

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG DUNG NẠP TRÊN DA LÀNH VÀ ẢNH HƯỞNG CỦA GEL NANO CELLULOSE KHI DÙNG LÂU DÀI TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM

Nguyễn Ngọc Tuấn, Lâm Thị Đan Chi, Nguyễn Văn Thịnh
Bệnh viện Bông Quốc gia Lê Hữu Trác

TÓM TẮT

Vật liệu nanocellulose từ nuôi cấy vi khuẩn có tác dụng che phủ tạm thời vết thương. Nhưng hươu chứa nhiều yếu tố tăng trưởng cần thiết cho quá trình liền vết thương như EGF, TGF, IGF... Vật liệu Gel Nanocellulose kết hợp chiết xuất nhung hươu (BC-A) do Trung tâm nghiên cứu triển khai khu công nghệ cao thành phố Hồ Chí Minh phối hợp với công ty TNHH Geneworld sản xuất, đạt tiêu chuẩn cơ sở. Để có cơ sở tiến hành trên lâm sàng, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm mục tiêu khả năng dung nạp trên da lành và ảnh hưởng của chế phẩm khi dùng lâu dài trên thỏ, thực hiện theo quy định của Bộ Y tế Việt Nam, WHO và OECD.

Nghiên cứu khả năng dung nạp trên da lành cho thấy chế phẩm không gây kích ứng, điểm kích ứng bằng 0. Chế phẩm khi dùng liều 5g trên diện tích da thỏ rộng 30cm² liên tục trong 30 ngày không gây rối loạn toàn thân, Không có sự thay đổi đáng kể ($p > 0,05$) về trọng lượng cơ thể, các chỉ số xét nghiệm huyết học và sinh hóa, điện tim, không quan sát thấy các tổn thương mô bệnh học tại gan, lách, thận.

Từ khóa: Nanocellulose, nhung hươu, khả năng dung nạp, ảnh hưởng lâu dài.

ABSTRACT

Nanocellulose material gained from bacteria culture has the effect of temporary wounds cover. Deer velvet contains many growth factors that are crucial for wound healing process such as EGF, TGF and IGF. The Nanocellulose material combining with extraction of deer velvet (BC-A Gel) produced by the Center for High-tech Research and Development Ho Chi Minh City and Geneworld Co., Ltd meets basic standards. In order to provide the bases before clinical application, we conducted the research to assess tolerance of the product in healthy rabbit skin and its effect on long-term use in rabbits complying with the regulations of Vietnam Ministry of Health, WHO and OECD.

Results show that the product application on healthy skin does not cause irritation in which the irritation point is equal to zero. Application dose of 5g on area of 30cm² rabbit skin in 30 consecutive days does not cause any systemic whole body disorder. There are not significant change ($p > 0.05$) in body weight, hematological and biochemical testing indicators, ECG. There are not observed histopathological lesions in liver, spleen, kidney as well.

Keywords: Nanocellulose; deer velvet; tolerance, chronic toxicity

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng vật liệu che phủ tạm thời vết thương, vết bỏng tạo điều kiện thuận lợi cho liền vết thương do tác dụng giảm đau, tạo môi trường ẩm, tránh vi khuẩn xâm nhập, tránh mất nước, điện giải, huyết tương, rút ngắn thời gian điều trị... Màng sinh học Bacterial cellulose (BC) từ nuôi cấy vi khuẩn (trong đó từ vi khuẩn *Gluconacetobacter intermedius*) là một hướng nghiên cứu mới hiện nay do những ưu thế của loại vật liệu này. Màng có cấu trúc giống cellulose của thực vật nhưng có độ bền cơ học, có khả năng đàn hồi lớn, khả năng thấm hút nước, khả năng thông thoáng, polymer hóa lớn, đường kính sợi nhỏ, độ tinh khiết cao [1].

Việc nuôi cấy, lên men vi khuẩn để tạo màng không quá cầu kỳ, tốn kém, đòi hỏi trang thiết bị đắt tiền như công nghệ nuôi cấy tế bào sừng, tế bào sợi hoặc vật liệu nano [2, 3]. Do vậy, BC đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như công nghệ thực phẩm, công nghiệp gỗ, giấy... Trong y học, màng BC đã được sử dụng như vật liệu sinh học che phủ vết thương nhờ khả năng bền trong môi trường ẩm, thấm hút dịch, không gây kích ứng da [4].

