

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



MAI THÀNH LONG

NGHIÊN CỨU tác động điều trị nội
m, u n . o

củn bại thuộc “th«ng m¹ch vintong”
tr^an «éng vệt thùc nghiÖm

LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2021

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



MAI THÀNH LONG

NGHIÊN CỨU tác động điều trị nội
m, u n . o

củn bại thuộc “th«ng m¹ch vintong”
tr^an ®éng vệt thùc nghiõm

Chuyên ngành Y học cổ truyền

Mã số: 872 0115

LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

PGS. TS. ĐẬU XUÂN CẢNH

HÀ NỘI – 2021

LỜI CẢM ƠN

Hoàn thành luận văn này, với tất cả lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin được gửi lời cảm ơn đến Đảng ủy, Ban Giám đốc, Phòng đào tạo Sau Đại học, các Bộ môn, Khoa phòng Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, là nơi trực tiếp đào tạo và tận tình giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu để hoàn thành luận văn.

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Đậu Xuân Cảnh, người thầy hướng dẫn luôn theo sát, thường xuyên giúp đỡ, cho tôi nhiều ý kiến quý báu, sát thực trong quá trình học tập, nghiên cứu để hoàn thành luận văn này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám đốc, Bộ môn Dược lý Học viện Quân Y đã quan tâm, tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi trong việc nghiên cứu, thu thập, hoàn thiện số liệu để hoàn thành đề tài.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn đến các thầy, các cô trong Hội đồng thông qua đề cương luận văn đã cho tôi nhiều ý kiến quý báu trong quá trình hoàn thiện luận văn này.

Tôi vô cùng biết ơn gia đình, bạn bè, anh chị em đồng đã động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Mặc dù đã cố gắng rất nhiều, nhưng luận văn không tránh khỏi những thiếu sót; tác giả rất mong nhận được sự thông cảm, chỉ dẫn, giúp đỡ và đóng góp ý kiến của các nhà khoa học, của quý thầy cô, các cán bộ quản lý và các bạn đồng nghiệp.

Xin chân thành cảm ơn!

Học viên

Mai Thành Long

LỜI CAM ĐOAN

Luận văn này do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của Thầy PGS.TS. Đâu Xuân Cảnh. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm hoàn toàn trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày.....tháng.....năm.....

Người viết cam đoan

Mai Thành Long

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Việt	Tiếng Anh
CCA	Động mạch cảnh chung	Common carotid artery
ECA	Động mạch cảnh ngoài	External carotid artery
IgG	Globulin miễn dịch	Immunoglobulin G
IgM	Globulin miễn dịch	Immunoglobulin M
MCA	Động mạch não giữa	Middle cerebral artery
MCAO	Thuyên tắc động mạch não giữa	Middle Cerebral Artery thrombosis
NK	Tế bào diệt tự nhiên	Natural killer cell
WHO	Tổ chức y tế thế giới	World Health Organization

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Đặc điểm sinh lý tuần hoàn não	3
1.1.1. Mức tiêu thụ oxy và glucose của não	3
1.1.2. Lưu lượng tuần hoàn máu não.....	3
1.1.3. Điều hòa lưu lượng máu não	3
1.2. Tổng quan về nhồi máu não	5
1.2.1. Định nghĩa và phân loại nhồi máu não.....	5
1.2.2. Nguyên nhân và các yếu tố nguy cơ gây nhồi máu não	5
1.2.3. Sinh lý bệnh học của thiếu máu não cục bộ	6
1.3. Một số mô hình nhồi máu não.....	11
1.3.1. Thiếu máu não toàn thể	11
1.3.2. Thiếu máu não cục bộ.....	11
1.3.3. Thuyên tắc động mạch não giữa (MCAO - middle cerebral artery)	11
1.4. Tổng quan về Thông mạch Vintong.....	13
1.4.1. Xuất xứ	13
1.4.2. Thành phần	13
1.4.3. Cơ chế tác dụng	13
1.5. Các nghiên cứu về “Thông mạch Vintong”	15
1.5.1. Nghiên cứu độc tính cấp của “Thông mạch Vintong”	15

1.5.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của “Thông mạch Vintong”	16
1.5.3. Đánh giá tác dụng tân tạo mạch máu não chuột sau đột quy của bài thuốc “Thông mạch Vintong”	16
Chương 2 CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	17
2.1. Chất liệu nghiên cứu.....	17
2.2. Đối tượng nghiên cứu.....	18
2.3. Thời gian và địa điểm tiến hành nghiên cứu.....	18
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	18
2.4.1. Thiết kế nghiên cứu.....	18
2.4.2. Chọn mẫu và cỡ mẫu.....	18
2.4.3. Quy trình nghiên cứu.....	19
2.4.4. Chỉ tiêu theo dõi.....	19
2.4.5. Công cụ sử dụng trong nghiên cứu.....	20
2.4.6. Phương pháp tiến hành.....	20
2.4.7. Phương pháp đánh giá kết quả.....	22
2.5. Phương pháp xử lý số liệu.....	26
Chương 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	28
3.1. Kết quả về tác dụng phục hồi chức năng vận động, cảm giác thần kinh trên chuột gây nhồi máu não của bài thuốc “Thông mạch Vintong”	28
3.1.1. Kết quả đánh giá bằng thử nghiệm rotarod	28

