ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ CỦA THUỐC "AN CUNG NGƯU HOÀNG HOÀN" TRÊN MÔ HÌNH XUẤT HUYẾT NÃO Ở CHUỘT NHẮT THỰC NGHIỆM

Hồ Anh Sơn*; Hoàng Văn Lương*
Nguyễn Minh Hà**

TÓM TẮT

Xây dựng mô hình chảy máu não trên chuột nhắt với tổn thương được lượng hóa bằng hành vi, lượng nước trong não và tiêu bản học. Truyền 0,5 µL nước muối sinh lý chứa collagenase vào vùng đích nhân bèo cho chuột nhắt trưởng thành. Sau 24 - 48 giờ, các rối loạn vận động xuất hiện và phù não ngày càng tăng. Sử dụng mô hình này để thử nghiệm tác dụng điều trị của "An cung ngưu hoàng hoàn" trong giai đoạn cấp từ ngày 1 đến ngày 3. Kết quả cho thấy sự tăng đáng kể khả năng vận động, giảm phù não và thể tích não tổn thương tại nhóm được điều trị bằng An cung ngưu hoàng hoàn.

* Từ khóa: An cung ngưu hoàng hoàn; Đột quỵ chảy máu não; Thực nghiệm.

EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF "ANGONG NIUHUANG WAN" ON MICE UNDERGONE EXPERIMENTAL HEMORRHAGIC STROKE MODEL

SUMMARY

We established a hemorrhagic stroke in mice, in which we characterized the lession by behavior, brain edema and histology. Adult mice had been infused with 0.5 µL saline containing bacterial collagenase into the right putamen. Motoric disturbances were present, water content was significantly increased after infusion 24 and 48 hours at the needle puncture site. Using this model, we tested the effectiveness of a traditonal medicine Angong niuhoang wan, during acute phase. The data showed the significant motoric improvement, reducing of brain edema and brain lession volume in Angong niuhuang wan-treated group.

** Key words: Angong niuhuang wan; Hemorrhagic stroke model; Experimental.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Xuất huyết não (XHN) là tình trạng bệnh lý lâm sàng nặng, chiếm 15% tổng số ca đột quỵ não tại các bệnh viện. Khoảng 35% ca bệnh XHN tử vong trong giai đoạn cấp tính và một tỷ lệ lớn bệnh nhân (BN) bị tàn phế. Hiện tại, chưa có phương pháp y học đặc hiệu nào điều trị bệnh này, ngoại trừ một số biện pháp hỗ trợ, chăm sóc và can thiệp phẫu thuật. Do đó, việc xây dựng mô hình đột quỵ chảy máu não nhằm phục vụ nghiên cứu cơ chế bệnh sinh cũng như ứng dụng để thử nghiệm liệu pháp điều trị mới là hết sức cần. Mô hình đột quỵ chảy máu

* *Học viện Quân y*
** *Viện Y học Cổ truyền Quân đội*
Phản biện khoa học PGS.:TS. Nguyễn Văn Ch□ơng

não đã được phát triển nhiều thập kỷ trên thế giới, nhưng tại Việt Nam, chưa có một công trình nào công bố xây dựng thành công mô hình đột quỵ chảy máu não trên động vật.

Có nhiều bài thuốc cổ phương và nghiệm phương điều trị hiệu quả các chứng bệnh này. Trong đó, thuốc An cung ngưu hoàng hoàn (AC) được dùng rất phổ biến để cứu chữa những bệnh nhân đột quỵ trong giai đoạn cấp tính tại Trung Quốc. Tại Việt Nam, phạm vi sử dụng thuốc này còn hẹp vì chưa có chứng cứ khoa học cụ thể để chứng minh tác dụng của thuốc trong điều trị đột quỵ nhồi máu hoặc chảy máu não.