Ở Việt Nam, nghiên cứu tạo màng cellulose từ vi khuẩn đã được ứng dụng trong một số ngành khoa học, tuy nhiên mới có hai trung tâm nghiên cứu chế tạo màng BC từ vi khuẩn *Acetobacter* để ứng dụng trong điều trị bỏng là Đại học Y dược thành phố Hồ Chí Minh và Đại học Sư phạm Hà Nội. Sản phẩm của Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh (dưới tên gọi Acetul, có sự phối hợp với tinh dầu tràm và dầu mù u) bước đầu được ứng dụng trên bệnh nhân bỏng. Đại học Sư phạm Hà Nội đã nghiên cứu tạo màng BC từ chủng *Gluconacetobacter BHN2_21* phối hợp với dung dịch Berberin điều trị tại chỗ vết thương bỏng cho thấy có tác dụng che phủ [5, 6].

Vật liệu dạng nano được sử dụng trong y học với mục đích chính là nâng cao sinh khả dụng, kéo dài tác dụng và đưa thuốc tới đích. Sử dụng thuốc có hoạt chất dạng kích thước nano là xu thế hiện đại, được nghiên cứu nhiều trong bào chế các dạng thuốc nhờ những ưu điểm như: Độ ổn định vật lý cao, bảo vệ các

dược chất kém bền, kiểm soát giải phóng dược chất (giải phóng nhanh hoặc duy trì), dung nạp tốt (đặc biệt thích hợp khi sử dụng cho các chế phẩm hấp thu qua da và niêm mạc), duy trì tác dụng của hoạt chất ổn định và kéo dài [7].

Nhưng hươu (lộc nhung) là sừng non lấy ở con đực của các loài hươu được sử dụng trong y học cổ truyền như vị thuốc bổ, giúp cơ thể lâu già, chống co giật, chữa ung bướu, thấp khớp. Nhưng hươu chứa nhiều yếu tố tăng trưởng cần thiết cho quá trình liền vết thương như EGF, TGF, IGF... Dịch chiết nhưng hươu có thể thu được bằng công nghệ chiết toàn phần theo cổ truyền hoặc bằng công nghệ nuôi cấy tế bào gốc.

Sản phẩm vật liệu (dạng gel) nanocellulose kết hợp với chiết xuất nhưng hươu do Trung tâm nghiên cứu triển khai khu công nghệ cao thành phố Hồ Chí Minh phối hợp với công ty TNHH Geneworld đạt tiêu chuẩn cơ sở, được nghiên cứu độc tính trên Fibroblast, đánh giá khả năng ngừa phát triển vi khuẩn, nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn [8].

Để có đầy đủ cơ sở tiến hành trên lâm sàng, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm mục tiêu đánh giá khả năng dung nạp trên da lành của động vật thực nghiệm và ảnh hưởng của chế phế khi dùng lâu dài trên động vật.

2. CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Chế phẩm nghiên cứu: Chế phẩm Gel Nano cellulose từ vi khuẩn phối hợp với chiết xuất nhưng hươu (tên gọi tắt BC-A Gel) đạt tiêu chuẩn cơ sở, do công ty TNHH Geneworld cung cấp.

2.2. Động vật thí nghiệm

Thỏ 20 con (trọng lượng từ 1,8 - 2,2 kg/con) đạt tiêu chuẩn nghiên cứu. Thỏ được nuôi dưỡng trong điều kiện phòng thí nghiệm của Học viện Quân y, ăn thức ăn theo chuẩn thức ăn 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.

2.3. Trang thiết bị

Máy xét nghiệm sinh hoá tự động Chemix 180 hãng Sysmex; máy xét nghiệm huyết học tự động XE2100, hãng Sysmex; bộ dụng cụ mổ động vật cỡ nhỏ; kính hiển vi kết nối máy ảnh của hãng Leica.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp nghiên cứu độ kích ứng da của chế phẩm

Tiến hành theo hướng dẫn của OECD về thử độ kích ứng da (OECD 404, 2002) [9].

- Thiết kế thí nghiệm: Trước ngày tiến hành nghiên cứu, thử được cạo sạch lông phần lưng, tránh làm tổn thương da thử, chỉ sử dụng thử khỏe mạnh, không bị tổn thương da. Thuốc được đặt trên một tấm gạc nhỏ, tiếp xúc trực tiếp với một diện tích da nhỏ (khoảng 6cm²), được giữ bằng băng dính y tế. Liều thuốc thử đặt trên mỗi tấm gạc là 0,5ml gel BC-A.

