

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG ĐIỀU TRỊ VẾT THƯƠNG THỰC NGHIỆM CỦA GEL NANO BERBERIN TRÊN LÂM SÀNG

Nguyễn Ngọc Tuấn, Lê Quốc Chiêu, Ngô Ngọc Hà

Bệnh viện Bỏng quốc gia Lê Hữu Trác

TÓM TẮT

Berberin được phân lập từ cây *Coscinium fenestratum* và một số cây trong họ *Ranunculaceae* có tác dụng chữa vết thương (VT), vết bỏng. Nghiên cứu xác định tác dụng điều trị vết thương mất da ở thỏ của gel nano Berberine do Bệnh viện Bỏng quốc gia Lê Hữu Trác sản xuất.

Tiến hành trên 45 con thỏ, tạo vết thương mất da đường kính 3,5cm ở 2 bên da lưng thỏ (2 vết thương/thỏ), thỏ được chia thành 3 nhóm (15 thỏ, 30 vết thương/nhóm).

+ Nhóm nghiên cứu (A): Điều trị tại chỗ bằng gel nano Berberin.

+ Nhóm chứng (B): Điều trị bằng SSD.

+ Nhóm chuẩn (C): Điều trị bằng nước muối sinh lý 0,9%.

Theo dõi các triệu chứng lâm sàng toàn thân và tại chỗ. Kết quả: Không gặp biểu hiện dị ứng hoặc kích ứng tại chỗ và toàn thân; dịch xuất tiết và viêm nề vết thương nhóm A giảm hơn nhóm B và C; số vết thương khỏi của nhóm A sau 2 tuần và 3 tuần đều cao hơn với nhóm chứng và so sánh; tỷ lệ tái biểu mô và tốc độ biểu mô hoá sau 2 tuần ở nhóm nghiên cứu cũng cao hơn.

Kết luận: Gel nano Berberin điều trị vết thương mất da thực nghiệm cho thấy an toàn, có tác dụng chống viêm, ức chế vi khuẩn, kích thích liền vết thương.

Từ khóa: Gel nano Berberin, thỏ, vết thương mất da

ABSTRACT

Berberine is isolated from the plant *Coscinium fenestratum* and some plants in the family *Ranunculaceae* have affected wound healing and burn to heal. The research to determine the repair of full skin loss wounds of rabbits with Berberine nano gel produced by the National Burn Hospital.

Conducted on 45 rabbits, creating a skin loss of 3.5cm of diameter on each side of the rabbit's back (2 wounds/rabbit), rabbits were separated into 3 groups (15 rabbits, 30 wounds/each group).

+ Research group (Group A): Topical treatment with Berberine nano gel.

+ Control group (Group B): Topical treatment with SSD 1%.

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

Email: ngoctuan64@gmail.com

Ngày nhận bài: 25/7/2022; Ngày nhận xét: 24/8/2022; Ngày duyệt bài: 30/8/2022

DOI: <https://doi.org/10.54804/yhthvb.3.2022.141>

+ *Standard group (Group C): Topical treatment with 0.9% Sodium Chloride.*

Keeping track of local and systemic symptoms. Results: There was no local or systemic allergic or sensitization; exudation and wound inflammation decreased more in Group A than in Groups B and C; the number of wound healing in Group A between 2 weeks and 3 weeks was higher than in Group B and Group C; The rate of re-epithelialization and the speed of epithelialization of Group A after 2 weeks were also higher than other groups.

Conclusion: *Berberine nano gel for treating skin loss wounds has been demonstrated in the study to be safe, anti-inflammatory, bacteria inhibiting, and wound healing stimulating.*

Keywords: *Berberine nano gel, rabbit, skin loss wound.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vết thương (VT) được định nghĩa là sự phá vỡ tính liên tục của tế bào, giải phẫu và chức năng của một mô sống và có thể gây ra do yếu tố vật lý, hóa học, nhiệt, vi sinh vật hoặc miễn dịch học. Nói cách khác, vết thương là sự phá vỡ tính toàn vẹn của biểu mô và có thể đi kèm với sự phá vỡ cấu trúc và chức năng của mô bình thường bên dưới. Để phục hồi cấu trúc của mô bị thương, phải xảy ra một quá trình phức tạp liên quan đến sự di chuyển, tăng sinh, tương tác và biệt hóa của nhiều loại tế bào (ví dụ: Biểu bì, hạ bì, tế bào viêm thâm nhiễm), tương tác phân tử sinh học, tổng hợp các thành phần nền matrix và mạng lưới tín hiệu phức tạp [1-3].

Liền vết thương (LVT) cấp tính bao gồm các giai đoạn chồng chéo, có tương tác các sự kiện ở mức phân tử, tế bào và ngoại bào, kết thúc bằng việc đóng vết thương trong vòng vài ngày hoặc vài tuần [3, 4].

Để nghiên cứu quá trình LVT có thể tiến hành trên động vật. Nhìn chung, các mô hình VT in vivo có những ưu điểm. Chúng cho phép nghiên cứu sự tương tác của nhiều quần thể tế bào / hệ thống cơ thể trong quá trình sửa chữa; đánh giá các yếu tố của quá trình LVT; cho phép đánh

giá sự suy giảm có chọn lọc của các gen cụ thể ảnh hưởng tới LVT; nghiên cứu chức năng hệ miễn dịch; cho phép tạo ra nhiều VT trong một con vật; và cũng có thể mô hình hóa các nguyên nhân chữa LVT khác nhau (bỏng, phẫu thuật, chấn thương, v.v.) [2, 4, 5].

Berberin chlohydrid có nguồn gốc tự thực vật, từ cây vàng đắng, hoàng đắng vốn sẵn có ở Việt Nam. Berberin cũng được dùng phổ biến để điều trị bỏng. Theo Lê Thế Trung, Nguyễn Liêm, Trần Xuân Vận, dung dịch Berberin 0,1% dùng điều trị VT, vết bỏng nhiễm khuẩn, vết loét (như ở bệnh nhân đái tháo đường) có tác dụng giảm đau, giảm viêm, giảm dịch xuất tiết, giảm phù nề, giảm tính thấm thành mạch, kháng khuẩn với *S. aureus*, *P. aeruginosa*, vi khuẩn đường ruột như *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*. Bệnh viện Bỏng Quốc gia năm 2012 đã tiến hành nghiên cứu bào chế cream Berberin đạt tiêu chuẩn cơ sở. Ứng dụng trong điều trị VT (cấp và mạn tính, vết bỏng) cho thấy thuốc có tác dụng kháng khuẩn, chống viêm, kích thích LVT [6].

