

Nghiên cứu
thực nghiệm

TÁC DỤNG BẢO VỆ TẾ BÀO NÃO CỦA BÀI THUỐC HOẠT HUYẾT HOÁ Ứ ĐỐI VỚI CHUỘT TRONG THIẾU MÁU CỤC BỘ - TUỖI MÁU LẠI

(*) *Trần Lưu Văn Hiến*

(*) *Chu Quốc Trường*

(*) *Nguyễn Xuân Giao*

(*) *Nguyễn Thu Hiền*

(*) *Phạm Thị Thanh Hà*

(*) *Trần Thanh Loan*

SUMMARY

A animal model to initiate an oxidative stress in brain has been successfully applied in our Laboratory. Condition of temporary brain ischemia is conducted by two carotid artery occlusion for 20min, then a reperfusion is followed for 20min aiming to produce oxidative damage. MDA measurements are used to confirm the levels of brain damage and protective effects of studied extracts. One formula for “activating the blood and transforming the obstruction” has been tested for the protecting activity against the ischemia/ reperfusion – induced injuries to brain. The extract was given to mice at doses of 200,300 and 500mg/kg for 10 continuous days before the model of brain ischemia. This application showed a remarkably protective effects by limiting the elevated MDA levels in brain homogenates, resulted by ischemia/ reperfusion ($P<0,001$).

Corresponding to the increasing oxidative stress in ischemia/reperfusion, SOD activity (an antioxidant enzyme) was found to be reduced in this model, while, the studied extract almostly reversed the SOD activity when the extract was given to mice at dose of 500 mg/kg body weight.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong sự tưới máu lại sau thiếu máu cục bộ các quá trình hoá sinh độc hại có thể xảy ra, các quá trình này lại gây nên các tác dụng bất lợi của sự tưới máu lại đối với tổ chức mô. Các nghiên cứu nhằm có thêm các hiểu

biết và nghiên cứu để điều trị các tổn thương do tưới máu lại (RI) là một mục tiêu quan trọng trong thiên niên kỷ mới của liệu pháp điều trị bằng truyền máu cho các trường hợp tai biến (stroke).

(*) Bệnh viện Y học cổ truyền Trung ương.

Phản biện: PGS.TS. Nguyễn Nhượng Kim

Quá trình thiếu máu - tưới máu lại dẫn đến những phản ứng hoá sinh quan trọng gây nên tổn thương não do có sự hình thành quá mức các gốc tự do hoạt động [5]. Tế bào não đặc biệt nhạy cảm với stress oxy hoá do màng phospho lipid của tế bào não chứa nhiều các acid béo không no hơn các tế bào khác [3]. Não là tổ chức tiêu thụ nhiều nhất lượng oxy so với các bộ mô khác. Các tế bào nội mạc của mạch máu và nhu mô, cả hai đều có chu trình mạnh để sản sinh ra các gốc tự do trong các điều kiện bệnh lý [1,2]. Đã có các nghiên cứu sử dụng antioxidant để bảo vệ tế bào thần kinh, phục hồi chức năng thần kinh, làm giảm thể tích nhồi máu trong mô hình thực nghiệm, động vật thí nghiệm bị gây nghẽn động mạch não giữa và động mạch cảnh hai bên. Các tác giả đi đến kết luận là các antioxidant đã nghiên cứu có tác dụng bảo vệ thần kinh tốt hơn so với các thuốc có tác dụng lên vi mạch. Nghiên cứu này nhằm khảo sát mức độ tổn thương do phản ứng peroxy hoá lipid đối với não và hoạt độ enzym SOD hồng cầu khi chuột trải qua thí nghiệm gây thiếu máu cục bộ/tưới máu lại. Tác dụng của bài thuốc hoạt huyết hoá ứ được khảo sát trong mô hình này nhằm làm sáng tỏ cơ chế tác dụng của bài thuốc.

2. ĐỐI TƯỢNG-CHẤT LIỆU- PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU-CHỈ TIÊU QUAN SÁT

2.1. Đối tượng:

Thí nghiệm tiến hành trên chuột nhắt trắng chủng Swiss 7 tuần tuổi, không phân biệt giống, có trọng lượng 20 - 22

gram, nuôi dưỡng và thí nghiệm trong cùng điều kiện.