Nghiên cứu được tiến hành theo hai giai đoạn:

+ Giai đoạn 1: Test thăm dò (initial test), tiến hành trên 3 thử:

Đặt 3 tấm gạc có chứa thuốc thử trên da thử. Tấm gạc thứ nhất được gỡ ra sau 3 phút. Nếu không có phản ứng kích ứng da hoặc ăn mòn da, tấm gạc thứ 2 được đặt tại một vị trí khác và được gỡ bỏ sau 1 giờ. Nếu không có phản ứng kích ứng hoặc ăn mòn da xuất hiện, tấm gạc chứa thuốc thứ 3 được đặt tại vị trí thứ 3 và được gỡ bỏ sau 4 giờ. Sau khi gỡ gạc, rửa vị trí tiếp xúc thuốc bằng nước cất và tiếp tục theo dõi trong 14 ngày. So sánh với vị trí đối chứng (đặt gạc có 0,5ml nước muối sinh lý). Nếu có bất kỳ biểu hiện ăn mòn da của thuốc, thí nghiệm được dừng lại. Nếu không có biểu hiện kích ứng, ăn mòn da, thử được tiếp tục quan sát sau 14 ngày.

Trong trường hợp thuốc không gây ăn mòn da, nhưng gây kích ứng, tiến hành đặt gạc thuốc cho một thử khác trong 4 giờ.

+ Giai đoạn 2: Test xác nhận (Confirmatory test), tiến hành trên 6 thử khác.

Nếu các biểu hiện kích ứng, ăn mòn da không xuất hiện trong test thăm dò, tiếp tục thử thuốc với 6 thử khác, mỗi lô 3 thử đặt một gạc thuốc trong 4 giờ. Đánh giá các dấu hiệu kích ứng da và phù nề tại các thời điểm 1h; 24h; 48h; 72h sau khi gỡ tấm gạc thuốc. So sánh với vị trí đối chứng để đánh giá tính kích ứng. Thử được quan sát trong 14 ngày. Thí nghiệm được kết thúc nếu có bất cứ biểu hiện tổn thương da xuất hiện.

Chỉ tiêu nghiên cứu:

- Sự xuất hiện ban đỏ và vẩy tại vùng da tiếp xúc thuốc: Không xuất hiện ban đỏ: 0 điểm; ban đỏ rất nhẹ: 1 điểm; Ban đỏ nhìn thấy rõ: 2 điểm; Ban đỏ vừa phải tới nghiêm trọng: 3 điểm; Ban đỏ nghiêm trọng tới hình thành vẩy: 4 điểm.

- Phản ứng phù nề: Không phù nề: 0; Phù nề rất nhẹ (có thể phát hiện thấy): 1; Phù nề nhẹ (có thể thấy các viền xung quanh): 2; Phù nề vừa phải (có các viền khoảng 1mm): 3 điểm; Phù nề nghiêm trọng (trải rộng toàn bộ khu vực tiếp xúc thuốc): 4 điểm.

- Đánh giá kết quả: Tính điểm số trung bình (gồm cả điểm số xuất hiện ban đỏ và điểm số biểu hiện phản ứng phù nề) của thử tại từng thời điểm 1h; 24h; 48h; 72h sau khi gỡ tấm gạc thuốc. Sau đó tính điểm số trung bình các giá trị tại 4 thời điểm này để tính chỉ số kích ứng (Irritation index, PII).

2.4.2. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm khi dùng lâu dài

- Thiết kế nghiên cứu: Tiến hành theo hướng dẫn của OECD [10], Bộ Y tế [11], WHO [12, 13]. Thời gian dùng thuốc đánh giá như độ tính bán trường diễn gấp 4 thời gian khuyến cáo thông thường dùng trên người, ví dụ thuốc khuyến cáo dùng 1 tuần sẽ làm 4 tuần.

- Thỏ được chia thành 2 lô, mỗi lô 5 con:
 - + Lô chứng: Đặt gạc không có thuốc, 2 miếng, mỗi miếng 15cm², thay gạc hàng ngày, liên tục trong thời gian 30 ngày.
 - + Lô thử: Chế phẩm gel BC-A được trải đều trên 2 miếng gạc, mỗi miếng gạc 15cm² được trải 2,5g thuốc, thay gạc hàng ngày, trong thời gian 30 ngày.
- Các chỉ tiêu đánh giá:
 - + Lâm sàng: Theo dõi tình trạng chung, hoạt động, ăn uống, trọng lượng thỏ.
- Tính chỉ số gây kích ứng da thỏ tại thời điểm trước nghiên cứu, sau 15 - 30 ngày.
 - + Xét nghiệm huyết học: Hồng cầu, Hemoglobin, bạch cầu, tiểu cầu; sinh hóa: AST, ALT, Ure, Creatinin. Thời điểm trước nghiên cứu, sau 15 ngày, 30 ngày.
 - + Mô bệnh học: Vào ngày thứ 30, giết thỏ, quan sát hình ảnh đại thể và vi thể gan, lách, thận.