3.1.2. Kết quả đánh giá mức độ tổn thương thần kinh theo thang điểm của Li và cộng sự.....	30
3.2. Kết quả đánh giá tác dụng giảm thể tích tổn thương, ảnh hưởng quá trình tái tạo thần kinh và mô liên kết của bài thuốc Thông mạch Vintong.	31
3.2.1. Kết quả đánh giá giảm thể tích tổn thương sau đột quỵ nhồi máu não.....	31
3.2.2. Kết quả đánh giá mô bệnh học tái tạo thần kinh	35
3.3. Kết quả đánh giá mô bệnh học tái tạo mô liên kết Olig2.....	41
Chương 4 BÀN LUẬN	44
4.1. Về mô hình gây nhồi máu não.....	44
4.2. Về tác dụng phục hồi chức năng vận động, cảm giác thần kinh trên chuột gây nhồi máu não của bài thuốc “Thông mạch Vintong”	46
4.2.1. Về kết quả đánh giá bằng thử nghiệm rotarod	46
4.2.2. Về mức độ tổn thương thần kinh theo thang điểm của Li và cộng sự.....	48
4.3. Về kết quả đánh giá tác dụng giảm thể tích tổn thương, ảnh hưởng quá trình tái tạo thần kinh và mô liên kết của bài thuốc “Thông mạch Vintong”	54
KẾT LUẬN.....	57
KIẾN NGHỊ.....	58
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Thành phần bài thuốc Thông mạch Vintong	17
Bảng 2.2. Cho điểm đánh giá mức độ tổn thương thần kinh đối với các test hành vi trên chuột	23
Bảng 3.3. Phần trăm diện tích thiếu máu của não chuột.....	33
Bảng 3.4. Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/Nestin.....	37
Bảng 3.5. Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/DCX.....	40
Bảng 3.6. Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Olig2 ở các lô chuột nghiên cứu	43

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Kết quả thử nghiệm rotarod (n = 8, $\bar{X} \pm SD$).....	28
Biểu đồ 3.2. Ảnh hưởng của bài thuốc Thông mạch Vintong lên mức độ tổn thương thần kinh (vận động, cảm giác, phản xạ) của chuột theo thang điểm Li và cộng sự (n = 8, $\bar{X} \pm SD$)	30

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 1.1. Những cơ chế chính trong sự chết tế bào do nhồi máu não	9
Sơ đồ 1.2. Cơ chế chết tế bào thần kinh khu vực tranh tối tranh sáng	10
Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng của Thông mạch Vintong trên mô hình chuột gây đột quy não	19

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 2.1. Hình ảnh minh họa mô hình gây nhồi máu não	21
Hình 3.1. Hình ảnh tiêu bản não chuột nhuộm HE của chuột nghiên cứu ở các lô	32
Hình 3.2. Hình ảnh tiêu bản não chuột nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép Ki67/Nestin của chuột nghiên cứu ở các lô	35
Hình 3.3. Hình ảnh tiêu bản não chuột nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép Ki67/DCX của chuột nghiên cứu ở các lô.	38
Hình 3.4. Hình ảnh tiêu bản não chuột nhuộm miễn dịch huỳnh quang Olig2 của chuột nghiên cứu ở các lô	41

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhồi máu não là hậu quả của sự giảm đột ngột lưu lượng máu tới não do tắc toàn bộ hay một phần động mạch não. Lâm sàng biểu hiện bằng sự xuất hiện đột ngột các triệu chứng thần kinh khu trú, thường gặp là liệt nửa người. Đây là bệnh lý thần kinh phổ biến trên thế giới và Việt Nam, chiếm 80 – 85% trong tai biến mạch máu não nói chung [13],[17]. Nhồi máu não nói riêng và tai biến mạch máu não nói chung đang không chỉ là vấn đề quan tâm đặc biệt của chuyên ngành thần kinh mà còn trong các chuyên ngành y học trên toàn cầu về tỷ lệ mắc bệnh và hậu quả nghiêm trọng do bệnh gây ra. Theo số liệu thống kê năm 2015 của WHO, tai biến mạch máu não là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trong các bệnh thuộc hệ thần kinh và đứng thứ ba sau bệnh lý tim mạch, ung thư [55], là nguyên nhân gây tàn phế hàng đầu ở người trưởng thành [67]. Chi phí cho công tác điều trị, phòng bệnh, phục hồi chức năng hàng năm ở các nước trên thế giới là rất lớn. Tại Hoa Kỳ năm 2010 là 73,7 tỷ đô la Mỹ; ở Pháp chiếm 2,5-3% tổng kinh phí chi cho y tế [18]. Tại Việt Nam, đột quỵ do nhồi máu não không những là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu mà còn gây tàn phế cho nhiều người, trở thành gánh nặng về kinh tế cho gia đình và xã hội.

Hiện nay, sự phát triển của khoa học kỹ thuật tiên tiến đã đóng góp những thành tựu không nhỏ trong công tác chẩn đoán, hồi sức cấp cứu, phẫu thuật thần kinh, và đặc biệt là can thiệp mạch đã góp phần làm gia tăng hiệu quả điều trị đáng kể [13]. Tuy nhiên, số bệnh nhân có được cơ hội này không nhiều vì yếu tố thời gian và bệnh nhân cần được điều trị tại những trung tâm lớn có trang thiết bị y tế hiện đại. Do đó, hướng điều trị nội khoa cho đến nay vẫn là hướng rất phổ biến. Hiện nay, có rất nhiều thuốc được dùng để điều trị nhồi máu não, nhưng không có thuốc nào có tác dụng đặc trị. Thực tế trên lâm sàng, điều trị nhồi máu não thường phải bao gồm sự kết hợp của rất nhiều loại

thuốc với nhau dẫn đến việc giá thành điều trị nội khoa cho bệnh nhân rất cao và trở thành rào cản, gánh nặng cho bệnh nhân cũng như chính gia đình họ. Vì vậy, việc tiếp tục nghiên cứu và phát triển thuốc có tác dụng điều trị nhồi máu não từ dược liệu an toàn, giá thành rẻ hơn, sử dụng thuận lợi,... là hướng đi rất có triển vọng và cần thiết.