Nghiên cứu hiện đại hoá bào chế bài thuốc từ thực vật là xu thế tất yếu, vừa phát huy ưu thế sẵn có của hoạt chất

(như nguồn nguyên liệu, ít độc, duy trì tác dụng bền vững...) vừa nâng cao tác dụng ức chế vi khuẩn là nhu cầu cấp thiết, góp phần nâng cao chất lượng điều trị VT, vết bỏng.

Chúng tôi đã nghiên cứu bào chế được gel nano Berberin, thuốc đã được nghiên cứu độc tính cấp, bán cấp, khả năng dung nạp. Bước tiếp theo chúng tôi cần có những nghiên cứu điều trị thực nghiệm. Chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng điều trị của gel nano Berberin tại VT thực nghiệm trên thỏ. Trong phạm vi bài báo, chúng tôi trình bày tác dụng điều trị của gel nano Berberin tại chỗ VT thực nghiệm trên khía cạnh diễn biến lâm sàng.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Gel nano Berberin do khoa Dược, Bệnh viện Bông quốc gia Lê Hữu Trác bào chế, đạt tiêu chuẩn cơ sở (TCCS).

Thuốc đối chứng: Cream SSD do xí nghiệp dược phẩm Trung ương Huế sản xuất, đạt TCCS.

2.2. Động vật thí nghiệm

Thỏ nhà khỏe mạnh, không phân biệt giống, trọng lượng 2 - 2,2kg. Trước khi nghiên cứu, thỏ được theo dõi từ 4 - 5 ngày, lựa chọn thỏ khỏe mạnh, nhanh nhẹn, lông mượt, không có bệnh ngoài da và đường tiêu hoá.

Thỏ nghiên cứu được nuôi dưỡng trong điều kiện chung của phòng thí nghiệm từ 5 ngày trước khi tiến hành nghiên cứu (OECD 402, 2017, trang 3-4) [7].

Cụ thể: Ăn thức ăn theo tiêu chuẩn cho động vật nghiên cứu, nước (đun sôi để nguội) uống tự do. Thỏ 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 (ánh sáng) đêm xem kẽ: 12/12 giờ. Hàng ngày theo dõi ghi chép diễn biến kết quả thí nghiệm. Số lượng thỏ là 45 con.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- *Phương pháp gây vết thương và thiết kế nghiên cứu:*

Thỏ được gây mê tĩnh mạch bằng Ketamin liều 10mg/kg trọng lượng cơ thể. Thỏ được cố định vào bàn thí nghiệm chuyên dụng.

Cạo lông hai bên vùng lưng đối xứng qua cột sống, làm sạch lông bằng kéo và sau đó bằng lưỡi dao cạo, sát trùng cồn 70 độ. Sau đó vẽ vòng tròn đường kính 3,5cm trên da lưng 2 bên. Tạo vết thương mất toàn bộ da bằng dao mổ thường và kéo với đường kính 3,5cm theo hình vẽ. Diện tích vết thương sẽ là $\pi r^2 = 3,14 \times 1,75^2 = 9,61\text{cm}^2$. Sau đó, thỏ được chia thành 3 nhóm:

Nhóm nghiên cứu (A): Vết thương được điều trị gel nano Berberin 1%; bao gồm 15 thỏ (30 VT) ở 2 bên cột sống thỏ. Tiến hành bôi lớp mỏng gel nano berberin lên bề mặt VT; đắp 4 - 6 lớp gạc khô vô trùng, băng kín, cố định thêm bằng băng dính (tránh tụt băng gạc do thỏ chạy nhảy, do dùng mồm để cởi bỏ băng gạc hoặc liếm vết thương). Thay băng hàng ngày theo quy trình tới khỏi.

Nhóm so sánh (B): Vết thương được điều trị bằng SSD 1%, gồm 15 con, mỗi con bao gồm 2 VT. Tiến hành bôi 1 lớp mỏng cream SSD 1% lên VT ở 2 bên cột sống thỏ; đắp 4 - 6 lớp gạc vô khuẩn khô, băng kín lại. Thay băng hàng ngày tới khỏi.

Nhóm chuẩn (C): Vết thương được điều trị bằng Natri Chloride 0,9%. Gạc tẩm

dung dịch nước muối đắp lên VT. Đắp 4 - 6 ngày tới khỏi. lớp gạc khô, băng kín. Thay băng hàng



(a)



(b)



(c)



(d)

Ảnh 2.1. (a): Vẽ tạo tổn thương 2 bên cột sống ; (b): Vết thương sau khi được tạo ra; (c): Vết thương được bôi SSD; (d): Băng kín vết thương

- *Chỉ tiêu đánh giá toàn thân:*

Trọng lượng thỏ: Theo dõi các thời điểm trước khi nghiên cứu, sau đó 5 - 7 ngày cân lại tới khi khỏi. Thời điểm cân: Trước khi thỏ ăn sáng (8h).

Tình trạng ăn, uống, tiêu hóa, sinh hoạt đi lại của thỏ

- *Chỉ tiêu đánh giá tại chỗ:* Theo dõi diễn biến hàng ngày các triệu chứng sau:

Kích thước VT: Đo bằng thước kỹ thuật (đến 0,05 mm).

Tình trạng viêm nề VT và viền mép với biểu hiện sưng nóng đỏ tại VT và da lành.

Tình trạng nhiễm trùng VT: Được đánh giá bằng lâm sàng quan sát VT mỗi lần thay băng, chỉ tiêu theo dõi gồm có lượng dịch tiết, sự xuất hiện mủ, mùi vết thương, những thay đổi về bề ngoài vết thương như ban đỏ và phù nề (Exudation, Purulent efflux, Efflux odor, Erythema, and Edema), những triệu chứng toàn thân về trình trạng nhiễm trùng nếu có.

Sử dụng thang điểm đánh giá tình trạng nhiễm trùng như sau [8, 9]: 0 điểm: Không tìm thấy thâm nhiễm; 1 điểm: Dịch tiết ít, có mùi nhẹ (Mild exudation and odor), mủ không rõ ràng; 2 điểm: Dịch tiết vừa (moderne), có mùi, dịch mủ vừa phải (moderne), có ban đỏ (erythema); 3 điểm: Dịch tiết nhiều, chảy mủ, có mùi hôi, phù nề và ban đỏ.

Tình trạng biểu mô hóa bờ mép VT: Đánh giá bằng lâm sàng, chụp ảnh kỹ thuật số.