2.5. Phương pháp xử lý kết quả nghiên cứu

Xử lý các kết quả theo phương pháp thông kê sinh y học, sử dụng phần mềm Microsoft Excel, Stat view 501. Nghiên cứu tiến hành tại Trung tâm Sinh Y dược - Học viện Quân y.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

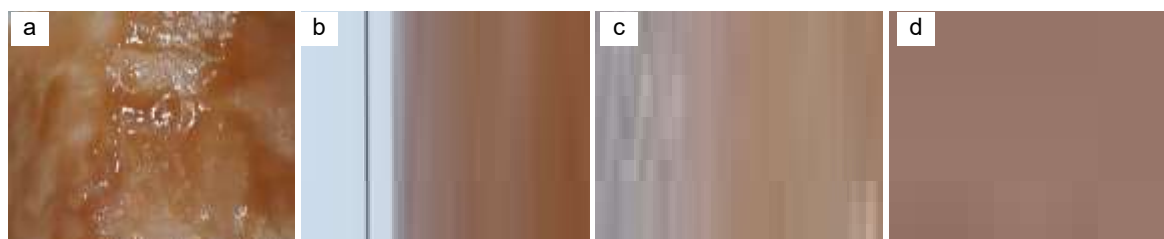
3.1. Kết quả đánh giá tác dụng gây kích ứng da

Với nhóm thỏ thử nghiệm đầu tiên, không thấy xuất hiện phù nề và ban đỏ trên vùng da tiếp xúc với thuốc tại các thời điểm sau khi gỡ tấm gạc 3', 1h, 4h, và 14 ngày.

Kết quả nghiên cứu tính kích ứng da lành trên 2 nhóm thỏ tiếp theo được trình bày trong bảng 3.1. Không có biểu hiện phù nề và ban đỏ trên tất cả các thỏ được thử nghiệm.

Bảng 3.1. Tính kích ứng da của gel BC-A trên da thỏ

Nội dung	Điểm số kích ứng			Trung bình
	Nhóm thỏ 1	Nhóm thỏ 2	Nhóm thỏ 3	
Tại 1h sau khi gỡ tấm gạc	0	0	0	0
Tại 24 sau khi gỡ tấm gạc	0	0	0	0
Tại 48 sau khi gỡ tấm gạc	0	0	0	0
Tại 72 sau khi gỡ tấm gạc	0	0	0	0
Chỉ số kích ứng (PII)				0



Hình 3.1. Da thỏ tại vị trí tiếp xúc với gạc thuốc sau 1h;

(a); 24h; (b); 48h; (c); 72h; (d); Không xuất hiện ban đỏ

- Tại các thời điểm sau khi gỡ tấm gạc thuốc 1h, 24h, 48h, 72h, thỏ khỏe mạnh, hoạt động bình thường, không có biểu hiện mẫn

ngứa, gãi vào vị trí đặt tấm gạc thuốc. Chỉ số kích ứng PII bằng 0.

3.2. Ảnh hưởng của chế phẩm khi dùng ngoài da lâu dài

3.2.1. Lâm sàng

Bảng 3.2. Thay đổi trọng lượng thỏ trong quá trình nghiên cứu

Thời điểm	Trọng lượng cơ thể trung bình (kg)		p
	Lô nghiên cứu (1)	Lô chứng (2)	
Trước nghiên cứu (a)	1,95 ± 0,14	2,01 ± 0,18	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 2 tuần (b)	2,11 ± 0,12	2,08 ± 0,15	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	2,24 ± 0,14	2,20 ± 0,16	$p_{2-1} > 0,05$
p	$p_{b-a} < 0,05; p_{c-b} < 0,05; p_{c-a} < 0,05$		

Trọng lượng thỏ ở lô nghiên cứu không khác biệt với lô chứng tại các thời điểm, $p > 0,05$. So sánh trong từng lô: Trọng lượng thỏ 2 lô tăng có ý nghĩa thống kê, $p < 0,05$.

- Tính kích ứng da lành thỏ: Theo dõi tại các thời điểm nghiên cứu: Không có biểu hiện phù nề và ban đỏ trên tất cả các thỏ được thử nghiệm.

Bảng 3.3. Tính kích ứng da của của chế phẩm trên da thỏ

Thời điểm	Điểm số kích ứng		Trung bình
	Lô nghiên cứu	Lô chứng	
Trước nghiên cứu (a)	0	0	0
Sau 2 tuần (b)	0	0	0
Sau 4 tuần (c)	0	0	0
Chỉ số kích ứng (PII)			0

Tại thời điểm 3 tuần sau khi gỡ gạc thuốc, không thấy bất kỳ phản ứng kích ứng nào trên tất cả các thỏ thử nghiệm.