2.2. Chất liệu:

Bài thuốc có tác dụng hoạt huyết, hoá ứ do PGS.TS. Chu Quốc Trường xây dựng trên cơ sở bài Bổ trung ích khí gia giảm. Bài thuốc nghiên cứu gồm các vị sau:

Hoàng kỳ (*Radix Astragalis membranaceus*)

Bạch truật (*Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*)

Đương quy (*Radix Angelicae Sinensis*)

Đảng sâm (*Radix Codonopsis*)

Kê huyết đằng (*Mucuna birwoodiana tutcher*)

Bá tử nhân (*Semen thujae orientalis*)

Đan sâm (*Radix salviae Multiorrhizae*)

Khương hoạt (*Rhizoma Notopterygii*)

Thăng ma (*Cimifugae dahuricae*)

Sài hồ (*Radix Bupleuri*)

Xuyên khung (*Rhizoma Ligustici wallichii*)

Hà thủ ô (*Radix Polygoni multiflori*)

Đại táo (*Fructus Zizyphi*)

Kỷ tử (*Fructus Lycii*)

Cam thảo (*Radix Glycyrrhizae*)

- Thuốc sử dụng dưới dạng nước sắc, nồng độ 1g/1ml.

2.3. Tiến hành thí nghiệm:

Chuột được chia thành 3 nhóm chính:

Nhóm 1: Nhóm đối chứng sinh học.

Nhóm 2: Nhóm đối chứng mô hình. Gây thiếu máu cục bộ não 20 phút, tưới lại 20 phút. Giết chuột, lấy não xác định hàm lượng MDA, lấy hồng cầu xác định hàm lượng enzym SOD.

Nhóm 3: Nhóm điều trị thuốc 10 ngày và được chia thành 3 nhóm nhỏ theo liều điều trị:

- Liều điều trị 200mg/kg thể trọng chuột
- Liều điều trị 300mg/kg thể trọng chuột
- Liều điều trị 500mg/kg thể trọng chuột

Sau điều trị 10 ngày tiến hành gây mê bằng Urethan 20% (10mg/kg chuột). Mở chuột bóc tách 2 động mạch cảnh chung, kéo căng 20 phút để hạn chế máu lên não, tưới lại 20 phút. Lấy não đo MDA, lấy hồng cầu xác định enzym SOD.

Xử lý số liệu theo phương pháp thống kê dùng phần mềm Anova.

*** Kỹ thuật xác định hàm lượng MDA:**

Cân trọng lượng não chuột (500mg) rồi nghiền trong KCl 9⁰/₁₀₀ làm lạnh, lấy 2 ml mô não/ống, thêm vào mỗi ống 0,2 ml acid ascorbic, 0,2 ml muối morh. Sau đó ủ 30 phút ở nhiệt độ 37°C. Tủa bằng 1ml acid tricloacetic/ống, ly tâm

3000vòng/phút trong 10 phút. Hút 2 ml dịch nổi vào mỗi ống, thêm vào mỗi ống 1ml acid thiobacbituric, đun sôi 20 phút sau đó làm lạnh đến nhiệt độ phòng, đo độ hấp phụ ở bước sóng 532 nm. Hàm lượng MDA tính bằng nanomol

*** Phương pháp xác định hàm lượng enzym SOD trong hồng cầu chuột:**

- Lấy 0,5 ml máu chuột, chống đông bằng EDTA. Ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Hút loại huyết tương.
- Sau đó rửa hồng cầu 4 lần, bằng NaCl 9 ‰, ly tâm 10 phút, 3000 vòng/phút.
- Hồng cầu sau khi đã rửa bằng ly tâm, trộn với 2 ml nước cất 2 lần để lạnh, lắc đều và để yên 4⁰C trong 15 phút.

Dịch dung giải được pha loãng với PBS 0,01 mol/l, pH = 7, pha loãng hồng cầu 50 lần. Hệ số pha loãng là 200. Hoạt độ SOD được xác định bằng kit RANSOD Sd 125, đo trên máy sinh hóa Cobas mira, tại bước sóng 505 nm. Đơn vị tính U/ml.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tác dụng chống oxy hoá bảo vệ tế bào não của bài thuốc bổ trung ích khí gia giảm

Bảng 1. Tác dụng bảo vệ tế bào não của bài thuốc bổ trung ích khí gia vị

Nhóm	ĐCSH n=10	MH	Điều trị 200mg/kg	Điều trị 300mg/kg	Điều trị 500mg/kg
MDA ± SE n = 10	10,24 ± 0.004	15,93 ± 0.012	14,04 ± 0.003	11,56 ± 0.008	11,71 ± 0.011
P	< 0.001				

Nhận xét:

- Hàm lượng MDA ở tất cả các lô điều trị liều 200 - 300 - 500 mg/kg chuột đều

thấp hơn so với lô mô hình đối chứng gây thiếu máu cục bộ - tưới máu trở lại. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $P < 0.001$.