Tính diện tích VT bằng phương pháp kẻ ô vuông giấy bóng kính: Áp giấy bóng kính vô khuẩn được kẻ thành nhiều ô vuông (mỗi ô là 1 x 1cm).

Tỷ lệ % tái biểu mô (tốc độ LVT - wound healing rate, WHR) tại các thời điểm sau 1 tuần tới khỏi tính theo công thức sau [4]:

(diện tích VT ban đầu - diện tích VT hiện tại) / diện tích VT ban đầu.

Kết quả trị giá bằng 1: Hoàn toàn tái biểu mô. Bằng 0: Không có dấu hiệu tái biểu mô; > 0: Giảm diện tích; < 0: Tăng diện tích.

Tốc độ biểu mô hoá tại thời điểm sau 1 tuần và sau 2 tuần, công thức:

(diện tích VT ban đầu - diện tích VT còn lại) / 7 ngày

Số ngày vết thương khỏi hoàn toàn

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu được tính ra số trung bình hoặc tỷ lệ % (độ tin cậy 95%), so sánh theo thuật toán T test hoặc khi bình phương. Số liệu bán định lượng thống kê theo thuật toán phi tham số. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Diễn biến toàn thân của thỏ

Sau gây vết thương khoảng 40 phút, thỏ tỉnh táo hoàn toàn.

Trong ngày đầu sau bỏng: Thỏ mệt, ít đi lại hơn, ăn uống kém hơn.

Tới ngày thứ 2: Thỏ sinh hoạt, chạy nhảy, ăn uống, đi tiểu như bình thường. Không gặp rối loạn tiêu hoá như ỉa chảy, ăn kém. Không gặp nhiễm khuẩn/nấm ngoài da lành.

Không có thỏ chết trong quá trình nghiên cứu.

3.1.1. Theo dõi trọng lượng thỏ trong quá trình nghiên cứu

Bảng 3.1. Trọng lượng thỏ trong quá trình nghiên cứu

| Thời điểm | Trọng lượng trung bình thỏ (kg) | | |
|------------------|---------------------------------|-------------|-------------|
| | Nhóm A | Nhóm B | Nhóm C |
| Trước nghiên cứu | 2,41 ± 0,37 | 2,37 ± 0,34 | 2,64 ± 0,19 |
| Sau 1 tuần | 2,35 ± 0,34 | 2,37 ± 0,37 | 2,62 ± 0,14 |
| Sau 2 tuần | 2,39 ± 0,36 | 2,44 ± 0,30 | 2,60 ± 0,18 |
| p | > 0,05 | > 0,05 | > 0,05 |

Trọng lượng của thỏ trong từng nhóm sau 1 - 2 tuần không khác biệt so với trước nghiên cứu.

3.2. Diễn biến tại chỗ vết thương thỏ

Bảng 3.2. Diễn biến lâm sàng tại chỗ vết thương thỏ

| Thời điểm | Vết thương nhóm A (n = 30) | Vết thương nhóm B (n = 30) | Vết thương nhóm C (n = 30) |
|--------------------------------|---|--|--|
| T0: Trước NC | Tổn thương mất toàn bộ da. Nền VT sạch, phẳng, lộ rõ mạch máu và cơ dưới da. Không có hoại tử, giả mạc. Không viêm nề sung huyết. | | |
| T1 (3 ngày đầu sau tổn thương) | VT sạch hơn vùng B và C, khác biệt rõ tăng lên theo thời gian. Nền tổn thương có giả mạc trắng, lớp gel bám màu trắng hoặc nâu nhạt xen lẫn màu hồng đỏ, nhiều ở trung tâm. Dịch tiết tăng dần, chủ yếu mức độ ít và vừa. Viêm nề cũng tăng dần, ít hơn B và C. Từ ngày thứ 3 xuất hiện vảy mỏng nâu nhạt ở bờ mép (30 VT). Xuất hiện co kéo tăng dần (đáy xuất hiện nếp gò ghề không bằng phẳng). | Có sự khác biệt với vùng A. VT nhiều giả mạc, lớp gel che phủ gần hoặc toàn bộ bề mặt, dày lên theo thời gian (sau 3 ngày hầu như che phủ toàn bộ). Dịch tiết tăng dần, mức độ vừa và nhiều; nhiều hơn A. Viêm nề tăng. Từ ngày thứ 3 xuất hiện vảy mỏng nâu nhạt ở bờ mép (6/30 VT). Co kéo tăng dần. | VT nhiều giả mạc xen lẫn nền tổn thương đỏ. Tới ngày 3, hầu hết bề mặt VT được phủ bởi lớp giả mạc và dịch đông vón màu trắng đục dày lên dần; dịch tiết tăng dần (nhiều hơn A và B), chủ yếu mức độ nhiều và vừa. Viêm nề tăng, chưa thấy vảy mỏng ở viền mép VT. Co kéo VT nhẹ |
| T2 (sau 5 - 7 ngày) | Dịch tiết, giả mạc giảm dần từ ngày thứ 5, mức độ ít và vừa. Khác biệt khá rõ so với B và C. Tới ngày thứ 6-7, dịch và giả mạc giảm rõ rệt. Viền mép VT xuất hiện lớp vảy mỏng màu nâu, chắc, khô xu hướng lan toả toàn bộ bề mặt theo thời gian, phía dưới là biểu mô hoá từ bờ mép. Trung tâm VT vẫn bao phủ lớp giả mạc, dịch tiết. 14/30 VT khô, vảy màu nâu phủ toàn bộ bề mặt. Viêm nề giảm. Co kéo VT nhưng nhẹ hơn B và C. | VT nhìn chung dịch xuất tiết, viêm nề có giảm nhưng vẫn nhiều hơn A). Dịch xuất tiết vẫn chủ yếu ở mức vừa và nhiều; Lớp giả mạc, dịch đông vón che phủ gần hoặc toàn bộ bề mặt. Có 9/30 VT che phủ toàn bộ lớp vảy nâu khô. Có biểu mô bờ mép. Co kéo mạnh hơn A (lồi lõm đáy VT), lõm so da lành. | VT dịch xuất tiết, mũ vẫn tăng so với trước, mức nhiều hoặc vừa; tới ngày thứ 6 có xu hướng giảm, nề vừa. Xuất hiện lớp giả mạc trắng phủ bề mặt hoặc gần toàn bộ. Có đông vón và vảy khô từ bờ mép nhưng ít hơn A và B, gặp 4/30 VT có vảy khô toàn bộ. Biểu mô hoá bờ mép. Đáy VT lồi lõm, co kéo nhiều. |
| T3 (sau 9 - 11 ngày) | Hầu hết bề mặt VT được che phủ bởi vảy khô màu vàng, chắc, dịch xuất tiết ít (chỉ gặp ở phần VT không có vảy ở trung tâm), giả mạc giảm. Phần VT hở sạch. Không viêm nề. 14/30 VT che phủ toàn bộ vảy mỏng màu nâu, VT khô. Biểu mô hoá bờ mép rõ VT co kéo biểu hiện nếp gò ghề. Diện tích thu hẹp đáng kể, biểu mô hoá bờ mép. | VT sạch giả mạc so với trước, bề mặt cũng tạo một lớp vảy khô mỏng che phủ một phần tổn thương. 12/30 VT che phủ toàn bộ bởi vảy nâu mỏng). Dịch xuất tiết giảm, chủ yếu mức độ vừa và ít nhưng vẫn nhiều hơn A. Thu hẹp diện tích đáng kể, nền tổn thương lõm so với da lành. Biểu mô hoá bờ mép rõ. | VT dịch xuất tiết, giả mạc giảm, chủ yếu mức vừa (nhiều hơn so với A và B), nền đỏ sạch, bằng phẳng hơn. Có VT xuất hiện vảy mỏng màu vàng nhạt lẫn giả mạc phủ bề mặt một phần hoặc toàn bộ VT (6/30 VT có vảy mỏng phủ toàn bộ khô). Biểu mô bờ mép rõ. Diện tích thu hẹp đáng kể. |