- Theo dõi tình trạng toàn thân: Thỏ không có biểu hiện rối loạn trong sinh hoạt, ăn uống, ngủ nghỉ và chất thải bình thường.

3.2.2. Ảnh hưởng trên điện tim thỏ

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của chế phẩm gel BC-A trên điện tim thỏ

Chỉ tiêu	Thời điểm	Lô thỏ		p
		Nghiên cứu	Chứng	
Tần số tim trung bình (chu kỳ/phút)	Trước nghiên cứu (a)	262,81 ± 38,52	261,28 ± 52, 35	$p_{2-1} > 0,05$
	Sau 2 tuần (b)	266,12 ± 36,42	262,52 ± 49,26	$p_{2-1} > 0,05$
	Sau 4 tuần (c)	260,75 ± 38,17	259,55 ± 49,14	$p_{2-1} > 0,05$
$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$				
Phức bộ QRS (mV)	Trước nghiên cứu (a)	0,352 ± 0,062	0,356 ± 0,091	$p_{2-1} > 0,05$
	Sau 2 tuần (b)	0,355 ± 0,066	0,356 ± 0,089	$p_{2-1} > 0,05$
	Sau 4 tuần (c)	0,354 ± 0,063	0,358 ± 0,092	$p_{2-1} > 0,05$
$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$				
Sóng bất thường	Không	Không	Không	
	Không	Không	Không	
	Không	Không	Không	

So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm và giữa các lô ở cùng một thời điểm, tần số và biên độ của điện tim trở thay đổi

không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Không có sóng bất thường trên ECG của các lô thử tại các thời điểm.

3.2.3. Cận lâm sàng

Bảng 3.5. Thay đổi một số chỉ tiêu xét nghiệm huyết học thô

Chỉ tiêu nghiên cứu		Thời điểm			p
		t ₀ (a)	t ₂ (b)	t ₄ (c)	
Hồng cầu (T/L)	Lô chứng (1)	5,41 ± 0,52	5,52 ± 0,44	5,48 ± 0,39	$p_{c-a} > 0,05$
	Lô nghiên cứu (2)	5,47 ± 0,45	5,53 ± 0,54	5,44 ± 0,38	$p_{b-a} > 0,05$
	p	$p_{2-1} > 0,05$			$p_{c-b} > 0,05$
Hb (g/L)	Lô chứng (1)	115,32 ± 9,15	121,32 ± 11,46	122,08 ± 9,54	$p_{c-a} > 0,05$
	Lô nghiên cứu (2)	113,37 ± 12,15	122,66 ± 9,54	121,36 ± 9,28	$p_{b-a} > 0,05$
	p	$p_{2-1} > 0,05$			$p_{c-b} > 0,05$
Bạch cầu (G/L)	Lô chứng (1)	7,74 ± 2,27	9,26 ± 2,82	7,91 ± 2,18	$p_{c-a} > 0,05$
	Lô nghiên cứu (2)	7,79 ± 1,95	8,88 ± 2,14	8,87 ± 1,77	$p_{b-a} > 0,05$
	p	$p_{2-1} > 0,05$			$p_{c-b} > 0,05$
Tiểu cầu (G/L)	Lô chứng (1)	668,51 ± 138,52	513,66 ± 127,43	526,33 ± 172,10	$p_{c-a} > 0,05$
	Lô nghiên cứu (2)	588,55 ± 116,14	537,38 ± 179,12	566,21 ± 158,51	$p_{b-a} > 0,05$
	p	$p_{2-1} > 0,05$			$p_{c-b} > 0,05$

So sánh trong từng lô giữa các thời điểm và so sánh giữa các lô ở cùng thời điểm,

hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, Hb thay đổi không có ý nghĩa ($p > 0,05$).