Do vậy, mục tiêu của của công trình này là:

1. Xây dựng mô hình đột quỵ chảy máu não.

2. Nghiên cứu tác dụng điều trị của AC trên mô hình đột quỵ chảy máu não trong giai đoạn cấp 1 - 3 ngày sau đột quỵ.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Chuột nhắt đực trắng, chủng Swiss, trọng lượng 25 - 30 gr. Chuột được nuôi trong điều kiện nhiệt độ phòng 24 - 26^0, chiếu sáng theo chu kỳ 10/14 (bật đèn lúc 8.00 giờ; tắt lúc 18.00 giờ). Động vật được cung cấp đầy đủ nước và thức ăn, chuồng trại hợp vệ sinh. Tổng số chuột là 50 con, được chia thành các lô:

+ Lô chứng (n = 10): đo vận động trong 5 phút ở ngày 1 và 3 sau phẫu thuật.

+ Lô nghiên cứu gây đột quỵ chảy máu đơn thuần (n = 20, collagenase + nước cất): đánh giá vận động, phù não, làm tiêu bản (ngày 1 và 3 sau phẫu thuật).

+ Lô nghiên cứu gây đột quỵ chảy máu kết hợp thử thuốc (n = 20, collagenase + AC): đánh giá vận động, phù não, làm tiêu bản (ngày 1 và 3 sau phẫu thuật).

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Mô hình gây XHN:*

Chuột được gây mê bằng nembutal đường phúc mạc, liều 40 mg/kg thể trọng. Cố định chuột trên hệ thống định vị M2009S, một lỗ nhỏ 0,5 mm trên xương sọ tại vị trí dự định đưa hóa chất vào não, khoan bởi máy Proxxon (Nhật Bản) với mũi khoan đường kính 0,2 mm. Kim tiêm 31G nối với bơm tiêm siêu nhỏ (1 µl) gắn trên hệ thống thước không gian 3 chiều, đưa chậm vào não tới đích là nhân bèo, theo tọa độ trước - sau 1,0; bên 2,0; sâu 3,5 mm (tính từ điểm Bregma). Sau đó, bơm chậm 0,5 µl dung dịch chứa 0,075 đơn vị collagense vào não. Đóng da đầu lại. Nhỏ 3 giọt kháng sinh gentamicine 80 mg/ml (Việt Nam) tại bề mặt xương sọ bộc lộ trong quá trình phẫu thuật. Lô chứng được tiến hành các bước như trên nhưng không đưa kim tiêm và hóa chất vào não.

** Đánh giá mức độ tổn thương và hiệu quả dùng thuốc:*

Sau mổ, đánh giá tổn thương:

+ Đánh giá mức độ suy giảm vận động (so sánh trên 2 lô chuột đột quỵ XHN điều trị bằng AC hoặc NC) vào ngày thứ 1 và 3 sau phẫu thuật.

Bảng 1: Thang điểm giá mức độ suy giảm vận động.

Điểm	0	1	2	3	4
1. Thăng bằng cơ thể (nhìn từ trên xuống)	Bình thường (bt)	Thay đổi nhẹ	Thay đổi trung bình	Thay đổi dễ thấy	Thay đổi nghiêm trọng
2. Dáng đi	Bt	Cứng	Khập khiễng	Run, ngã	Không đi được
3. Trèo dốc 45^0	Bt	Trèo yếu	Giữ đứng tại dốc	Nằm tại dốc, ngã	Không chuyển động
4. Xoay tự nhiên	Không biểu hiện	Lật nghiêng chủ yếu một bên	Xoay một bên nhưng không ổn định	Xoay một bên ổn định	Không chuyển động
5. Xoay cưỡng bách	Không biểu hiện	Xu hướng lật một bên	Xoay một bên	Xoay một bên chậm	Không làm được
6. Thăng bằng chân trước/sau	Bt	Không thăng bằng nhẹ	Không thăng bằng rõ	Không thăng bằng nghiêm trọng	Không vận động cơ thể/chân
7. Đáp ứng với chạm nhẹ phía sau	Đáp ứng có hệ thống	Mất thăng bằng nhẹ	Mất thăng bằng rõ	Không đáp ứng cùng bên, giảm đáp ứng đối bên	Không đáp ứng cả hai bên