| Thời điểm | Vết thương nhóm A (n = 30) | Vết thương nhóm B (n = 30) | Vết thương nhóm C (n = 30) |
|---------------------|---|---|--|
| T4 (sau 14-16 ngày) | VT tiếp tục thu hẹp đáng kể diện tích hoặc gặp tổn thương khởi cơ bản (11/30 VT). VT tạo màng màu nâu khô, mỏng che phủ toàn bộ (8/19 VT) hoặc gần toàn bộ bề mặt, trung tâm còn giả mạc. Dịch tiết chủ yếu ở mức độ ít hoặc VT khô. Không viêm nề. | VT thu hẹp diện tích đáng kể hoặc khởi toàn bộ (n=1). Có 04/29 VT tạo màng khô mỏng hơn A che phủ toàn bộ; còn lại VT ở trung tâm với giả mạc trắng, dịch ít (nhiều hơn A). | VT tương tự vùng B; diện tích thu hẹp gần hoàn toàn, tạo màng mỏng rõ; Không có VT tạo màng che phủ toàn bộ. Dịch xuất tiết ít hoặc VT khô chủ yếu, không viêm nề. |
| T5 (sau 19-20 ngày) | Chủ yếu gặp VT khởi cơ bản; còn lại VT diện tích hẹp ở trung tâm, Khô, có vảy mỏng. Không khác biệt rõ so với B và C. Sau 21 ngày: VT khởi cơ bản. | Chủ yếu gặp VT khởi cơ bản; còn lại VT diện tích hẹp ở trung tâm, Khô, có vảy mỏng. Sau 21 ngày: khởi cơ bản. | Chủ yếu gặp VT khởi cơ bản; còn lại VT diện tích hẹp ở trung tâm, Khô, có vảy mỏng. Sau 21 ngày: VT khởi cơ bản. |
| Nền VT khi khởi | Trắng hồng, sau đó mọc lông, mềm mại, di động | Trắng hồng, sau đó mọc lông, mềm mại, di động | Trắng hồng, sau đó mọc lông, mềm mại, di động |

Tại thời điểm T1 (sau 3 ngày), số vết thương xuất hiện vảy mỏng nâu nhạt từ bờ mép nhóm A nhiều hơn rõ rệt nhóm B và C, $p < 0,05$.

Tại T2 và T3, số VT được che phủ toàn bộ vảy này ở nhóm A lớn hơn ở nhóm B và C rõ rệt, $p < 0,05$.

Số VT khởi tại thời điểm sau 16 ngày nhóm A > nhóm B > nhóm C, $p < 0,01$.

Bảng 3.3. Diễn biến tình trạng dịch xuất tiết tại vết thương

| Nhóm | Ngày nghiên cứu | | | | | | | | | |
|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | N1 | N2 | N3 | N4 | N5 | N6 | N7 | N8 | N9 | N11 |
| A | 2,08 ± 0,45 | 1,96 ± 0,61 | 1,81 ± 0,75 | 1,68 ± 0,83 | 1,72 ± 0,84 | 1,65 ± 0,74 | 1,14 ± 0,89 | 1,22 ± 0,83 | 1,09 ± 0,75 | 0,9 ± 0,76 |
| B | 2,4 ± 0,5 | 2,75 ± 0,44 | 2,4 ± 0,59 | 2,2 ± 0,76 | 1,95 ± 0,99 | 1,7 ± 0,97 | 1,55 ± 1,09 | 1,55 ± 0,85 | 1,55 ± 0,92 | 0,9 ± 0,64 |
| C | 2,54 ± 0,5 | 2,63 ± 0,8 | 2,53 ± 0,77 | 2,3 ± 1,1 | 2,27 ± 1,19 | 2,45 ± 0,52 | 1,63 ± 0,84 | 1,18 ± 0,75 | 1,22 ± 0,44 | 0,81 ± 0,4 |
| p | $p_{A-B} < 0,05$, $p_{A-C} < 0,05$, $p_{B-C} > 0,05$ | $p_{A-B} < 0,05$, $p_{A-C} < 0,05$, $p_{B-C} > 0,05$ | $p_{A-B} < 0,05$, $p_{A-C} < 0,05$, $p_{B-C} > 0,05$ | $p_{A-B} < 0,05$, $p_{A-C} < 0,05$, $p_{B-C} > 0,05$ | $p_{A-B} > 0,05$, $p_{A-C} < 0,05$, $p_{B-C} > 0,05$ | $p_{A-B} > 0,05$, $p_{A-C} < 0,05$, $p_{B-C} < 0,05$ | $p_{A-B} < 0,05$, $p_{A-C} < 0,05$, $p_{B-C} > 0,05$ | $p_{A-B} < 0,05$, $p_{A-C} > 0,05$, $p_{B-C} < 0,05$ | $p_{A-B} < 0,05$, $p_{A-C} > 0,05$, $p_{B-C} < 0,05$ | $p_{A-B} < 0,05$, $p_{A-C} < 0,05$, $p_{B-C} > 0,05$ |