Trong những năm gần đây, xu thế sử dụng thảo dược trong điều trị đang ngày càng trở nên phổ biến, không những chỉ ở các nước Châu Á mà cả khu vực Châu Âu bởi tính an toàn, cơ chế tác dụng đa dạng, đa mục tiêu. Trong đó, thuốc y học cổ truyền đặc biệt là những bào thuốc nghiệm phương đã dần chứng minh được hiệu quả trên những nhóm bệnh lý phức tạp.

“Thông mạch Vintong” là bài thuốc nghiệm phương của Phó giáo sư, tiến sĩ Đặng Xuân Cảnh dựa trên lý luận y học cổ truyền với các thành phần có tác dụng hoạt huyết khứ ứ đã được chứng minh về tác dụng dược lý. Tuy nhiên, sự phối hợp các vị thuốc có đem lại hiệu quả như mong muốn để ứng dụng trên lâm sàng thì cần phải có những nghiên cứu tiền lâm sàng minh chứng. Thuốc đã được thử độc tính cấp và bán trường diễn chứng minh an toàn trên động vật thực nghiệm cho kết quả an toàn. Với mong muốn có cơ sở khoa học chắc chắn khẳng định hiệu quả của bài thuốc trong điều trị nhồi máu não, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài **“Nghiên cứu tác dụng điều trị nhồi máu não của bài thuốc “Thông mạch Vintong” trên động vật thực nghiệm”** với 2 mục tiêu sau:

1. Đánh giá tác dụng phục hồi chức năng vận động, cảm giác thần kinh trên chuột gây nhồi máu não của bài thuốc “Thông mạch Vintong”.

2. Đánh giá tác dụng giảm thể tích tổn thương, ảnh hưởng quá trình tái tạo thần kinh và mô liên kết của bài thuốc “Thông mạch Vintong”.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Đặc điểm sinh lý tuần hoàn não

1.1.1. Mức tiêu thụ oxy và glucose của não

Não tiêu thụ oxy trung bình là 3,3-3,8ml/100g não/phút và glucose trung bình là 5,6mg/100g não/phút. Lượng oxy cũng như glucose não tiêu thụ chiếm 18% tổng nhu cầu của toàn bộ cơ thể. Não không có khả năng dự trữ glycogen do đó rất cần máu tuần hoàn liên tục và ổn định để duy trì sự cung cấp glucose. Năng lượng sử dụng của não tỷ lệ chặt chẽ với mức tiêu thụ glucose, oxy và lưu lượng máu não [11].

1.1.2. Lưu lượng tuần hoàn máu não

Lưu lượng máu qua não ở người lớn trung bình từ 50-60ml/100g não/phút. Tổng lượng máu đi vào não từ 750-900ml/phút hay 15% của lượng máu đi ra từ tim

Lưu lượng máu không thay đổi theo lưu lượng tim với điều kiện huyết áp trung bình trong khoảng 60-150mmHg, tuy nhiên, điều này còn phụ thuộc vào sức cản thành mạch.

1.1.3. Điều hòa lưu lượng máu não

Sự điều hòa lưu lượng máu não thông qua:

- **Cơ chế tự điều hòa (hiệu ứng Bayliss):** Khi tim bóp mạnh đẩy máu lên não nhiều thì các mạch máu nhỏ co lại hạn chế tưới máu; khi máu lên não ít thì mạch máu não giãn ra để chứa máu nhiều hơn và như vậy lưu lượng máu não luôn hằng định.

- **Các yếu tố chuyển hóa, dịch thể:**

+ Lưu lượng máu não tăng cao liên quan đến chuyển hoá của mô. Các mạch máu não rất nhạy cảm với sự thay đổi hóa học trong máu, đặc biệt là

nồng độ khí carbonic (CO_2) và oxy trong máu động mạch, trực tiếp là nồng độ ion H^+ . Sự tăng lên nồng độ CO_2 trong động mạch tưới máu não làm tăng nhiều lưu lượng tưới máu não, tăng lên 70% nồng độ CO_2 trong động mạch làm tăng lưu lượng máu não gần gấp hai lần. Khi áp suất CO_2 giảm gây co mạch làm giảm lưu lượng tuần hoàn máu não. Phân áp ô-xy giảm gây giãn mạch do mô thiếu ô-xy giải phóng chất trung gian gây giãn mạch (adenosin, H^+ , bradykinin...) và tế bào nội mô thiếu năng lượng để duy trì trương lực thành mạch gây giãn mạch thụ động.

