh hưởng đến tình trạng chung và cân nặng chuột. Trong mô hình nghiên cứu tác dụng hạ lipid máu ngoại sinh, thời gian thử tác dụng là 4 tuần (28 ngày) [16]. Mặc dù nghiên cứu độc tính bán trường diễn được tiến hành với mô hình liều lặp lại chỉ có 28 ngày, nhưng mức liều liposome BBR được lựa chọn gấp 3 lần và 9 lần liều có tác dụng trên mô hình gây tăng lipid máu ngoại sinh (tương ứng 150 mg BBR/kg và 450 mg BBR/kg). Động vật nghiên cứu được lựa chọn là chuột cống trắng cả 2 giống, so sánh được tiến hành trên các nhóm chuột cùng giống để loại bỏ ảnh hưởng của giống trong biểu hiện độc tính bán trường diễn.

3.2.3. Ảnh hưởng của liposome berberin đến thông số huyết học chuột

Kết quả định lượng các thông số huyết học tại thời điểm N28 được trình bày ở Bảng 1.

28 ngày ở lô chứng so với lô thử cùng giống uống liposome BBR ở cả 2 mức liều tương ứng 150 mg BBR/kg và 450 mg BBR/kg ($p > 0,05$). Như

vậy, liposome BBR với mức liều gấp 3 và gấp 9 lần mức liều có tác dụng trên mô hình gây tăng lipid máu ngoại sinh không thể hiện các tác động có hại với chức năng tạo máu của chuột thực nghiệm sau 28 ngày uống.

3.2.4. Ảnh hưởng của liposome berberin đến thông số sinh hóa chuột

Một số thông số sinh hóa tại thời điểm N28 được trình bày ở Bảng 2.

Số liệu ở Bảng 2 cho thấy các thông số sinh hóa gồm: AST, ALT, TC, TP, CRE, GLU tại thời điểm sau khi cho chuột uống mẫu thử liposome BBR 28 ngày ở cả 2 mức liều 150 mg/kg và 450 mg/kg không có sự khác biệt so với lô chứng khi so sánh cùng giống ($p > 0,05$). Như vậy liposome

BBR ở cả 2 mức liều trên lặp lại 28 ngày không làm thay đổi một số chức năng gan (chuyển hóa protein, chuyển hóa lipid, chuyển hóa glucid), không có tác động tiêu cực tới chức năng lọc của cầu thận.

3.2.5. Phân tích mô bệnh học của chuột thực nghiệm

Sau 28 ngày uống mẫu thử, chuột được mổ toàn bộ để quan sát đại thể các cơ quan trong lồng ngực và ổ bụng. Các cơ quan: gan, thận, phổi, tim, tuyến thượng thận, lách của tất cả chuột được cân lấy khối lượng. Đồng thời, quan sát vi thể các cơ quan, ưu tiên các tổ chức gan thận.

Bảng 2. Thông số sinh hóa chuột ở các lô nghiên cứu (Số liệu biểu diễn dưới dạng $M \pm SD$)

Giống	CÁI			ĐỰC		
Lô	Chứng	Liposome BBR		Chứng	Liposome BBR	
Liều		150 mg BBR/kg	450 mg BBR/kg		150 mg BBR/kg	450 mg BBR/kg
n	7	8	9	8	9	9
AST (U/L)	264,11 ± 36,96	273,70 ± 37,61	243,53 ± 37,81	253,77 ± 39,83	299,42 ± 56,47	231,70 ± 51,68
ALT (U/L)	134,90 ± 32,62	143,97 ± 14,05	117,74 ± 17,25	144,93 ± 26,23	142,44 ± 24,13	140,33 ± 26,53
TC (mmol/L)	1,66 ± 0,14	1,92 ± 0,44	1,71 ± 0,32	1,93 ± 0,27	2,14 ± 0,29	1,72 ± 0,36
TP (g/L)	82,64 ± 15,77	89,35 ± 18,96	94,23 ± 12,05	91,55 ± 5,92	100,73 ± 9,94	95,55 ± 11,28
CRE (g/L)	60,41 ± 8,42	56,34 ± 5,97	58,64 ± 4,92	58,17 ± 12,66	53,27 ± 3,55	57,04 ± 4,41
GLU (mmol/L)	5,15 ± 0,74	5,06 ± 0,72	5,69 ± 0,47	5,24 ± 1,41	4,10 ± 0,74	5,96 ± 0,69