Bảng 3.4. Thay đổi diện tích vết thương của thỏ nghiên cứu

| Thời điểm | Diện tích vết thương (cm ²) | | | P |
|----------------|---|------------------|------------------|---|
| | VTA (n = 30) | VT B (n = 30) | VT C (n = 30) | |
| Trước NC (1) | 10,41 ± 1,52 | 10,18 ± 1,86 | 10,96 ± 2,05 | > 0,05 |
| Sau 1 tuần (2) | 6,72 ± 1,47 | 6,97 ± 1,27 | 6,14 ± 1,21 | P _{A-B} , P _{A-C} > 0,05; P _{B-C} < 0,05 |
| Sau 2 tuần (3) | 0,88 ± 0,66 | 0,9 ± 1,46 | 1,75 ± 1,14 | P _{A-B} > 0,05; P _{A-C} , P _{B-C} < 0,05 |
| p | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | |

Bảng 3.5. Tỷ lệ tái biểu mô

| Thời điểm | Tỷ lệ tái biểu mô | | | P |
|----------------|-------------------|------------------|------------------|---|
| | VTA (n = 30) | VT B (n = 30) | VT C (n = 30) | |
| Trước NC (1) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sau 1 tuần (2) | 0,35 ± 0,12 | 0,30 ± 0,14 | 0,43 ± 0,12 | > 0,05 |
| Sau 2 tuần (3) | 0,91 ± 0,07 | 0,91 ± 0,15 | 0,83 ± 0,11 | P _{A-B} > 0,05; P _{A-C} , P _{B-C} > 0,05 |
| p | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | |

Bảng 3.6. Tốc độ thu hẹp vết thương

| Thời điểm | Tốc độ thu hẹp vết thương (cm ² /ngày) | | | p |
|-----------|---|--------------------|--------------------|---|
| | Nhóm A (n = 34) | Nhóm B (n = 20) | Nhóm C (n = 22) | |
| T1-T2 | 0,69 ± 0,28 | 0,53 ± 0,20 | 0,46 ± 0,31 | P _{A-B} > 0,05; P _{A-C} , P _{B-C} > 0,05 |
| T2-T3 | 0,87 ± 0,23 | 0,69 ± 0,22 | 0,75 ± 0,27 | P _{A-B} < 0,05; P _{A-C} , P _{B-C} > 0,05 |
| p | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | |

Bảng 3.6. Thời gian liền vết thương

| Chỉ số | VT nhóm A (n = 30) | VT nhóm B (n = 30) | VT nhóm C (n = 30) | p |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| Số VT khỏi sau 15- 16 ngày | 12 | 4 | 6 | p _{A-B} , p _{A-C} < 0,05; p _{B-C} > 0,05 |
| Số VT khỏi sau 18- 20 ngày | 19 | 9 | 9 | p _{A-B} , p _{A-C} < 0,05, p _{B-C} > 0,05 |
| Số VT khỏi sau trên 20 ngày | 1 | 7 | 7 | p _{A-B} , p _{A-C} < 0,05, p _{B-C} > 0,05 |
| Thời gian VT khỏi hoàn toàn (ngày) | 17,65 ± 2,13 | 19,1 ± 2,51 | 19,18 ± 2,5 | p _{A-B} , p _{A-C} < 0,05, p _{B-C} > 0,05 |

Ảnh minh họa nhóm vết thương được điều trị bằng gel nano Berberin



Ảnh 3.1. Vết thương được tạo ra 2 bên cột sống trước khi đắp thuốc



Ảnh 3.2. Vết thương sau 1 ngày đắp thuốc, bề mặt phủ lớp giả mạc mỏng, dịch xuất tiết vừa



Ảnh 3.3. Vết thương sau 6 ngày đắp nano berberin. Bề mặt được che phủ toàn bộ bởi màng mỏng màu vàng, VT khô, không viêm nề



Ảnh 3.4. Vết thương sau 8 ngày. Vảy phủ bề mặt dày hơn, bờ mép bắt đầu bong, phía dưới biểu mô hoá từ viền mép. Dịch xuất tiết ít



Ảnh 3.5. Vết thương sau 15 ngày, thu hẹp diện tích đáng kể, vảy mỏng khô che phủ toàn bộ; bờ mép biểu mô hoá khô, hiện tượng mọc lông



Ảnh 3.6. Tổn thương sau 18 ngày, vết thương biểu mô hoá cơ bản (coi khô)

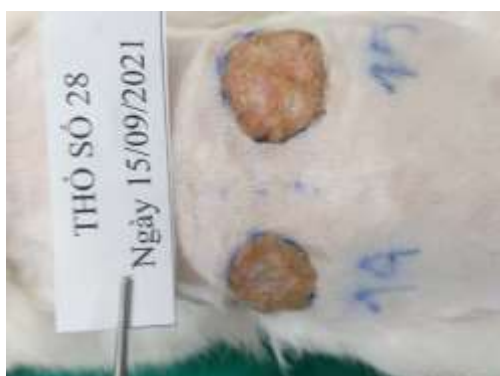
Ảnh minh họa nhóm thỏ được điều trị bằng SSD



Ảnh 3.7. Vết thương trước khi đắp thuốc nghiên cứu



Ảnh 3.8. Vết thương sau 1 ngày, dịch xuất tiết nhiều, bề mặt bao phủ lớp giả mạc trắng



Ảnh 3.9. Vết thương sau 7 ngày, dịch tiết giảm, mức độ ít, bề mặt che phủ gần toàn bộ bởi một lớp vảy dịch huyết tương đông đặc



Ảnh 3.10. Tổn thương sau 21 ngày, khỏi cơ bản

Ảnh minh họa nhóm thỏ được điều trị bằng nước muối sinh lý



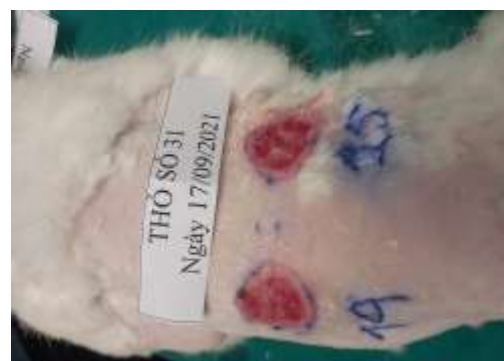
Ảnh 3.11. Tổn thương trước khi được đắp nước muối sinh lý



Ảnh 3.12. Vết thương sau 1 ngày, dịch tiết nhiều, giả mạc nhiều phủ toàn bộ VT, co kéo lõm



Ảnh 3.13. Vết thương sau 5 ngày, tiến triển chậm, dịch tiết và giả mạc nhiều, viền mép có biểu mô hoá, co kéo VT.