+ Thiếu oxy cũng ảnh hưởng đến điều hoà lưu lượng máu não. Ngoại trừ các giai đoạn não hoạt động mạnh, tần suất sử dụng oxy của mô não vẫn trong giới hạn hẹp - chính xác khoảng $3,5 (\pm 0,2)$ ml oxy mỗi 100 gram nhu mô não mỗi phút. Nếu lưu lượng máu đến não giảm thì làm giảm tổng lượng oxy cung cấp, thiếu oxy gây giãn mạch ngay lập tức, giúp lưu lượng máu não và sự vận chuyển oxy đến mô não gần bình thường. Vì vậy, cơ chế điều hoà lưu lượng máu cục bộ này hầu như chính xác tương tự nhau ở não cũng như ở các mạch máu của mạch vành, trong cơ vân, và trong hầu hết các vùng tuần hoàn khác của cơ thể. Cơ chế oxy cho điều hoà cục bộ của lưu lượng máu não là một đáp ứng bảo vệ rất quan trọng chống lại sự giảm hoạt động thần kinh não và, vì thế chống lại rối loạn của chức năng thần kinh [11],[15].

- ***Yếu tố thần kinh:*** Kích thích giao cảm gây co mạch nhẹ các mạch máu lớn nhưng không ảnh hưởng đến các mạch máu nhỏ. Kích thích phó giao cảm gây giãn mạch nhẹ. Như vậy, hệ thần kinh thực vật hầu như không có vai trò gì quan trọng trong điều hoà lưu lượng máu não. Chỉ khi huyết áp động mạch trung bình tăng đến 200mmHg thì hệ giao cảm mới gây ra sự co mạch não, giúp bảo vệ các tiểu động mạch khỏi bị vỡ tung dưới áp lực [11].

1.2. Tổng quan về nhồi máu não

1.2.1. Định nghĩa và phân loại nhồi máu não

Nhồi máu não là quá trình bệnh lý trong đó động mạch não bị hẹp hoặc bị tắc, lưu lượng tuần hoàn tại vùng não do động mạch não đó phân bố bị giảm trầm trọng (thiếu máu não cục bộ), dẫn đến chức năng vùng não đó bị rối loạn [10],[14].

Trên lâm sàng có ba loại nhồi máu não thường gặp là:

- Nhồi máu não lớn: Nhồi máu não lớn khi ổ nhồi máu trên 75% diện tích khu vực cấp máu của động mạch não giữa, động mạch não sau và động mạch não trước hoặc toàn bộ ba khu vực động mạch phối hợp với nhau [29]. Nhồi máu động mạch não giữa gây yếu liệt, bán manh đồng danh, mất cảm giác và tùy thuộc vào bán cầu nhồi máu mà có thể bị ảnh hưởng đến chức năng ngôn ngữ hoặc giảm nhận thức không gian [13],[26].
- Nhồi máu não ổ khuyết: là nhồi máu kích thước nhỏ, với đường kính dưới 15mm. Thường gặp do tắc các nhánh xuyên cấp máu cho các vùng sâu của não.
- Nhồi máu não đường phân thùy hoặc nhồi máu não vùng giáp ranh là tổn thương não ở vùng cấp máu của các nhánh tận của hệ động mạch não. Cơ chế của loại nhồi máu này thường do lưu lượng máu thấp [13],[26].

Phân loại nhồi máu não theo giai đoạn [26] gồm:

- Nhồi máu não cấp tính: Trong tuần đầu sau khởi bệnh.
- Nhồi máu não bán cấp: Tuần thứ hai đến tuần thứ tư.
- Nhồi máu não mạn tính: Sau tuần thứ tư

1.2.2. Nguyên nhân và các yếu tố nguy cơ gây nhồi máu não

1.2.2.1. Nguyên nhân

Có 3 nguyên nhân lớn:

- Huyết khối động mạch não (Thrombosis): là tổn thương thành mạch, làm rối loạn đông máu, gây đông máu và/hoặc tắc động mạch não và xảy ra ngay tại vị trí động mạch bị tổn thương.

- Tắc mạch (Embolsim): cục tắc từ một mạch ở xa (từ tim, từ một mạch lớn vùng cổ) bong ra theo đường tuần hoàn lên não đến chỗ lòng mạch nhỏ hơn sẽ nằm lại đó gây tắc. Những cục tắc có thể đi đến bất kỳ động mạch nào trong não, nhưng chúng thường chặn các động mạch lớn, gây tình trạng nhồi máu nghiêm trọng.

+ Cục tắc từ tim trong các bệnh tim mắc phải như rung nhĩ, nhồi máu cơ tim, bệnh van tim...

+ Đôi khi các cục tắc có thể hình thành trong các động mạch chủ. Bản chất cục tắc là các cục máu đông, mảng xơ vữa hoặc các tổ chức bệnh lý của động mạch bong ra.

- Co thắt mạch (vassocontriction): mạch máu co thắt gây cản trở lưu thông dòng máu [15],[18].

1.2.2.2. Các yếu tố nguy cơ

- Nhóm yếu tố nguy cơ không thay đổi được: tuổi, giới, chủng tộc, địa lý, di truyền.

- Nhóm yếu tố biến đổi được và có thể biến đổi được: phổ biến là tăng huyết áp, rối loạn chuyển hóa lipid, bệnh lý tim mạch, béo phì, đái tháo đường...

- Các yếu tố nguy cơ mới: Nhiều yếu tố nguy cơ mới đang được nghiên cứu như tăng homocystein máu, viêm nhiễm, nhiễm khuẩn, rối loạn hô hấp lúc ngủ. Một vài số liệu cho thấy có sự liên hệ giữa fibrinogen và TBMMN. Gần đây các chỉ điểm sinh học viêm nhiễm như: protein phản ứng C, Lp-PLA2, amyloid A, interleukin-6 và sCAM-1 được xem là những yếu tố tiên lượng độc lập đối với bệnh lý tim mạch [20],[21].