7 tiêu chí đánh giá bao gồm: cân bằng cơ thể, dáng đi, khả năng leo dốc, thăng bằng chân trước, hướng di chuyển (thẳng hay vòng) tự nhiên, hướng di chuyển khi đuôi bị cố định, đáp ứng với chạm nhẹ từ phía sau *(bảng 1)*. Mỗi tiêu chí cho điểm từ 0 - 4 với mức độ tổn thương nặng nhất là 28 điểm (Clark và CS, 1997).

+ Đánh giá khả năng vận động (so sánh trên cả 3 lô chuột): đo tổng chiều dài quãng đường vận động trong 5 phút (ngày 1, 3): mỗi chuột đặt trong hộp nhựa, kích thước 30 x 50 cm và ghi lại quá trình vận động của chuột bằng camera nối với máy tính trong 5 phút. Phần mềm máy tính sẽ tự động phân tích tổng quãng đường di chuyển và vận tốc trung bình của chuột.

+ Đánh giá tổn thương bằng giải phẫu bệnh (so sánh trên 2 lô chuột đột quỵ XHN được điều trị bằng AC hoặc NC).

Chuột được gây mê sâu bằng nembutal, tiêm phúc mạc 80 mg/kg thể trọng ngày thứ 1 (n = 5) hoặc ngày thứ 3 (n = 5) sau khi phẫu thuật. Bộc lộ tim và truyền vào tâm thất trái dung dịch NaCl 9‰ trong dung dịch formalin 10% để làm sạch máu trong hệ tuần hoàn. Làm đông cứng não chuột trên máy cắt lát. Cắt mỗi lát 50 µm và cố định, làm khô trên lam kính. Sau đó nhuộm bằng *cresyl violet*, chụp hình tiêu bản dưới kính hiển vi Olympus. Trung bình, cứ mỗi 200 µm chiều dày não, tính diện tích tổn thương một lần theo đơn vị µm^2. Sau đó, tính thể tích não tổn thương trung bình theo tỷ lệ (bằng tổng diện tích tổn thương mỗi lát cắt x 4). Nếu mỗi lát cắt có nhiều vị trí tổn thương, diện tích tổn thương được tính bằng tổng diện tích các vị trí. Diện tích tổn thương đo bằng phần mềm chuyên biệt.

+ Đánh giá mức độ phù não (so sánh trên 2 lô chuột đột quỵ XHN điều trị bằng AC hoặc NC): giết chuột bị bằng kéo giãn đốt sống cổ ngày thứ 1 (n = 5) hoặc ngày thứ 3 (n = 5) sau khi gây XHN. Phẫu tích và cắt ngang não chuột phía trên 2 mm và dưới vùng tổn thương 2 mm, chia thành hai bên bán cầu theo đường giữa (trong các quan sát trước đó, chúng tôi ghi nhận vùng xuất huyết thường phát triển quanh vị trí tiêm hóa chất khoảng 1 mm). Cân não

chuột để lấy khối lượng não ướt, sấy khô trong vòng 24 giờ và cân.