Ảnh 3.14. Vết thương sau 10 ngày, dịch tiết vừa, còn giả mạc, biểu mô hoá bờ mép rõ, diện tích thu hẹp.



Ảnh 3.15. Vết thương sau 16 ngày. Diện tích VT thu hẹp đáng kể, VT khô, không nề



Ảnh 3.16. Vết thương sau 21 ngày, khởi cơ bản

4. BÀN LUẬN

Mô hình gây tổn thương da trên thỏ thực nghiệm được áp dụng theo hướng dẫn của OECD. Thực chất tạo một tổn thương mất da rộng, nhằm đánh giá khả năng điều trị của một chế phẩm thuốc, thông qua theo dõi diễn biến lâm sàng, khả năng biểu mô hóa và khả năng co kéo vết thương.

4.1. Tính an toàn của thuốc

Qua theo dõi toàn thân và tại chỗ của thỏ, nhận thấy thuốc gel nano berberin tương đối an toàn, biểu hiện:

Thuốc bôi tại chỗ VT dung nạp tốt. Không có hiện tượng tấy đỏ, sưng nề, mẫn ngứa. Thỏ vẫn ăn uống, sinh hoạt bình thường.

Những dấu hiệu như thỏ ăn kém, giảm trọng lượng, đi lại giảm gập trong 1-2 ngày đầu, liên quan trực tiếp tới VT hở, quá trình bảo vệ và LVT mới khởi động. VT rộng và sâu (tương đương bỏng độ IV) gây đau đớn, mất dịch và huyết tương, viêm nhiễm phát triển. Những ngày sau, thỏ ăn uống, vệ sinh, đi lại bình thường. Đáp thuốc kéo dài tới trên 20 ngày nhưng đều không xuất hiện biểu hiện dị ứng.

Kết quả nghiên cứu trên vết thương cũng phù hợp với nghiên cứu về khả năng gây kích ứng da trên động vật thực nghiệm: Thuốc có khả năng dung nạp tốt trên da lành thỏ (điểm trung bình kích ứng da bằng 0). Uống thuốc dài ngày cũng không gây ảnh hưởng đến trọng lượng thỏ,

tới hoạt động của tim (trên điện tim), tới chức phận gan, thận và tạo máu (trên xét nghiệm sinh hóa, huyết học).

4.2. Tác dụng chống viêm nhiễm

Tác dụng chống viêm của gel nano Berberin biểu hiện VT giảm viêm nề, giảm dịch tiết rõ rệt hơn hẳn so với nhóm VT được điều trị bằng cream SSD 1% và nước muối sinh lý 0,9%. Ở các thời điểm sau 1 ngày tới sau 4 ngày, mức độ dịch tiết nhóm A ít hơn hẳn so với nhóm B, $p < 0,05$. Đối với nhóm C, sự khác biệt kéo dài tới tận 7 ngày, $p < 0,05$.

Tác dụng chống viêm của hoạt chất Berberin được nhiều nghiên cứu ghi nhận. Nhỏ dung dịch 0,5% Berberin vào mắt thỏ, cách 1/2 giờ nhỏ một lần, làm giảm viêm sung huyết giác mạc gây nên bởi dung dịch Nitrat Bạc 0,05% [10].

Berberin ức chế activator protein 1 (AP1), chất đóng vai trò then chốt trong quá trình viêm. Berberin ức chế chuyển dạng tế bào lympho ngoại vi, ức chế sinh tổng hợp DNA ở tế bào lympho hoạt hóa [11].

Trong nghiên cứu in vitro, Berberin ức chế ngưng tập và kết dính tiểu cầu bởi ADP, arachidonic acid và collagen [12]. Berberin ức chế tiết arachidonic acid từ phospholipid của màng tế bào, sử dụng hiệu quả các chất chuyển hóa của acid này. Berberin ức chế collagen-, ADP- và arachidonic acid (AA) - gồm cả thromboxane A_2 tiết ra từ tiểu cầu và ngược lại, tăng tạo 6- keto-prostaglandin F_1 alpha ở tiểu cầu [12 - 14].

Nghiên cứu in vitro và in vivo trên chuột Wistar cho thấy Berberin ức chế tạo cyclooxygenase-2 (COX-2), do vậy làm giảm prostaglandin E_2 (PGE_2), chất đóng vai trò quan trọng trong quá trình viêm [14].

Berberine có hoạt tính chống viêm in vitro và in vivo và ức chế sự phiên mã của các gen như IL-1, TNF- và IL-6, làm giảm mức độ của các protein gây viêm [15]. Berberine cũng ức chế sự gia tăng của NO và TNF- α [16, 17].

4.3. Tác dụng chống nhiễm khuẩn

Nhiễm khuẩn là biến chứng hay gặp ở VT hở, có ảnh hưởng xấu tới LVT. Trong nghiên cứu, chúng tôi không gặp VT bị nhiễm khuẩn mũ xanh. Ở nhóm nghiên cứu, dịch tiết VT, giả mạc trong tuần đầu có sự khác biệt rõ rệt với hai nhóm còn lại. Dịch xuất tiết cũng là biểu hiện của quá trình nhiễm khuẩn, như vậy có thể nói nano Berberin có tác dụng hạn chế nhiễm khuẩn.

Một tác dụng góp phần hạn chế nhiễm khuẩn VT ở động vật là sự hình thành tự nhiên vảy kết (màng) do sự đông vón dịch huyết tương của VT. Ở nhóm A, chúng tôi nhận thấy sự tạo màng mỏng tại bề mặt, bắt đầu từ bờ mép (kết hợp với biểu mô hoá) lan dần ra bề mặt VT nhanh hơn hai nhóm. Ở thời điểm sau 5 ngày, nhóm A có số VT được che phủ toàn bộ bởi màng mỏng này cao hơn hẳn so với nhóm B và C (rất ít gặp VT có che phủ toàn bộ). Tới thời điểm sau 10 ngày kết quả cũng tương tự. Việc tạo màng mỏng che phủ góp phần ngăn cản xâm nhập vi khuẩn, giảm dịch tiết, tạo thuận lợi cho LVT.

Các nghiên cứu ghi nhận berberin có tác dụng chống nhiễm khuẩn. Berberin có tác dụng với nấm (như *Candida utilis*, *C. albicans*), ký sinh trùng (*Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*), Vi khuẩn gram dương (như *S. aureus*, phế cầu, liên cầu); gram âm (VK đường ruột như *Salmonella typhi*, *Shigella shigae*, *Sh. flexneri*) và virus (kể cả với HIV) [18]. Theo Amin, Berberin

có tác dụng với 54 loài VK, đặc biệt với *E. coli*, *Vibrio cholerae* 1, *Klebsiella pneumoniae* [19]. Một số nghiên cứu cho thấy Berberin còn tác dụng với tụ cầu vàng kháng methicillin [20-22].