Bảng 3.6. Thay đổi một số chỉ tiêu xét nghiệm sinh hóa thô

Chỉ tiêu nghiên cứu		Thời điểm			p
		t ₀ (a)	t ₂ (b)	t ₄ (c)	
AST (UI/L)	Lô chứng (1)	26,80 ± 14,78	51,84 ± 26,66	34,87 ± 27,82	$p_{c-a} > 0,05$
	Lô nghiên cứu (2)	29,34 ± 9,76	32,82 ± 19,45	33,94 ± 20,03	$p_{b-a} > 0,05$
	p	$p_{2-1} > 0,05$			$p_{c-b} > 0,05$
ALT (IU/L)	Lô chứng (1)	75,94 ± 17,49	100,82 ± 20,74	95,32 ± 18,33	$p_{c-a} > 0,05$
	Lô nghiên cứu (2)	82,26 ± 21,04	112,78 ± 41,57	83,61 ± 29,02	$p_{b-a} > 0,05$
	p	$p_{2-1} > 0,05$			$p_{c-b} > 0,05$
Creatinin (μmol/L)	Lô chứng (1)	101,75 ± 19,94	95,15 ± 25,82	86,54 ± 23,35	$p_{c-a} > 0,05$
	Lô nghiên cứu (2)	98,64 ± 19,82	78,64 ± 19,88	79,26 ± 19,93	$p_{b-a} > 0,05$
	p	$p_{2-1} > 0,05$			$p_{c-b} > 0,05$
Ure (mmol/L)	Lô chứng (1)	6,12 ± 4,26	6,51 ± 4,22	5,64 ± 3,04	$p_{c-a} > 0,05$
	Lô nghiên cứu (2)	6,17 ± 3,28	7,46 ± 2,92	5,82 ± 2,16	$p_{b-a} > 0,05$
	p	$p_{2-1} > 0,05$			$p_{c-b} > 0,05$

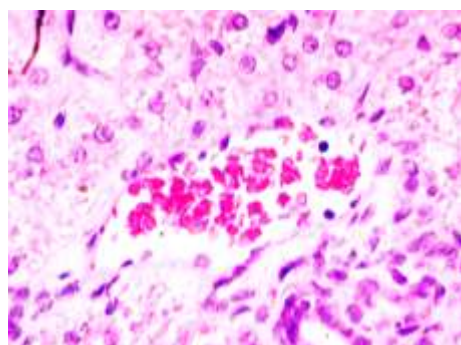
So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm và giữa các lô ở cùng một thời điểm, hoạt độ enzyme AST, ALT; hàm lượng Creatinin, Ure thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.4. Mô bệnh học gan, thận và lách của thỏ thí nghiệm

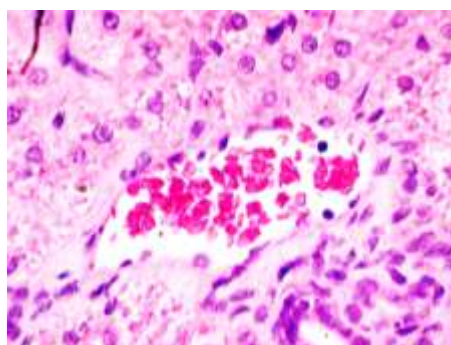
Kết thúc đợt nghiên cứu, thỏ được gây mê nhẹ bằng Ketamin, sau đó phẫu tích bóc tách các cơ quan gan, lách và thận. Quan sát và so sánh đại thể bằng mắt thường và dưới kính lúp có độ phóng đại 25 lần, kết quả biểu hiện ở các bảng 3.6, 3.7, 3.8.

Bảng 3.7. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học của gan thỏ

Chỉ tiêu đánh giá	Lô nghiên cứu	
	Lô chứng (a)	Lô thuốc (b)
Tế bào gan	Bình thường	Bình thường, bào tương thuần nhất
Cấu trúc tiểu thùy	Bình thường	Các tiểu thùy gan rõ
Cấu trúc khoảng cửa	Bình thường	Bình thường
Mạch máu	Bình thường	Bình thường
Các tổn thương	Không có	Không có
Kết luận	<i>Gan bình thường</i>	<i>Không thấy hình ảnh tổn thương</i>



(a): Lô chứng

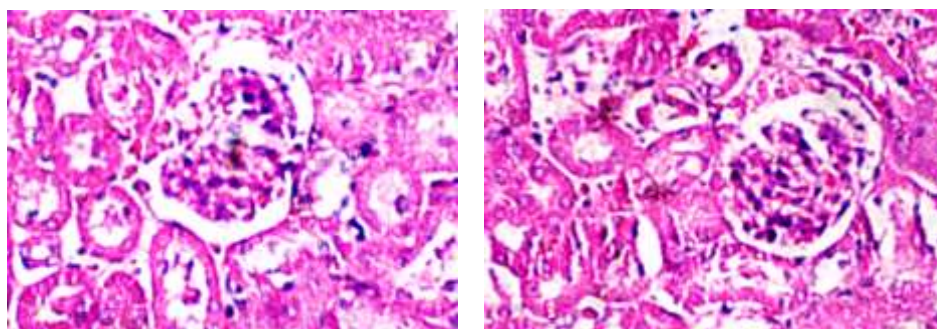


(b): Lô thuốc

Hình 3.2. Hình ảnh gan thỏ thực nghiệm (HE, 100X)