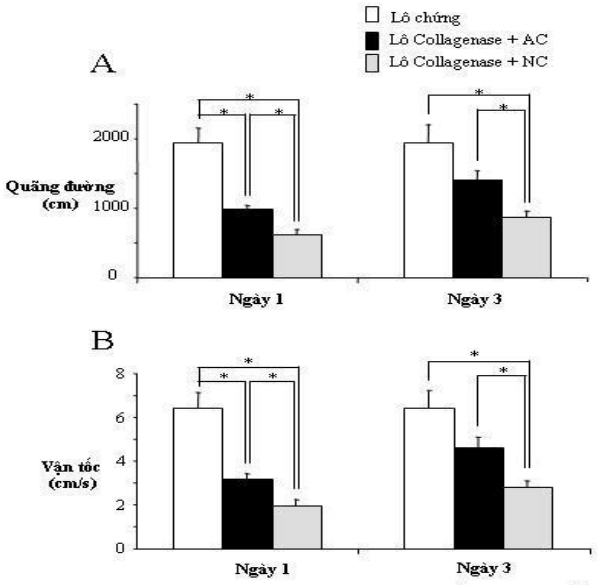
+ Uống thuốc: chuột uống AC qua sonde kim loại, đưa qua miệng tới dạ dày với liều 720 mg/kg. Hòa tan thuốc trong nước cất (NC) sao cho đạt liều 0,1 ml/10 gr chuột. Ngày 0 (ngày phẫu thuật), cho chuột uống thuốc sau khi tỉnh thuốc mê (3 - 4 giờ sau phẫu thuật). Những ngày tiếp theo, chuột uống thuốc vào các buổi chiều sau khi đã đánh giá vận động vào buổi sáng. Chuột ở lô chứng được uống NC với lượng tương ứng 0,1 ml/10 gr thể trọng.

** Xử lý kết quả bằng thuật toán T-test.*

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Các dấu hiệu lâm sàng cho thấy chuột gây XHN nửa bán cầu phải bị liệt nửa thân bên trái, nên chuột có xu hướng di chuyển xoay tròn về phải do chuyển động của các cơ nửa thân bên phải. Não chuột sau khi phẫu tích ra khỏi hộp sọ, cắt ngang vị trí, đưa kim tiêm vào não. Đây là vùng có diện tích tổn thương lớn nhất với hình ảnh xuất huyết mạnh nửa bán cầu phải sau phẫu thuật ngày thứ nhất.

1. Quãng đường và vận tốc di chuyển.



Hình 2: Quãng đường và vận tốc di chuyển

Ngày thứ nhất sau phẫu thuật gây đột quỵ, chuột lô gây đột quỵ đơn thuần (collagenase + NC) có thể tự di chuyển 607 ± 89 cm trong vòng 5 phút *(hình 1A)*.

Quãng đường này ngắn hơn có ý nghĩa thống kê (p < 0,005) so với lô chuột đột quỵ điều trị bằng AC (collagenase + AC, 978 ± 58,7 cm) và lô chuột khỏe mạnh (1942 ± 218 cm). Tương ứng, vận tốc trung bình của lô "collagenase + NC" chậm hơn có ý nghĩa thống kê (2,02 ± 0,27 cm/giây) so với chuột "collagenase + AC" (3,26 ± 0,2 cm/giây) và chuột giả phẫu thuật (6,47 ± 0,73 cm/giây) với p < 0,005 *(hình 1B)*.

Bảng 2: Quãng đường và vận tốc.

	QUÃNG ĐƯỜNG (cm)		VẬN TỐC (cm/s)	
	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 1	Ngày 3
Lô chứng	1942 + 217,7	1939 + 247,8	6,47 + 0,73	6,46 + 0,83
Collgenase + AC	978 + 58,7	1395 + 141,2	3,26 + 0,2	4,65 + 0,3
Collagnase - AC	607 + 89	858 + 97,7	2,02 + 0,28	