Bảng 3. Tỷ lệ khối lượng các cơ quan so với khối lượng cơ thể của chuột ở các lô nghiên cứu (Số liệu biểu diễn dưới dạng $M \pm SD$)

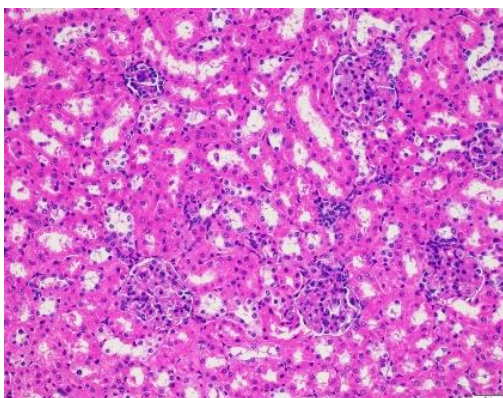
Giống	CÁI			ĐỰC		
Lô	Chứng	Liposome BBR		Chứng	Liposome BBR	
Liều		150 mg BBR/kg	450 mg BBR/kg		150 mg BBR/kg	450 mg BBR/kg
n	7	8	9	8	9	9
Gan (%)	4,82 ± 0,91	4,91 ± 0,38	5,35 ± 0,56	4,84 ± 0,74	5,13 ± 0,63	5,36 ± 0,78
Thận (%)	0,89 ± 0,19	0,82 ± 0,04	0,79 ± 0,09	0,81 ± 0,15	0,82 ± 0,08	0,80 ± 0,08
Phổi (%)	0,94 ± 0,22	0,85 ± 0,11	1,01 ± 0,40	0,77 ± 0,10	0,85 ± 0,10	0,94 ± 0,15
Tim (%)	0,41 ± 0,06	0,46 ± 0,07	0,43 ± 0,04	0,46 ± 0,07	0,46 ± 0,08	0,45 ± 0,05
TTT (%)	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Lách (%)	0,53 ± 0,13	0,47 ± 0,10	0,50 ± 0,05	0,57 ± 0,11	0,63 ± 0,18	0,62 ± 0,10

Ảnh hưởng của liposome BBR đến cơ quan chuột cống trắng:

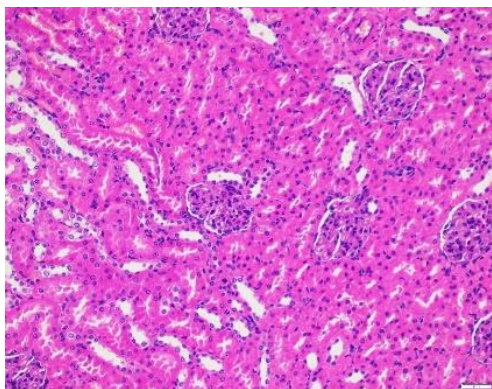
Sau khi mổ chuột, quan sát thấy các tổ chức gan, thận, tim, phổi, hệ thống tiêu hóa của chuột ở lô chứng và 2 lô dùng mẫu thử đều bình thường, không có biểu hiện xung huyết hay dấu hiệu bị tổn thương ở chuột cống cả 2 giống đực cái. Tỷ lệ khối lượng các cơ quan của chuột cống ở các lô nghiên cứu so với khối lượng toàn bộ cơ thể được trình bày ở Bảng 3.

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy tỷ lệ khối lượng các tổ chức gan, thận, phổi, tim, tuyến thượng thận và lách tại thời điểm sau khi cho chuột uống mẫu thử liposome BBR lặp lại 28 ngày ở cả 2 mức liều 150 mg BBR/kg và 450 mg BBR/kg không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng khi so sánh cùng giống ($p > 0,05$).