Bảng 3.8. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học của thận thỏ

Chỉ tiêu đánh giá	Lô nghiên cứu	
	Lô chứng (a)	Lô thuốc (b)
Màu sắc	Màu nâu nhạt	Màu nâu nhạt
Cấu trúc vùng vỏ	Rõ ràng	Rõ ràng
Cấu trúc vùng tủy	Bình thường	Rõ ràng
Cầu thận	Bình thường	Bình thường, khoang Bowman rõ
ống thận	Bình thường	Các ống thận đều
Tổn thương	Không có	Không có
Kết luận	Mô thận bình thường	Mô thận bình thường, không thấy hình ảnh tổn thương.

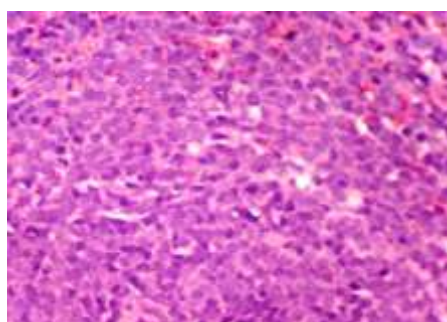


(a): Lô chứng

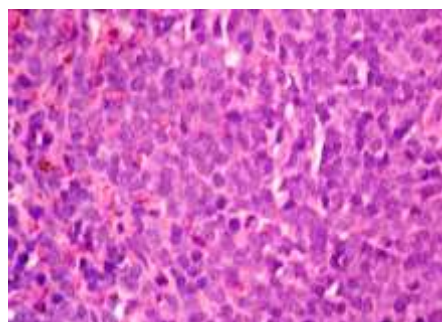
(b): Lô thuốc

Hình 3.3. Hình ảnh gan thỏ thực nghiệm (HE, 100X)**Bảng 3.9. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học của lách thỏ**

Chỉ tiêu đánh giá	Lô nghiên cứu	
	Lô chứng (a)	Lô thuốc (b)
Màu sắc	Nâu đậm	Nâu đậm
Cấu trúc vùng tủy trắng, các nang limphô	Rõ ràng	Rõ ràng
Cấu trúc mạch máu	Bình thường	Bình thường
Cấu trúc xoang	Bình thường	Bình thường
Các tổn thương	Không có	Không có
Kết luận	Mô lách bình thường	Mô lách bình thường



(a): Lô chứng



(b): Lô thuốc

Hình 3.4. Hình ảnh gan thỏ thực nghiệm (HE, 100X)

4. BÀN LUẬN

Những nghiên cứu trước đó cho thấy gel BC-A tương đối an toàn. Nghiên cứu độc tính cấp chế phẩm gel BC-A cho thấy không tìm thấy giá trị LD₅₀ của chế phẩm gel BC-A dù đã cho chuột uống ở mức liều tối đa (70g/kg) (Quy đổi ra liều trên người là 11,66g/kg). Như vậy, với một người nặng 50kg có thể uống 583,33g gel mà không gây độc.

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của gel BC-A trên chuột thực nghiệm cho thấy:

Chuột uống gel BC-A với liều dùng 220mg và 660 mg/kg/24 giờ, uống liên tục trong 30 ngày đã không làm ảnh hưởng đến sự phát triển trọng lượng thỏ, không biến đổi điện tim thỏ, không biến đổi các chỉ số huyết học như hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu và hàm lượng Hemoglobin, các chỉ số đánh giá chức năng gan (hoạt độ AST, ALT), thận (nồng độ Ure, Creatin) trong giới hạn bình thường. Hình ảnh mô bệnh học gan, thận và lách thỏ bình thường.

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của gel Nanocellulose phối hợp chiết xuất nhưng

hươu trên chuột, 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 huyết học, sinh hóa [8].

Trên cơ sở đó, chúng tôi đánh giá khả năng gây kích ứng da lành thực nghiệm. Chế phẩm sẽ được sử dụng ở vết thương, vết bỏng, đánh giá khả năng này là yêu cầu bắt buộc trước khi tiến hành trên người. Kết quả nghiên cứu cho thấy gel BC-A không gây kích ứng da lành thỏ (bảng 3.1). Nghiên cứu trên mô hình dùng lâu dài (30 ngày) trên diện tích da 30cm² (tương đương ½ tổng diện tích da thỏ), chế phẩm cũng không kích ứng da thỏ, điểm kích ứng = 0 (bảng 3.2). Các dấu hiệu khác liên quan tới dị ứng tại chỗ và toàn thân trên lâm sàng cũng không xuất hiện.