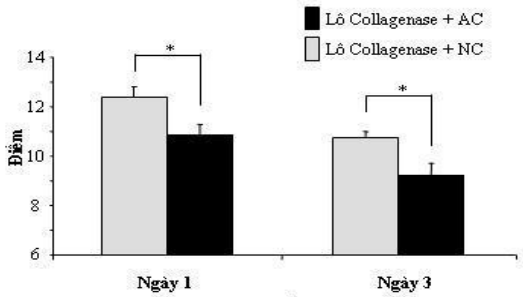
Sau mổ 3 ngày, lô "collagenase + NC", chuột vận động quãng đường ngắn hơn (858 ± 97,7 cm), vận tốc chậm hơn (2,86 ± 0,3 cm/giây) có ý nghĩa thống kê so với chuột lô "collagenase + AC" và lô chuột giả phẫu thuật (tương ứng 1.395 ± 141 cm; 4,65 ± 0,47 cm/giây và 1.938 ± 248 cm; 6,46 ± 0,83 cm/giây). Kết quả này cho thấy chuột đột quỵ được điều trị bằng AC ngay sau phẫu thuật 4 giờ có cải thiện đáng kể khả năng vận động so với nhóm dùng NC trong ngày 1 và 3 sau đột quỵ chảy máu não (lô NC chỉ đạt khoảng 62% chiều dài quãng đường vận động của lô AC). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu tại Trung Quốc về khả năng điều trị của AC trên BN đột quỵ não, giúp cải thiện các triệu chứng lâm sàng.

2. Cho điểm lâm sàng.

Collagenase + NC: ngày 1: 12,38 ± 0,45; ngày 3: 10,75 ± 0,27.

Collagenase + AC: ngày 1: 10,88 ± 0,43; ngày 3: 9,25 ± 0,48.

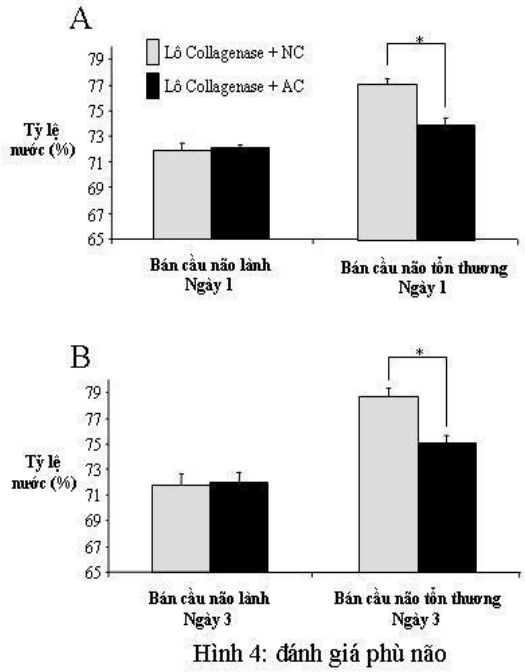
Với thang điểm 28 cho 7 tiêu chí lâm sàng áp dụng trên chuột nhắt bị đột quỵ, các dữ liệu cho thấy chuột sử dụng AC có điểm thấp hơn so với chuột không được điều trị ở ngày 1 và 3 sau phẫu thuật (ngày 1: 10,9 ± 0,43 và 12,4 ± 0,45; ngày 3: 9,3 ± 0,48 và 10,8 ± 0,27), p < 0,05.



Hình 3: Cho điểm lâm sàng

Kết quả này tương tự như các tác giả khác đã nghiên cứu trên cùng mô hình đột quỵ này với phương thức trị liệu khác (Clark và CS, 1998; Wang và CS, 2004).

3. Mức độ phù não.



Hình 4: đánh giá phù não

Tỷ lệ nước tại bán cầu não thương tổn ở cả hai lô đều tăng so bán cầu não không tổn thương sau phẫu thuật 1 ngày (collagenase + NC: 77,2 ± 0,39% và 71,8 ± 0,62%; collagenase + AC: 74 ± 0,5% và 72,1 ± 0,25%, p < 0,05) *(hình 3A)*. Khi so sánh tỷ lệ nước tại bên não tổn thương, lô "collagenase + NC" nhiều hơn so với lô "collagenase + AC", tương ứng 77,2 ± 0,39% và 74 ± 0,5% (p < 0,005). Không có sự khác biệt về lượng nước trong bán cầu não bình thường. Hiệu quả điều trị của AC tiếp tục được khẳng định khi làm giảm đáng kể mức độ phù não trong ngày thứ 3 sau phẫu thuật (collagenase + NC: 78,8 ± 0,73%; collagenase + AC: 75,2 ± 0,55%; p < 0,005). Không có khác biệt về lượng nước phía bán cầu não không gây tổn thương giữa hai lô *(hình 3B)*.