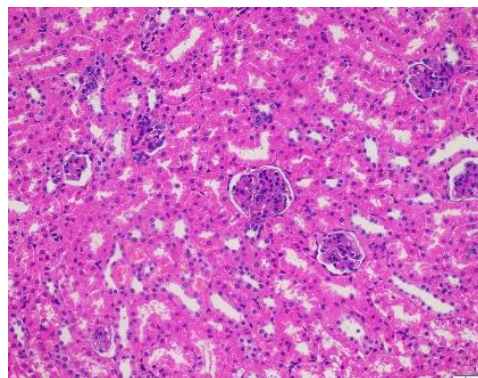
Ảnh hưởng của liposome BBR đến cấu trúc vi thể:



A. Mô thận lô chứng cái (HEx200).



B. Mô thận lô cái thử liều liposome BBR 150 mg BBR/kg (HEx200).



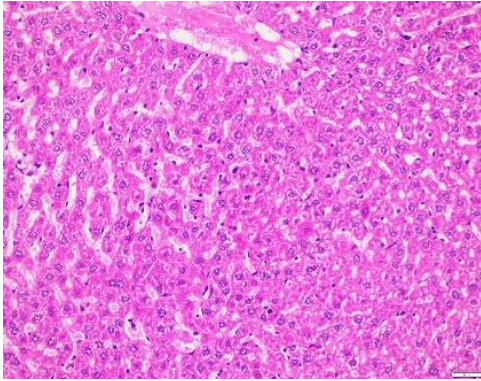
C. Mô thận lô cái thử liều liposome BBR 450 mg BBR/kg (HEx200).

Hình 5. Hình ảnh vi thể gan của chuột cống cái ở các lô nghiên cứu.

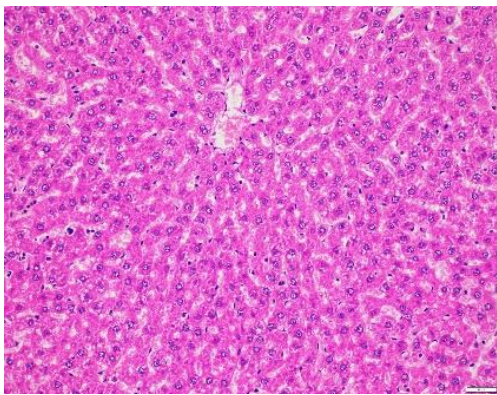
Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan (tổn thương tế bào gan, tĩnh mạch cửa, mạch máu), thận (ông thận, tế bào thận) của 30% số chuột ở mỗi lô. Kết quả được trình bày trong các Hình 5, Hình 6, Hình 7, Hình 8.

Hình 5A cho thấy cấu trúc gan trên các mảnh cắt của mô gan lô chứng cái không bị đảo lộn. Không xuất hiện tế bào gan thoái hóa, hoại tử nhu mô gan, viêm, xơ hóa hay tế bào gan nhiễm mỡ. Có tình trạng mô gan sung huyết nhẹ. Hình 5B cho thấy hình ảnh cấu trúc gan trên các mảnh cắt của mô gan lô thử liposome BBR với liều 150 mg BBR/kg tương tự như ở lô chuột chứng cái, cũng có tình trạng xung huyết nhẹ. Hình 5C cho thấy cấu trúc gan trên các mảnh cắt của mô gan không bị đảo lộn. Không xuất hiện tế bào gan thoái hóa, hoại tử nhu mô gan, viêm, xơ hóa. Có tình trạng sung huyết nhẹ, một số tế bào thoái hóa mỡ. Không nhận thấy sự khác biệt đáng kể về cấu trúc vi thể gan giữa lô chứng và các lô thử trên chuột cống cái.

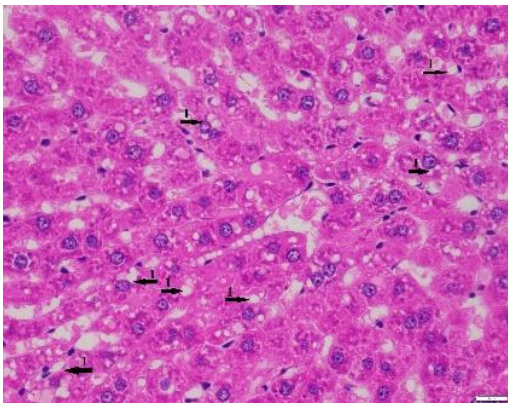
Hình 6A, 6B và 6C cho thấy trên các mảnh cắt của mô gan, cấu trúc gan không bị đảo lộn. Không xuất hiện tế bào gan thoái hóa, hoại tử nhu mô gan, viêm, xơ hóa hay sung huyết. Hình 6C có xuất hiện một số tế bào thoái hóa mỡ. Như vậy, không nhận thấy sự khác biệt đáng kể về cấu trúc vi thể gan giữa lô chứng và lô thử liều 150 mg BBR/kg trên chuột cống đực. Lô đực thử liều liposome BBR tương ứng 450 mg BBR/kg có một số tế bào thoái hóa mỡ.