- Khi tăng dần liều điều trị từ 200 - 300 - 500 mg/kg chuột hàm lượng MDA

giảm dần MDA 200 > MDA 300 > MDA 500. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $P < 0.05$. Tác dụng bảo vệ tế bào não chống oxy hoá của bài thuốc liều 300 và 500 mg/kg tốt hơn so với liều 200 mg/kg.

3.2. Hoạt độ enzym SOD trong mô hình gây thiếu máu/tưới máu lại của bài bổ trung ích khí gia giảm

Bảng 2: Hoạt độ enzym SOD trong mô hình gây thiếu máu/tưới máu lại của bài bổ trung ích khí gia giảm:

Nhóm	ĐCSII n=10	MII	Điều trị 200mg/kg	Điều trị 300mg/kg	Điều trị 500mg/kg
SOD (n=5)	221.12 ± 11.74	182.7 ± 11.8	163.4 ± 6.9	175.74 ± 6.0	207.66 ± 7.5
P	< 0.01		89.5%	96%	113,6%

Nhận xét:

- Hàm lượng enzym SOD ở nhóm mô hình gây thiếu máu cục bộ tưới máu lại thấp hơn so với nhóm đối chứng sinh học, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $P < 0.05$.

- Ở nhóm điều trị liều 200mg/kg hàm lượng SOD thấp hơn so với nhóm mô hình (89.5%) và bằng 73.7% so với nhóm đối chứng sinh học.

- Ở nhóm điều trị liều 300mg/kg hàm lượng SOD vẫn thấp hơn chỉ bằng 96% so với nhóm mô hình và bằng 79.5% so với nhóm đối chứng sinh học

- Ở nhóm điều trị liều 500mg/kg hàm lượng SOD cao hơn hẳn so với nhóm mô hình bằng 113.6% và bằng 96% so với nhóm đối chứng sinh học.

* Kết quả trên cho ta thấy với liều điều trị thích hợp bài thuốc có tác dụng chống oxy hoá và bảo vệ enzym chống oxy hoá.

Trong nghiên cứu này chúng tôi áp dụng một bài thuốc do PGS.TS. Chu Quốc Trường thường dùng cho bệnh

nhân thiếu năng tuần hoàn não. Thuốc được cho chuột ở lô 3 uống với các liều xác định trong 10 ngày liên tiếp trước khi gây mô hình thiếu máu não/tưới máu lại. Kết quả ở bảng 1 cho thấy hàm lượng MDA dịch đồng thể tế bào não ở nhóm điều trị thấp hơn so với với giá trị này ở nhóm mô hình, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Sự tăng hàm lượng MDA dịch đồng thể tế bào não ở lô đối chứng mô hình so với giá trị này ở lô chứng sinh học chứng tỏ quá trình thiếu máu, tưới máu não để gây ra một stress oxy hoá dẫn đến tổn thương oxy hoá của mô não. Tổn thương oxy hoá đã được biết đến là một yếu tố nguyên nhân quan trọng dẫn đến các điều kiện bệnh lý não, bệnh lý thần kinh khác nhau. Sự hạn chế phản ứng peroxy hoá lipid tế bào não tương ứng với hàm lượng MDA thấp hơn ở các lô chuột có được điều trị dự phòng bằng bài thuốc nghiên cứu là những chứng cứ cho thấy tác dụng

có lợi của bài thuốc trong việc phòng ngừa các tổn thương não do một stress oxy hoá nào đó. Từ bảng 2 ta thấy có sự giảm hoạt độ enzym SOD hồng cầu chuột trong nhóm đối chứng mô hình với mức giảm có ý nghĩa thống kê. Điều này phù hợp với sự tăng MDA ở lô chuột này. Sau thiếu máu cục bộ/ tưới máu lại ở mô não hình thành stress oxy hoá như nói ở trên, có thể là enzym SOD chống gốc tự do của cơ thể đã được huy động để cân bằng lại tình trạng stress oxy hoá nên có sự giảm hoạt độ trong máu toàn bộ. Stress oxy hoá ở lô chuột đã được điều trị dự phòng có khuynh hướng giảm, kèm theo là hoạt độ enzym SOD trong máu toàn bộ ít biến động.