1.2.3. Sinh lý bệnh học của thiếu máu não cục bộ

1.2.3.1. Cơ chế nghẽn mạch

- Cơ chế cục tắc huyết khối. Quá trình tắc mạch xảy ra là cơ chế của tai biến thiếu máu não cấp tính. Các cục tắc có thể xuất phát từ tim ở bệnh nhân rung

nhĩ hay nhồi máu cơ tim, hoặc bất thường van tim, mặt khác cục tắc cũng có thể xuất phát từ những mảng xơ vữa của động mạch cảnh vùng cổ hoặc từ quai động mạch chủ.

Các cục tắc từ động mạch đến động mạch được hình thành từ những mảng xơ vữa có đặc điểm là do sự kết dính của tiểu cầu với fibrin.

Các cục tắc từ tim đến động mạch thường cấu tạo phần lớn là tiểu cầu hoặc fibrin độc lập. Đôi khi cục tắc có thể từ một mảnh u nhầy, mảnh canxi hoá, mỡ hoặc khí. Thông thường các cục tắc theo hướng dòng chảy tới các mạch ngoại vi ở xa, đường kính nhỏ hơn gây tắc như động mạch não giữa, hiếm hơn là động mạch não trước. Trong trường hợp tắc hoàn toàn động mạch cảnh trong đoạn ngoài sọ, cơ chế huyết khối tắc mạch có thể xảy ra mà cục tắc từ mảng xơ vữa ở động mạch cảnh ngoài hoặc động mạch cảnh chung qua động mạch mắt gây tắc động mạch não giữa.

Quá trình huyết khối xảy ra ở những mạch có đường kính lớn ở ngoài sọ hoặc trong sọ thường kết hợp với những bất thường của thành động mạch, nơi đó thúc đẩy hình thành những mảng xơ vữa trong thành động mạch làm hẹp đường kính lòng mạch. Kiểu tổn thương này thường ở chỗ phân chia động mạch cảnh cũng như gốc các nhánh lớn của động mạch não trong sọ và các động mạch đường kính 50 – 400 μ m. Đây chính là nguyên nhân gây huyết khối hoặc cục tắc xa tạo những tổn thương ổ khuyết [11],[47].

- Cơ chế khác gây nghẽn mạch:

Tổn thương tăng huyết áp kiểu thoái hoá mỡ-kính, có thể là nguyên nhân gây nhồi máu não ổ khuyết. Thường xảy ra ở các động mạch đường kính dưới 200 μ m. Các mảng xơ vữa ở vị trí phân chia động mạch trong não có thể tạo những vi cục tắc gây tắc các động mạch phía sau.

Một bất thường khác của động mạch cũng gây cục tắc đó là viêm động mạch hoặc phình động mạch làm hẹp lòng động mạch gây tắc động mạch.

Cơ thất động mạch trong chảy máu màng não cũng có thể dẫn đến thiếu máu não. Con tăng huyết áp, cơn đau nửa đầu cũng có thể gây nên thiếu máu não [11].

1.2.3.2. Cơ chế huyết động học

- Giảm tưới máu cục bộ trong trường hợp hẹp tắc động mạch cảnh trong, đoạn ngoài sọ, gây giảm rõ rệt lưu lượng máu não vùng hạ lưu. Sự rối loạn huyết động này chỉ xảy ra khi hẹp trên 70% có nghĩa đường kính lòng mạch còn lại dưới 2mm.

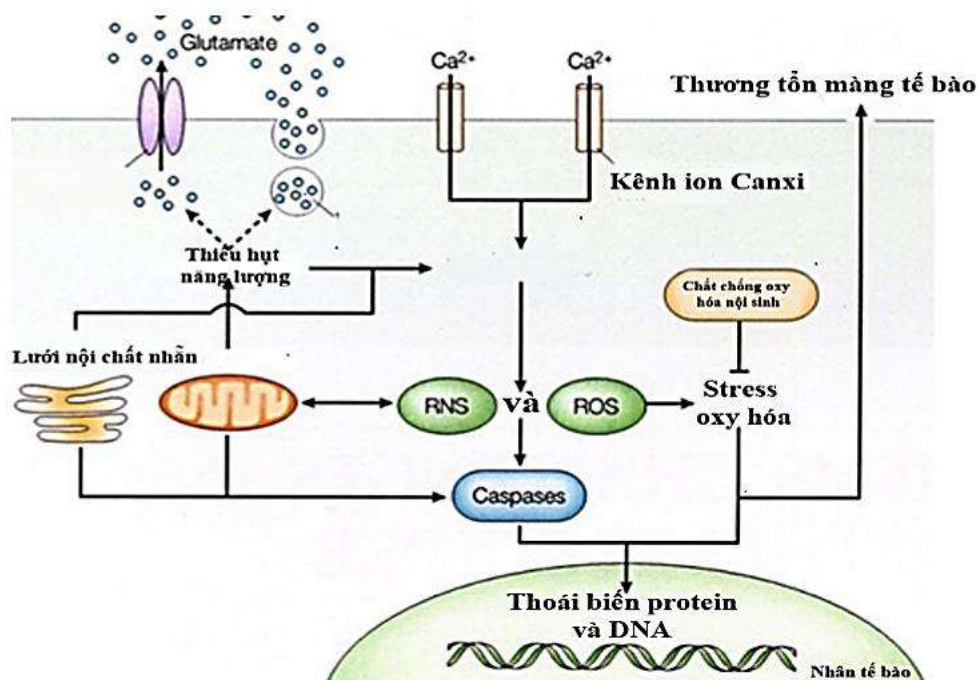
Trong một số trường hợp, nhất là ở người lớn tuổi hoặc người tăng huyết áp những chỗ uốn khúc động mạch cảnh có thể gây giảm lưu lượng máu đến não trong một số tư thế vận động nhất định của đầu và cổ. Sự giảm tưới máu cục bộ còn có thể xảy ra khi có rối loạn dòng chảy trong hoặc ngoài não. Trường hợp này gặp ở vùng quanh dị dạng mạch máu não hoặc u não, cũng như trong hẹp động mạch dưới đòn trước chỗ tách ra của động mạch đốt sống gây nên thiếu máu não từng cơn, gọi là “hội chứng đoạt máu” động mạch dưới đòn.