A. Mô gan lô chứng đực (HEx200).



B. Mô gan lô đực thử liều liposome BBR 150 mg BBR/kg (HEx200).

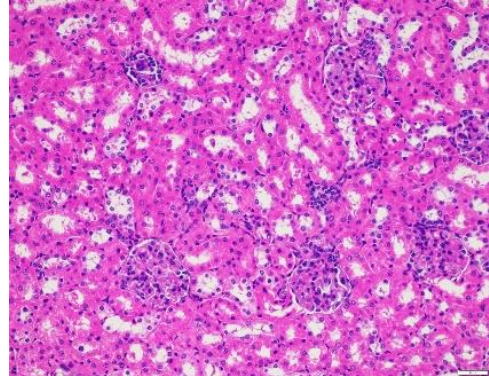


C. Mô gan lô đực thử liều liposome BBR 450 mg BBR/kg (HEx400).

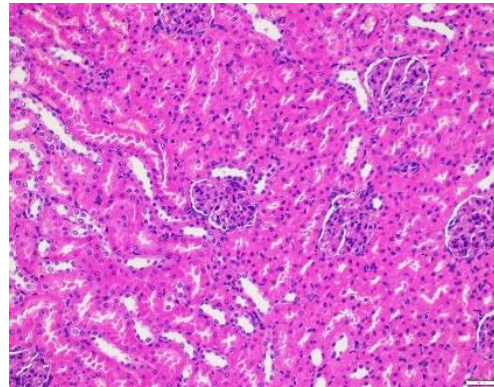
Hình 6. Hình ảnh vi thể gan của chuột công đực ở các lô nghiên cứu.

Hình 7A, 7B và 7C cho thấy, trên các mảnh cắt của nhu mô thận, không thấy tình trạng thoái hóa, viêm, sung huyết và chảy máu. Mô thận

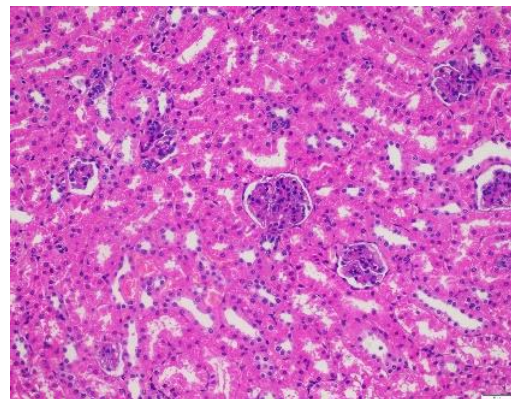
trong giới hạn bình thường. Như vậy, không có sự khác biệt về cấu trúc vi thể thận giữa lô chứng và các lô thử trên chuột cống cái.



A. Mô thận lô chứng cái (HEx200).

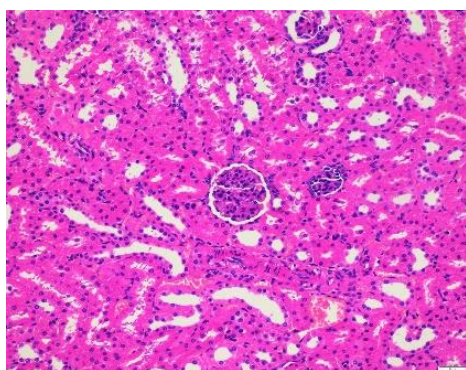
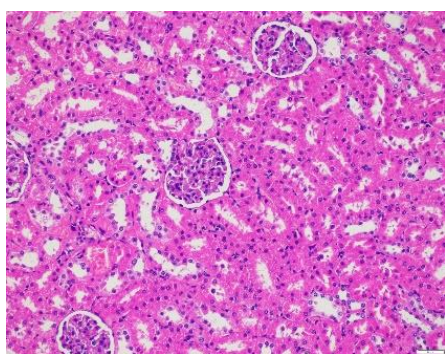
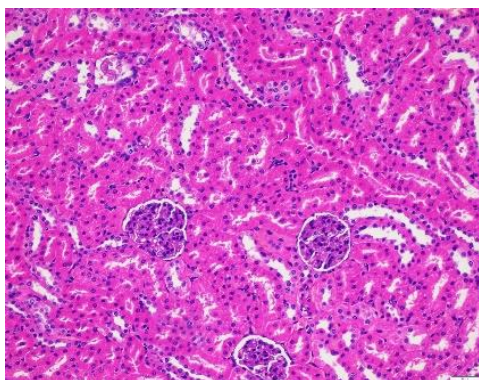


B. Mô thận lô cái thử liều liposome BBR 150 mg BBR/kg (HEx200).



C. Mô thận lô cái thử liều liposome BBR 450 mg BBR/kg (HEx200).

Hình 7. Hình ảnh vi thể thận của chuột cống cái ở các lô nghiên cứu.