* *Cơ chế tác dụng*: Berberin ức chế chuyển hóa của vi khuẩn, ức chế tạo toxin; là chất đối kháng trực tiếp với độc tố của *V. cholerae* và *E. coli*, phong bế muscarinic receptors, ức chế đáp ứng co với acetylcholine. Berberin cũng phong tỏa sự kết dính của *Strep. pyogenes*, *E. coli* vào hồng cầu và tế bào nội mô [18, 23,24].

Nghiên cứu in vitro về khả năng ức chế của Berberin với *S.aureus* kháng Methicillin (methicillin resistant *S. aureus*- MRSA) thấy nồng độ ức chế tối thiểu với MRSA là 32 - 128 µg/mL. Berberine làm giảm đáng kể liều MIC của Ampicillin và Oxacillin với MRSA, phục hồi tác dụng của các kháng sinh β-lactam. Berberin làm giảm đáng kể khả năng dính kết và xâm lấn vào nội bào của MRSA [20,21]. Berberin do có cấu trúc 5'-methoxyhydrocarpin (5'-MHC) ức chế bơm đa kháng (Multidrug resistance pumps - MDRs- bảo vệ vi khuẩn khỏi tác dụng của kháng sinh [20].

4.4. Tác dụng tới quá trình liền vết thương

Liền vết thương ở thỏ trong nghiên cứu dựa vào 2 quá trình co kéo và biểu mô hoá từ bờ mép.

Sau 3 ngày, số VT nhóm A xuất hiện biểu mô hoá từ bờ mép VT cao hơn nhóm B và nhóm C. Sau 5 ngày, VT ở cả 3 nhóm thỏ đều có sự co kéo nhẹ, xuất hiện biểu mô hoá từ bờ mép. Tuy nhiên, theo thời gian, quá trình biểu mô hoá nhóm A xảy ra nhanh hơn. Biểu hiện vùng A có thời gian khỏi trung bình, số VT khỏi ở các thời điểm

sau 15 ngày, sau 20 ngày nhóm A đều cao hơn nhóm B và C.

Sự thu hẹp diện tích VT theo thời gian, tốc độ biểu mô hoá giữa ba vùng cũng phản ánh sự thúc đẩy LVT của gel nano Berberin: Sau 1 tuần không có sự khác biệt về tỷ lệ tái biểu mô và tốc độ biểu mô hoá giữa ba nhóm. Tuy nhiên, sau 2 tuần đã có sự khác biệt về chỉ số này. Tỷ lệ tái biểu mô của nhóm A cao hơn nhóm 2, tốc độ thu hẹp vết thương nhóm 1 cũng cao hơn nhóm 2.

Nghiên cứu của Rui Zhou (2021) ghi nhận điều trị bằng Berberin trên VT ở chuột gây ra tiểu đường do streptozotocin đã làm tăng tốc độ LVT, tăng cường tổng hợp chất nền ngoại bào (ECM) và ức chế đáng kể tổn thương tế bào. Berberin kích hoạt TrxR1, ức chế tín hiệu JNK, do đó ức chế stress oxy hóa và quá trình chết của tế bào, thúc đẩy tăng sinh tế bào, điều hoà làm giảm MMP 9, làm tăng chuyển dạng của TGF-β1 và các chất ức chế mô của MMP 1 (TIMP1), giúp đẩy nhanh LVT [25]. Dibya Sundar Panda ghi nhận gel nano berberin (hệ thống phân tử nano dựa trên lecithin-chitosan chứa berberine) điều trị VT ở chuột mắc bệnh tiểu đường do streptozocin có tác dụng giảm viêm, tăng tạo mạch máu, tăng sinh nguyên bào sợi, thúc đẩy sự lắng đọng collagen trưởng thành [26].

A Asif 2007 nghiên cứu tác dụng điều trị của dịch chiết xuất trong nước và methanol của rễ cây hoàng liên gai (*Berberis lyceum*) đối với VT chuột ghi nhận cả hai chất chiết xuất có tác dụng kích thích LVT, biểu hiện diện tích biểu mô hóa tăng, gia tăng độ co và độ bền da, tăng tạo mô hạt và hàm lượng hydroxyproline, tăng tạo collagen [27].

Mansoureh Pashaei nghiên cứu tác dụng điều trị của dịch của Hoàng liên gai (*B. Vulgaris*) tại VT da (vết cắt dài 3cm trên da vùng thắt lưng) của chuột mắc bệnh tiểu đường. Kết quả cho thấy chiết xuất *B. vulgaris* có thể cải thiện LVT cùng với việc giảm chiều dài tổn thương và kháng khuẩn ở chuột sau 21 ngày [28].

Qian-Li Tang [29] đã đánh giá tác dụng của mỡ MEBO (thành phần chủ yếu chứa Berberin) trên 60 chuột Sprague-Dawley (8 tuần tuổi; cân nặng 220 - 250g), tạo VT mất da đường kính 2,4cm ở lưng chuột; 2 VT/chuột. Chuột được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm: chuẩn (n = 20), MEBO (n = 20) và rb-bFGF (n = 20). Các vết thương sau đắp thuốc được băng kín. Thay băng hàng ngày. điều trị bằng MEBO trong 8 ngày đã thúc đẩy đáng kể sự tạo mô hạt khi so sánh với nhóm mẫu. Thời gian LVT nhóm MEBO ngắn hơn so với nhóm chứng và nhóm chuẩn (p < 0,01). MEBO làm tăng quá trình tân mạch và số lượng nguyên bào sợi, tăng cường biểu hiện gen của VEGF và bFGF.