- Giảm tưới máu toàn bộ

Có những rối loạn của hệ thống tuần hoàn gây giảm huyết áp cấp tính hoặc suy tim nặng hay tình trạng tăng dung tích huyết cầu làm cho áp lực tưới máu não bị giảm, lúc đó lưu lượng máu não sẽ phụ thuộc vào mạng lưới tuần hoàn bàng hệ trong não. Hậu quả của giảm lưu lượng máu não phụ thuộc vào sự hình thành nhanh của dòng máu bù trừ cả về cường độ cũng như thời gian. Nếu giảm huyết áp nhẹ có thể chỉ gây thiếu máu não vùng giáp ranh, trong trường hợp giảm huyết áp nặng hoặc ngừng tuần hoàn có thể gây tổn thương nhu mô não trầm trọng [11], [47].

1.2.3.3. Cơ chế chết của tế bào do nhồi máu

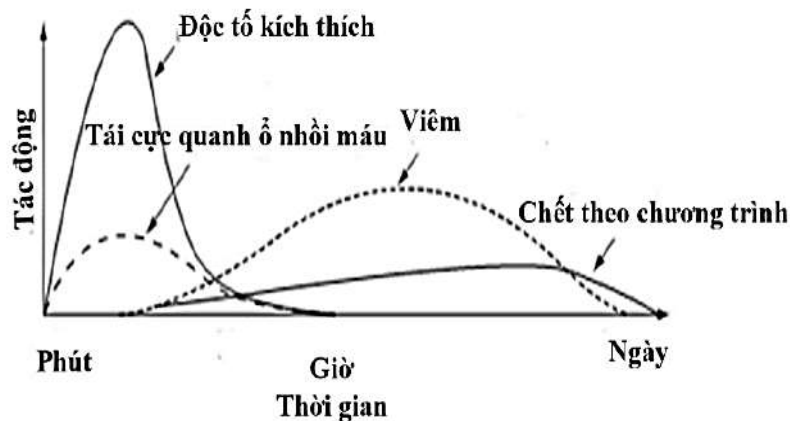
Nhồi máu não làm giảm lưu lượng máu và năng lượng cung cấp cho não, và kích hoạt ít nhất năm cơ chế quan trọng gây ra chết tế bào: kích thích gây độc tế bào và mất cân bằng ion, kích lực (stress) gây oxy-hóa/nitơ-hóa, quá trình viêm, chết theo chương trình, và quá trình khử cực ở vùng cạnh nhồi máu. Có sự tương tác và phối hợp giữa nhiều cơ chế trong tổn thương tế bào và chết tế bào. Khi quá trình nhồi máu não xảy ra, dẫn đến mất sự cung cấp nguồn năng lượng, từ đó dẫn đến sự suy giảm chức năng của ty thể, và hoạt hóa các phân tử oxy và ni-tơ phản ứng [11],[24]. Những quá trình này tiến triển lan rộng qua nhiều giờ hoặc nhiều ngày, gián tiếp gây tổn thương các thần kinh, mô liên kết và mạch máu. Những ảnh hưởng của các quá trình này lên sự tổn thương do nhồi máu được mô tả ở sơ đồ 1.1.



Sơ đồ 1.1. Những cơ chế chính trong sự chết tế bào do nhồi máu não [11]

Ở những khu vực giảm lưu lượng máu trầm trọng, tại vùng trung tâm của khu vực nhồi máu, sự chết tế bào do hoại tử và do kích thích gây độc tế bào xảy ra nhanh trong vòng vài phút và mô não sẽ bị tổn thương không hồi

phục do không được cấp máu. Tuy nhiên, các tế bào ở các vùng ngoại vi được hỗ trợ nhờ các tuần hoàn bàng hệ, cho nên số phận của các tế bào này được quyết định bởi các yếu tố bao gồm mức độ thiếu máu và thời gian tái tưới máu. Ở vùng ngoại vi, được gọi là “vùng tranh tối tranh sáng”, quá trình chết tế bào xảy ra tương đối chậm. Nếu tác động sớm vào các cơ chế bệnh sinh trên được xem là một trong những phương pháp điều trị chính [47].