A. Mô thận lô chứng đực (HE \times 200).B. Mô thận lô đực thử liều liposome BBR 150 mg BBR/kg (HE \times 200).C. Mô thận lô đực thử liều liposome BBR 450 mg BBR/kg (HE \times 200).

Hình 8. Hình ảnh vi thể thận của chuột công đực ở các lô nghiên cứu.

Hình 8A, 8B và 8C cho thấy, trên các mảnh cắt của nhu mô thận, không thấy tình trạng thoái hóa, viêm, sung huyết và chảy máu. Mô thận trong giới hạn bình thường. Như vậy, không có sự khác biệt về cấu trúc vi thể thận giữa lô chứng và các lô thử trên chuột công đực.

4. Kết luận

Liposome BBR được xác định có mức LD₅₀ > 5000 mg/kg. Mẫu thử liposome BBR liều tương ứng 150 mg và 450 mg BBR/kg được uống liên tục trong 28 ngày không ảnh hưởng đến tình trạng chung và cân nặng chuột, không ảnh hưởng đến các thông số huyết học, sinh hóa. Liposome BBR cũng không gây biến đổi rõ rệt về đại thể cũng như vi thể của mô gan, thận trên chuột nghiên cứu. Trong phạm vi nghiên cứu cho thấy liposome BBR an toàn khi dùng qua đường uống.

Lời cảm ơn

Công trình khoa học này được hỗ trợ kinh phí từ Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội (đề tài mã số 01C-06/04-2020-03).

Tài liệu tham khảo

- [1] M. A. Neag, A. Mocan, J. Echeverría, R. M. Pop, C. I. Bocsan, G. Crişan, A. D. Buzoianu, Berberine: Botanical Occurrence, Traditional Uses, Extraction Methods, and Relevance in Cardiovascular, Metabolic, Hepatic, and Renal Disorders, *Frontiers in Pharmacology*, Vol. 9, 2018, pp. 557, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00557>.
- [2] M. Tillhon, L. M. G. Ortiz, P. Lombardi, A. I. Scovassi, Berberine: New Perspectives for Old Remedies, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 84, No. 10, 2012, pp. 1260-1267, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.07.018>.
- [3] Y. Wang, X. Yi, K. Ghanam, S. Zhang, T. Zhao, X. Zhu, Berberine Decreases Cholesterol Levels in Rats Through Multiple Mechanisms, Including Inhibition of Cholesterol Absorption, *Metabolism*, Vol. 63, No. 9, 2014, pp. 1167-1177, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.05.013>.
- [4] W. Kong, J. Wei, P. Abidi, M. Lin, S. Inaba, C. Li, Y. Wang, Z. Wang, S. Si, H. Pan, S. Wang, J. Wu, Y. Wang, Z. Li, J. Liu, J. D. Jiang, Berberine is a Novel Cholesterol-Lowering Drug Working Through A Unique Mechanism Distinct from Statins, *Nat Med*, Vol. 10, No. 12, 2004, pp. 1344-1351, <https://doi.org/10.1038/nm1135>.
- [5] Y. Hu, E. A. Ehli, J. Kittelsrud, P. J. Ronan, K. Munger, T. Downey, K. Bohlen, L. Callahan, V. Munson, M. Jahnke, Lipid-lowering Effect of