Nghiên cứu ảnh hưởng tới toàn thân khi dùng chế phẩm lâu dài (30 ngày), sử dụng đắp ngoài da với diện tích rộng nhưng chế phẩm cũng không gây ảnh hưởng toàn thân. Không có dấu hiệu thay đổi hành vi và đặc điểm khác bên ngoài như lông, da... Trên điện tim cũng ghi nhận chế phẩm không làm ảnh hưởng tới hoạt động của tim (biểu hiện tần số, phức bộ QRS trên ECG bình thường, không có sóng bất thường). Các chức năng tạo máu, đông chảy máu, phản ứng bảo vệ của cơ thể (qua xét nghiệm hồng cầu, tiểu cầu, bạch cầu), các chức năng gan thận (xét nghiệm Ure, Creatin, ALT, AST) bình thường. Hình ảnh mô bệnh học gan, thận và lách thỏ bình thường. Như vậy, chế phẩm khi dùng ngoài da lành lâu dài an toàn, không gây ảnh hưởng tới toàn thân và tại chỗ.

Nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các nghiên cứu về tác dụng của màng BC điều trị vết thương, vết bỏng trên thể giới và Việt Nam [1, 2, 5, 6].

Kết quả nghiên cứu này là cơ sở khách quan tin tưởng chế phẩm an toàn khi dùng trên người (không gây kích ứng, không ảnh hưởng tới hoạt động tim, tới chức năng gan, thận, lách, cơ quan tạo máu...).

5. KẾT LUẬN

Chế phẩm có khả năng dung nạp tốt trên da lành thỏ; không gây kích ứng da thỏ, điểm kích ứng bằng không.

Dùng lâu dài (30 ngày) trên diện tích da lành thỏ 30cm² không ảnh hưởng tới các hoạt động tim, chỉ số sinh lý, sinh hóa, huyết học và chức năng gan thận của thỏ. Hình ảnh mô bệnh học gan, thận và lách thỏ bình thường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Diete Klemm et al (2001)**; "Bacterial synthesid cellulose - artificial blood vessels for microsurgery".In Prog. Polym. Sci. **26**, 1561-1603
2. **Bielecki S. et all (2000)**;"Bacterial cellulose", Institute of technical Biochemical, Technical University of Lodz, Poland.
3. **Bielecki S. (2006)**; "External and internal applications of microbial cellulose in medicine", Institute of Technical Biochemistry, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Technical University of Lodz, Poland.
4. **Rambo C. R. et all (2007)**;"Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering", Materials science and engineering C 28(2008) 549-554.
5. **Huỳnh Thị Ngọc Lan, Nguyễn văn Thanh (2006)**,"Nghiên cứu các đặc tính màng cellulose vi khuẩn từ *Acetobacter xylinum* sử dụng làm màng trị bỏng", Dược học số 5, 2006.
6. **Nguyễn Ngọc Tuấn, Nguyễn Bằng Tâm (2012)**; "Nghiên cứu tác dụng điều trị tại chỗ tổn thương bỏng của màng BC từ vi khuẩn *Acetobacter xylinum*" , Tạp chí Y học thảm họa và bỏng, tr 45-54
7. **Chiara Rigo, Leitzia Ferroni, Ilaria tocco et al. (2013)**; "Active Silver Nanoparticles for Wound Healing"; Int J Mol Sci. 2013 Mar; 14(3): 4817 - 4840.
8. **Nguyễn Ngọc Tuấn, Đoàn Chí Thanh, Nguyễn Ngọc Thịnh (2019)**; "Nghiên cứu xác định độc tính cấp tính và bán trường diễn của gel nanocellulose kết hợp chiết xuất nhung hươu", tạp chí YHHTH và bỏng, số 1, tr 20-21
9. OECD guideline for testing chemicals, OECD/OCDE 404; Acute Dermal Irritation/Corrosion, Adopted 24th April 2002.
10. OECD guideline for testing chemicals, OECD/OCDE 423; Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, Adopted 3rd October 2008.
11. Bộ Y tế Cộng hoà xã hội chủ nghĩa Việt Nam (1996).Quy định về nghiên cứu dược lý các thuốc y học cổ truyền.Quyết định 371/QĐ-BYT.
12. **WHO (1993)**: Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines, Manila, Philipin, pp 35 - 41.
13. **Abraham W.B. (1978)**: Techniques of animal and clinical toxicology, Med. pub. Chicago, pp 55 - 68.