5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu tác dụng điều trị của gel nano Berberin tại vết thương phần mềm thực nghiệm (so sánh với SSD) trên thỏ chúng tôi nhận thấy:

1/ Thuốc có tính an toàn, không thấy biểu hiện dị ứng hoặc kích ứng tại chỗ và toàn thân

2/ Thuốc có tác dụng giảm viêm

3/ Thuốc có tác dụng kích thích liền vết thương, biểu hiện số VT khỏi của nhóm nghiên cứu sau 2 tuần và 3 tuần đều cao hơn với nhóm chứng và so sánh; tỷ lệ tái biểu mô và tốc độ biểu mô hoá sau 2 tuần ở nhóm nghiên cứu cũng cao hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Koschwanez HE, Broadbent E. The use of wound healing assessment methods in psychological studies: A review and recommendations. *Br J Health Psychol.* 2011; 16: 1-32.
2. Stephens P, Caley M, Peake M. Alternatives for animal wound model systems. In: RG Gourdie, TA Myers, eds. *Wound Regeneration and Repair Methods and Protocols.* New York, NY: Humana Press; 2013: 177-201.
3. Stojadinovic O, Tomic-Canic M. Human ex vivo wound healing model. In: RG Gourdie, TA Myers, eds. *Wound Regeneration and Repair Methods and Protocols.* New York, NY: Humana Press; 2013: 255-264.
4. Daniela S. Masson-Meyers, Thiago AM Andrade, Guilherme F Caetano, Francielle R Guimaraes, Marcel N Leite, Saulo N Leite, Marco Andrey C Frade, Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *Int J Exp Pathol*, 2020. 101(1-2): p. 21-37
5. Gottrup F, Agren MS, Karlsmark T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair Regen.* 2000; 8: 83- 96
6. Nguyễn Ngọc Tuấn, Nghiên cứu quy trình sản xuất dung dịch berberin và kem berberin, đánh giá tác dụng điều trị của chế phẩm tại vết thương bỏng, đề tài nghiên cứu cấp Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội, 2011
7. OECD guideline for the testing of chemicals, 402, 2017
8. Wang XQ, Liu PY, Kempf M, Cuttle L, Mill J, Kimble RM. Burn wound infection in a porcine burn model. *J Burn Care Res* 2009;30 (2):369-70.
9. Kemal Arslan, Omer Karahan, Ahmet Okuş, Yaşar Unlü, Mehmet Ali Eryilmaz, Serden ay, Barış Sevinç; Comparison of topical zinc oxide and silver sulfadiazine in burn wounds: an experimental study; *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*, 2012;18 (5):376-383
10. Li N, G.L., Linlin Q et al., Berberine attenuates pro-inflammatory cytokine-induced tight junction disruption in an in vitro model of intestinal epithelial cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010. 40(1): p. 1-8.
11. Kuo CL, C.C., Liu TY; The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer*, 2004. 20(203(2): p. 127-37

12. Wu J.F., L.T.P., Effects of berberine on platelet aggregation and plasma levels of TXB2 and 6-keto-PGF1 alpha in rats with reversible middle cerebral artery occlusion. Yao Hsueh Hsueh Pao, 1995. **30**: p. 98-102
13. Ang E.S.W., L.S.T., Gan CSG, Evaluating the role of alternative therapy in burn wound management: randomized trial comparing moist exposed burn ointment with conventional method in the management of patients with second degree burns, Medscape general medicine, 2001. **3**(12): p. 3-18.
14. Huang CG, C.Z.L., Yang ZM, Effects of berberine on synthesis of platelet TXA2 and plasma PGI2 in rabbits. Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao, 1991. **12**: p. 526-528
15. Sabir M, A.M., Bhide NK; Further studies on pharmacology of berberine. Indian J Physiol Pharmacol; 1978. **22**: p. 9-23
16. Jeong HW, H.K.C., Lee JW et al., Berberine suppresses pro-inflammatory responses through AMPK activation in macrophages, Am J Physiol Endocrinol Metab; 2009. **296**: p. e955-e964
17. Hu X, Z.Y., Xue Y, Zhang Z, Wang J, Berberine is a potential therapeutic agent for metabolic syndrome via brown adipose tissue activation and metabolism regulation. Am. J. Transl. Res., 2018. **10**: p. 3322-3329
18. Timothy C, B.N.D., Gregory ND, Berberine: Therapeutic potential of an Alkaloid found in several medicinal plant,. Alt Med Rev, 1997. **2**(2): p. 94-103
19. Amin AH, S.T.V., Abbasi KM; Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action, Can J Microbiol, 1969. **15**: p. 1067-1076.
20. Stermitz FR, L.P., Tawara JN et al., Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnoicarpin, a multidrug pump inhibitor, Proc Natl Acad Sci USA, 2000. **97**(4): p. 1433-1437.
21. Yu HH, K.K.J., Cha JD et al., Antimicrobial Activity of Berberine Alone and in Combination with Ampicillin or Oxacillin Against Methicillin-Resistant *S. aureus*, Journal of Medicinal Food., 2005. **8**(4): p. 454-461.
22. Košťálová; M.Č.D., Antimicrobial activity of berberine - a constituent of Mahonia aquifolium; Folia Microbiologica; 2002. **47**(4): p. 375-378
23. Gilbs PJ, SKR, Berberine. Alternative Medicine Review, 2000. **5**(2): p. 175.
24. Sabir M, A.M., Bhide NK; Further studies on pharmacology of berberine. Indian J Physiol Pharmacol; 1978. **22**: p. 9-23
25. Rui Zhou, Changpei Xiang, Guangzhao Cao, He Xu, Yi Zhang, Hongjun Yang, Jingjing Zhang; Berberine accelerated wound healing by restoring TrxR1/JNK in diabetes; Clin Sci (Lond). 2021 Feb 12;135(4):613-627.
26. Dibya Sundar Panda, Hussein M Eid, Mohammed H Elkomy, Ahmed Khames, Randa M Hassan, Fatma I Abo El-Ela, Heba A Yassin; Berberine Encapsulated Lecithin-Chitosan Nanoparticles as Innovative Wound Healing Agent in Type II Diabetes; Pharmaceutics. 2021 Aug 4;13(8):1197.
27. A Asif, G Kakub, Sajid Mehmood, Rizwana Khanum; Wound healing activity of root extracts of Berberis lyceum Royle in rats; Phytotherapy Research 21(6):589-91 June 2007; DOI:10.1002/ptr.2110
28. Mansoureh Pashae, Abdolhossein Shiravi; Vida Hojati; The Effect of Hydroalcoholic Extract of Berberis vulgaris on Wound Healing of Diabetic Wistar Rats; Journal of chemical health risks; Volume 6, Issue 4 - Serial Number 4; 42; September 2016; DOI: 10.22034/JCHR.2016.544159
29. Qian-Li Tang; Shan-Shan Han; Jing Feng; Jia-Qi Di; Wen-Xi Qin; Jun Fu; Qiu-Yan Jiang, Moist exposed burn ointment promotes cutaneous excisional wound healing in rats involving VEGF and bFGF, Molecular Medicine Reports; April 2014; Volume 9 Issue 4, Pages: 1277-1282.