Bài bổ trung ích khí có tác dụng ích khí thăng để được gia thêm các vị bổ huyết như Hà thủ ô, hoạt huyết như Đan

sâm, khu phong trừ thấp như Khương hoạt, Kê huyết đằng đã làm cho bài thuốc có khả năng điều trị hiệu quả đối với những bệnh nhân bị thiếu năng tuần hoàn não kèm theo đau vùng vai gáy. Có lẽ tác dụng antioxidant của bài Bổ trung ích khí gia giảm trong thực nghiệm này đã góp phần làm sáng tỏ phần nào cơ chế tác dụng của bài thuốc Bổ trung ích khí gia giảm trên lâm sàng.

4. KẾT LUẬN:

Sự thiếu máu não, tưới máu lại do gây nghẽn một phần máu lên não gây nên một tổn thương oxy hoá đối với mô não và làm thay đổi hoạt độ enzyme chống oxy hoá. Bài thuốc nghiên cứu có tác dụng hạn chế các tổn thương này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Roberto Maffei Facinos and cs (1996).

Procyanidines from *Vitis vinifera* Seeds protect Rabbit Heart from Ischemia/Reperfusion Injury: Antioxidant Intervention and/or Iron and Copper Sequestering Ability. *Planta Medica* 62, 495 - 502

2. Kim T.K and cs (1998). Kim T.K; Wu W.K.,etal.

Myocardial protective effect of an anthraquinone- containing extract of *polygonum multiflorum* . *Plant Med*; 67 (7): 607 - 611.

3. - Ohtakih and cs (2003).

Suppression of oxidative stress after transient focal ischemia in interleukin - 1 knock out mice. - *Acta Neurochir suppl.* 86:191 - 4

4. Saowance Kajanachumpol and cs (2000).

Levels of plasma lipid peroxide products and antioxidant status in rheumatoid arthritis. Vol 31 No. 2 Jun2 .

5. Hsueh CM and cs (2003).
Ischemia/ reperfusion-induced
changes of hypothalamic-pituitary-
adrenal (HPA) activity is opioid related
in Sprague- Dawley rat.
Neurosci Lett. Oct 9; 349 (3):
155 – 8.

6. Olsson T and cs (2003).
Brain damage in a mouse model of
global cerebral ischemia. Effect of
NMDA receptor blockade
Brain Res. Aug 29; 982(2): 260-9.

Trao đổi kinh nghiệm

TỨ HUYỆT CHÂM ĐIỀU TRỊ BỆNH MẮT TRÊN LÂM SÀNG

Trương Bàn, Khoa Mắt, Bệnh viện Thạch gia trang tỉnh Hà Bắc.

Journal of Traditional Chinese Ophthalmology

August 2004, Volume 14, number 3, p. 138.

Chu Quốc Trường lược dịch.

Điều trị theo kinh nghiệm của Giáo sư
Bàng Tấn Tương dùng 4 huyệt (tứ huyệt).

Chủ huyệt: Thừa khấp, Thái dương,
Toản túc, Phong trì.

Phương pháp: Bình bổ, bình tả, bình
thường không xoay kim.

Châm Thừa khấp: 5 phân đến 1 thốn.

Thái dương: 3 đến 5 phân.

Toản túc: Xuyên từ trên xuống dưới 3-5
phân.

Phong trì: Châm 3 phân đến 1 thốn.

Lưu châm: 30-45 phút, 12 lần châm là 1
liệu trình.

Chỉ định và gia giảm:

- Viêm dây thần kinh hậu nhãn cầu.
- Viêm đáy mắt.
- Viêm dây thần kinh mắt, võng mạc.

- Teo thị thần kinh.

- Giai đoạn đầu đục giác mạc (Bách hội
chương).

Thanh quang nhãn: Nếu sau khi dùng
thuốc hoặc thủ thuật nhãn áp không cao.

Biến đổi sắc tố thị võng mạc: Thêm Túc
tam lý.

Mù chức năng: Gia huyệt Thông lý, các
huyệt này dùng phương pháp kích thích ,
không lưu châm.

Cận thị nặng, đáy mắt có biến đổi, đục
thủy tinh thể gia: Thượng tinh, Bách hội.

Viêm kết mạc, chói, bỏ Thừa khấp,
thêm: Thượng tinh, Bách hội.

Các bệnh mắt khác: Lác do tê liệt bỏ
Toản túc, thêm: Thấu Ty túc không →
Toản túc châm xuyên 1,5 thốn.