Bảng 3: Tỷ lệ n- ớc trong não (%).

	NGÀY 1		NGÀY 3	
Collgenase + AC	72,11 +	73,95 +	72,01 +	75,22 +

	0,25	0,5	0,75	0,54
Collagnase - AC	71,83 + 0,63	77,19 + 0,39	71,83 + 0,85	78,77 + 0,73

Điều trị phù não có ảnh hưởng đáng kể đến tiến triển của bệnh lý đột quỵ, kết quả trên đã phản ánh AC chống phù não rất tốt và có tác động tích cực tới khả năng vận động của động vật thực nghiệm.

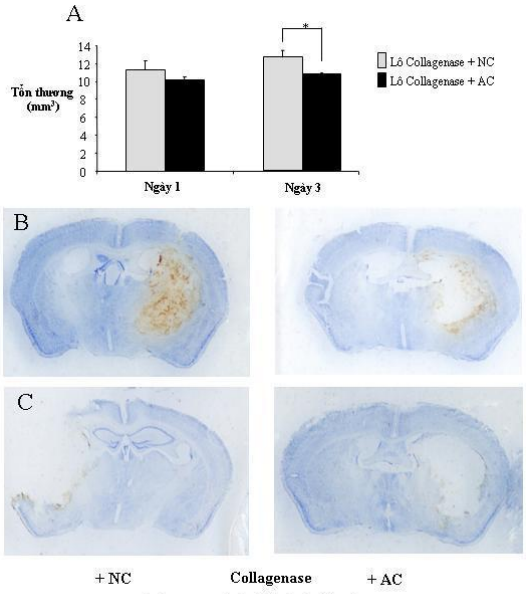
4. Thể tích não tổn thương.

Nhu mô não bị phá hủy rất lớn ở cả hai lô, tại ngày đầu tiên sau phẫu thuật, không thấy khác biệt đáng kể nào (collagenase + NC: 11,3 ± 1,06 mm^3; collagenase + AC: 10,1 ± 0,3 mm^3, p > 0,05).

Collagenase + NC: ngày 1: 11,3 ± 1,07; ngày 3: 12,4 ± 0,33.

Collagenase + AC: ngày 1: 10,14 ± 0,33; ngày 3: 10,55 ± 0,22.

Tuy nhiên, sau 3 ngày, đã có sự khác biệt giữa lô "collagenase + NC" với thể tích tổn thương trung bình 12,4 ± 0,8 mm^3, lớn hơn nhóm điều trị bằng AC (10,6 ± 0,22 mm^3), p < 0,05 *(hình 4A)*. Hình ảnh chụp lát cắt não tại vùng tổn thương tại ngày 1 *(hình 4B)* và ngày 3 *(hình 4C)* cũng phản ánh kết quả này.



Hình 5: So sánh thể tích tổn thương

BÀN LUẬN

Mô hình gây XHN bởi collagenase là enzym phân giải protein có thể làm tan tổ chức ngoại bào xung quanh mạch máu đã được xây dựng thành công trên chuột nhắt trắng. Đồng thời, lô chuột XHN được điều trị bằng thuốc AC cho thấy cải thiện đáng kể các chỉ số vận động, chỉ số phù não và thể tích não thương tổn.