Sơ đồ 1.2. Cơ chế chết tế bào thần kinh khu vực tranh tối tranh sáng [11]

Các tế bào hình sao bị tổn thương sớm, phù não xuất hiện sớm và đầu tiên. Nghiên cứu siêu cấu trúc hậu quả của thiếu máu cục bộ cấp trên các mẫu thực nghiệm phát hiện các biến đổi quan trọng của lớp nội mô của các mao mạch, có sự ứ đọng glycogen trong tế bào sao và nhất là sự phồng lên của tế bào sao. Hiện tượng này tuy không đặc hiệu nhưng xuất hiện sớm. Sự giảm áp lực oxy làm gián đoạn sự sản xuất ATP và dần dần dẫn đến sự mất K^+ , sự xâm nhập các ion Cl^- và Na^+ vào tế bào sao từ đó gây phù nề mô liên kết. Phù não xuất hiện sớm vào khoảng 3 giờ sau khi nghẽn mạch và tiến tới tối đa trong 24 giờ, tồn tại và lan tỏa quá 72 giờ, làm hư hỏng tế bào sao - là tế bào làm nhiệm vụ trung gian chuyển hóa giữa mao mạch và tế bào thần kinh [11],[47].

1.3. Một số mô hình nhồi máu não

Để hiểu rõ hơn về cơ chế bệnh sinh của nhồi máu não cũng như để tìm ra phương pháp điều trị mới cho thể đột quy này, các nhà nghiên cứu đã xây dựng các mô hình gây đột quy thiếu máu não cục bộ từ nhiều năm nay để hiểu rõ hơn về cơ chế bệnh sinh cũng như để phục vụ cho nghiên cứu và phát triển thuốc mới [57].

Có hai loại thiếu máu não là thiếu máu não toàn thể (global ischemia) và thiếu máu não cục bộ (focal ischemia). Thiếu máu não toàn thể là trạng thái hầu hết hoặc toàn bộ não giảm lưu lượng máu về 0ml/g/phút, chỉ vài phút của thiếu máu não toàn thể có thể gây tổn thương không hồi phục được. Thiếu máu não cục bộ chỉ gây giảm lưu lượng máu và trong khu vực một động mạch não và nhánh của nó [57],[48].

1.3.1. Thiếu máu não toàn thể

- Tắc 2 CCA và hạ huyết áp
- Tắc cả 4 động mạch nuôi não
- Ngừng tuần hoàn [57].

1.3.2. Thiếu máu não cục bộ

- Phẫu thuật sọ não
 - + Tạm thời: phẫu thuật kẹp/tái tưới máu, huyết khối tại chỗ/ly giải [36].
 - + Vĩnh viễn: huyết khối tại chỗ/ly giải
- Không phẫu thuật sọ não
 - + Tạm thời: MCAO/tái tưới máu, huyết khối/ly giải, tắc bởi Endothelin-1
 - + Vĩnh viễn: MCAO, huyết khối, không có huyết khối tắc nghẽn [57].

1.3.3. Thuyên tắc động mạch não giữa (MCAO - middle cerebral artery)

Do đa số các trường hợp đột quy thiếu máu não (khoảng 80%) xảy ra tại vùng não được cung cấp máu bởi động mạch não giữa (middle cerebral artery – MCA) nên có rất nhiều mô hình đột quy được nghiên cứu phát triển tập trung vào động mạch này [36].

Gây tắc động mạch não giữa sử dụng kỹ thuật intraluminal suture là phương pháp được sử dụng phổ biến nhất trong các nghiên cứu về đột quy. Đây là phương pháp gây tắc động mạch não giữa bằng cách đưa sợi dây phẫu thuật từ động mạch cảnh ngoài (external carotid artery – ECA) và đi qua động mạch cảnh trong (internal carotid artery – ICA) cho đến khi đầu sợi dây bắt gặp vòng Willis và bít được gốc của động mạch não giữa (MCA) [56].

Kỹ thuật này có thể được sử dụng để mô phỏng sự tắc nghẽn vĩnh viễn hoặc thoáng qua:

- Mô hình MCAO tạm thời: Sợi chỉ được lấy ra sau một khoảng thời gian nhất định (30 phút, 1 giờ hoặc 2 giờ) và được tái tưới máu
- Mô hình MCAO vĩnh viễn: Sợi chỉ được để lại tại chỗ 24 giờ

Ưu điểm của kỹ thuật này là tạo ra tổn thương lặp lại, mô phỏng được cả thiếu máu cục bộ tạm thời và vĩnh viễn, tái tưới máu được vị trí tổn thương, can thiệp nhanh, thích hợp cho nghiên cứu dài hạn sau khi gây thiếu máu não, không đòi hỏi phải phẫu thuật xâm lấn sọ não, thời gian gây tắc mạch có thể kiểm soát được, sau thời gian gây tắc mạch mong muốn, sợi dây nylon được thu hồi, chuột có khả năng sống sót sau nhiều ngày, nhiều tuần. Tuy nhiên nhược điểm là tỷ lệ tử vong cao do thiếu máu nghiêm trọng [57]. Mô hình gây tắc động mạch não giữa bằng phản ứng quang hóa gây ra bởi sự chiếu tia laser, theo phương pháp của Hiroshi Sugimori và cộng sự (2004) [52],[53] đã khắc phục được nhược điểm này. Đây cũng là mô hình được lựa chọn trong nghiên cứu này của chúng tôi để gây thuyên tắc động mạch não giữa và trên mô hình đó tiến hành các thử nghiệm hành vi và mô học đánh giá tác dụng điều trị đột quy nhồi máu não của Thông mạch Vintong.