- Berberine in Human Subjects and Rats, *Phytomedicine*, Vol. 19, No. 10, 2012, pp. 861-867, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.05.009>.
- [6] Y. T. Liu, H. P. Hao, H. G. Xie, L. Lai, Q. Wang, C. X. Liu, G. J. Wang, Extensive Intestinal First-Pass Elimination and Predominant Hepatic Distribution of Berberine Explain Its Low Plasma Levels in Rats, *Drug Metab Dispos*, Vol. 38, No. 10, 2010, pp. 1779-1784, <https://doi.org/10.1124/dmd.110.033936>.
- [7] P. L. Tsai, T. H. Tsai, Hepatobiliary Excretion of Berberine, *Drug Metabolism Disposition*, Vol. 32, No. 4, 2004, pp. 405-412, <https://doi.org/10.1124/dmd.32.4.405>.
- [8] X. Zhang, F. Qiu, J. Jiang, C. Gao, Y. Tan, Intestinal Absorption Mechanisms of Berberine, Palmatine, Jateorhizine, and Coptisine: Involvement of P-glycoprotein, *Xenobiotica*, Vol. 41, No. 4, 2011, pp. 290-296, <https://doi.org/10.3109/00498254.2010.529180>.
- [9] J. Yin, H. Xing, J. Ye, Efficacy of Berberine in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus, *Metabolism*, Vol. 57, No. 25, 2008, pp. 712-717, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.01.013>.
- [10] S. Z. K. Rad, M. Rameshrad, H. Hosseinzadeh, Toxicology Effects of Berberis Vulgaris (Barberry) and Its Active Constituent, Berberine: A Review, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, Vol. 20, No. 5, 2017, pp. 516-529, <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.8676>.
- [11] M. M. Kheir, Y. Wang, L. Hua, J. Hu, L. Li, F. Lei, L. Du, Acute Toxicity of Berberine and Its Correlation with the Blood Concentration in Mice, *Journal of Food Chemical Toxicology*, Vol. 48, No. 4, 2010, pp. 1105-1110, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.033>.
- [12] C. E. Ho, Y. L. Goh, C. Zhang, From Prejudice to Evidence: The Case of Rhizoma Coptidis in Singapore, *Journal of Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, Vol. 2014, 2014, pp. 1-7, <https://doi.org/10.1155/2014/871720>.
- [13] M. Mahmoudi, S. Z. T. Rabe, M. B. Mood, G. Karimi, B. Memar, M. Rahnama, N. Tabasi, M. Khazaei, B. R. Zanjani, Immunotoxicity Induced in Mice by Subacute Exposure to Berberine, *Journal of Immunotoxicology*, Vol. 13, No. 2, 2016, pp. 255-262, <https://doi.org/10.3109/1547691X.2015.1058306>.
- [14] N. Ning, Y. Z. Wang, Z. Y. Zou, X. G. Li, Pharmacological and Safety Evaluation of Fibrous Root of Rhizoma Coptidis, *Journal of Environmental Toxicology Pharmacology*, Vol. 39, No. 1, 2015, pp. 53-69, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.006>.
- [15] T. T. Duong, T. T. H. Yen, L. T. Nguyen, T. D. Nguyen, T. Q. T. Nguyen; T. H. L. Nghiem, H. T. Pham, A. Raal, J. Heinämäki, T. M. H. Pham, Berberine-loaded Liposomes for Oral Delivery: Preparation, Physicochemical Characterization and In Vivo Evaluation in An Endogenous Hyperlipidemic Animal Model, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 616, 2022, pp. 121525, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121525>.
- [16] D. T. Thuan, N. T. Q. Trang, N. T. Duong, N. T. Hai, P. T. M. Hue, In vivo Evaluation of Berberine-loaded Liposomes in the Exogenous Hyperlipidemia Animal Model, *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 39, No. 4, 2023, pp. 74-82, <https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4573>.
- [17] OECD/OCDE, Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, In *OECD Guideline for Testing of Chemicals 2001*.
- [18] United Nations, Acute Toxicity, in: *United Nations, Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (Fourth Revised Edition)*; New York and Geneva, 2011, pp. 109-207.
- [19] OECD/OCDE, Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents, In *OECD Guideline for Testing of Chemicals*, OECD/OCDE, Ed. 2008.
- [20] Z. Gardner, M. M. Guffin, *American Herbal Products Association's Botanical Safety Handbook (2nd ed.)*, CRC Press, 2013.
- [21] S. Kulkarni, P. Dandiya, N. Varandani, Pharmacological Investigations of Berberine Sulphate, *Japanese Journal of Pharmacology*, Vol. 22, No. 1, 1972, pp. 11-16, [https://doi.org/10.1016/S0021-5198\(19\)31702-0](https://doi.org/10.1016/S0021-5198(19)31702-0).