Thang điểm đánh giá vận động trên động vật đột quỵ thực nghiệm đã được tiến hành từ lâu trên thế giới. Tuy nhiên, tại Việt Nam, chúng ta chưa xây dựng các tiêu chí đánh giá này nhằm lượng hóa tổn thương trên mô hình đột quỵ thực nghiệm. Các kết quả của nghiên cứu

này cho thấy có sự cải thiện đáng kể khả năng vận động của động vật đột quỵ chảy máu được điều trị bằng AC trong giai đoạn cấp. Điều này được lý giải bởi các kết quả sau đó cho thấy mức độ phù não giảm có ý nghĩa thống kê ở lô chuột được điều trị bằng AC khi so sánh với chuột chỉ được uống NC. Tại ngày thứ nhất và ngày thứ 3, lượng nước chứa trong phần não tổn thương được điều trị bằng AC ít hơn lô dùng NC hơn 3%. Các dữ liệu về thể tích não tổn thương do collagenase gây ra củng cố kết quả của sự cải thiện vận động ở lô được điều trị bằng AC. Tuy nhiên, do phương pháp nhuộm *cresyl violet* nên chúng tôi chỉ quan sát được diện tích tổn thương trực tiếp. Các thương tổn khác như phù não chưa được phản ánh trên hình ảnh của các lát cắt này. Có thể do vậy nên kết quả tổn thương ngày đầu không có sự khác biệt giữa hai lô. Ngày thứ 3 sau phẫu thuật, do các tế bào hồng cầu đã bị thoái giáng nên ranh giới các tổn thương rõ ràng hơn với thể tích não tổn thương tại lô được điều trị bằng AC nhỏ có ý nghĩa thông kê khoảng 2 mm^3 (16%) so với lô dùng NC. Lô chuột "collagenase + NC" có tổn thương lan rộng cả tới vùng vỏ não (ngày 1: 11,3 ± 1,06 mm^3; ngày 3: 12,4 ± 0,8 mm^3), trong khi đó, chuột "collagenase + AC" có diện tổn thương khu trú hơn và không tăng nhiều so với ngày thứ nhất (ngày 1: 10,1 ± 0,3 mm^3; ngày 3: 12,4 ± 0,8 mm^3). Kết quả này cũng tương tự như một số nghiên cứu khác có cùng mô hình đột quỵ (Clark và CS, 1998; Wang và CS, 2004).

KẾT LUẬN

1. Mô hình gây XHN thực □iệ□ t□ên chu□t nhất trắng bằng collagenase có cơ chế gây XHN tương tự trên người.

2. Chuột bị đột quỵ bởi collagenase khi điều trị bằng AC với liều 720 mg/kg có cải thiện rõ rệt các chức năng vận động, tăng khoảng 38% quãng đường di chuyển và giảm phù não khoảng 3% so với lô chuột chỉ điều trị bằng NC.

3. AC làm giảm thể tích tổn thương não 2 mm^3 (16%) vào ngày thứ 3 sau điều trị khi so với nhóm dùng NC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Clark W., Gunion-Rinker L., Lessov N., Hazel K., Macdonald R.L. Citicoline treatment for experimental intracerebral hemorrhage in mice. Stroke. 1998, 29, pp.2136-2140.

2. Feng Y.B., Luo W.Q., Zhu S.Q. Explore new clinical application of Huanglian and corresponding compound prescriptions from their traditional use. 2008. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2008, 33, pp.1221-1225.

3. Mengzhou Xue, Marc R. Del Bigio. Comparison of brain cell death and inflammatory reaction in three models of intracerebral hemorrhage in adult rats. J Str. and Cereb. Dis. 2003, 12, pp.152-159.

4. Rosenberg G.A., Mun-Bryce S., Wesley M., Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. Stroke .1990, 21, pp.801-807.

5. Lin S.L., Zhao L.H., Wang Y.M., Dong S.S., An D.K. Determination of berberine in Angong Niuhuang Wan by HPLC. Yao Xue Xue Bao. 1989, 24, pp.48-52.

6. Wang J., Tsirka S.E. Tuftsin Fragment 1-3 Is Beneficial when delivered after the induction of intracerebral hemorrhage. Stroke. 2005, 36, pp.613-618.