1.4. Tổng quan về Thông mạch Vintong

1.4.1. Xuất xứ

Thông mạch Vintong là bài thuốc kinh nghiệm của Phó giáo sư, Tiến sĩ Đậu Xuân Cảnh, được xây dựng dựa trên nền tảng các vị thuốc có tác dụng hoạt huyết, khử ứ, hành khí, giúp làm tiêu cục máu đông, điều trị và dự phòng đột quy nhồi máu não.

1.4.2. Thành phần

Bài thuốc gồm 13 vị thuốc: đinh lăng, cúc hoa, bạch quả, ngư tât, hà thủ ô, sơn tra, tam thất, địa long, thủy điệt, đông trùng hạ thảo, xuyên khung, xích thược, chỉ xác.

1.4.3. Cơ chế tác dụng

1.4.3.1. Tác dụng dược lý theo Y học hiện đại

Đinh lăng có chứa nhiều saponin, có tác dụng tăng sức dẻo dai của cơ thể, kích thích các hoạt động của não bộ [3].

Cúc hoa có tác dụng giải độc, làm sáng mắt [28].

Bạch quả có tác dụng tăng cường trí nhớ [22].

Ngư tât có tác dụng giãn mạch, hạ áp, lợi tiểu [28].

Sơn tra có tác dụng hạ áp, tăng lưu lượng máu mạch vành, giãn mạch [22],[28].

Tam thất có chứa hai loại saponin, một loại saponin Rg có tác dụng hưng phấn trung khu thần kinh, có tác dụng chống mệt mỏi, tăng khả năng lao động trí óc và chân tay và một loại saponin Rb có tác dụng ức chế trung khu thần kinh, biểu hiện an thần và gây ngủ. Bộ phận trên mặt đất của Tam thất (lá, hoa) có nhiều saponin Rb nên có tác dụng ức chế trung khu là chính, bộ phận rễ lại có tác dụng hưng phấn là chủ yếu [28].

Địa long có tác dụng hạ huyết áp và chống co giật, tăng hoạt tính ly giải của fibrin, chống hình thành huyết khối [22].

Thủy điệt có tác dụng chống đông máu [23].

Đông trùng hạ thảo có khả năng tăng cường hoạt động miễn dịch tế bào cũng như miễn dịch dịch thể. Cụ thể là có tác dụng nâng cao hoạt tính của đại thực bào và tế bào NK, điều tiết phản ứng đáp của tế bào lympho B, tăng cường một cách có chọn lọc hoạt tính của tế bào T ức chế, làm tăng nồng độ các kháng thể IgG, IgM trong huyết thanh. Mặt khác, nó còn có tác dụng làm giãn mạch, tăng lưu lượng tuần hoàn não và tim thông qua cơ chế hưng phấn thực thể M ở cơ trơn thành mạch. Mặt khác, điều chỉnh lipid máu, làm giảm cholesterol và lipoprotein, hạn chế quá trình tiến triển của tình trạng xơ vữa động mạch [8].

Xuyên khung có tác dụng làm giãn mạch, tăng lưu lượng máu ở mạch vành, cải thiện tình trạng thiếu oxy cơ tim. Thuốc làm giãn mạch ngoại vi và hạ áp, ức chế sự ngưng tập của tiểu cầu và sự hình thành máu cục, làm tăng lưu lượng máu não, giảm phù não, do đó có tác dụng phòng thiếu máu não và chứng đau nửa đầu. Thuốc có tác dụng an thần rõ rệt: dùng nước sắc xuyên khung thụt vào bao tử chuột nhắt và chuột cống đều có thể làm cho chuột giảm hoạt động tự phát, làm tăng tác dụng gây ngủ của loại thuốc ngủ natri barbital và tác dụng đối kháng với cafein hưng phấn trung khu thần kinh [8].

Xích thược có tác dụng làm giãn động mạch vành, chống ngưng tập tiểu cầu, chống hình thành huyết khối, làm tăng lưu lượng máu cho động mạch vành, chống thiếu máu cơ tim trên thực nghiệm [8].

1.4.3.2. Phôi ngũ lập phương theo y học cổ truyền

Đinh lăng có vị ngọt, hơi đắng, tính mát, có tác dụng thông huyết mạch, bồi bổ khí huyết [28].

Ngưu tất vị đắng, chua, bình, quy kinh Can Thận, có tác dụng hoạt huyết khu ứ, bổ can thận dưỡng gân cốt [27].

Sơn tra vị chua ngọt, tính hơi ôn, quy kinh Tỳ Vị Can có tác dụng hoạt huyết tán ú [8].

Hà thủ ô vị đắng, ngọt, sáp, hơi ôn, quy kinh Can thận, có tác dụng bổ ích tinh huyết [27].

Tam thất vị ngọt hơi đắng, ôn, quy kinh Can, Vị, có tác dụng hoạt huyết định thống [4].

Địa long vị mặn tính hàn, quy kinh Can tỳ bàng quang, có tác dụng thanh nhiệt tức phong, phá huyết [28].

Thủy điệt vị mặn đắng tính bình, có độc ít, vào kinh Can, có tác dụng phá huyết trực ú [28].

Xuyên khung vị cay tính ôn, quy kinh Can Đờm, Tâm bào. Thuốc có tác dụng hoạt huyết hành khí [3].

Xích thực vị chua đắng, tính hơi hàn qui kinh can tỳ, có tác dụng lương huyết, hoạt huyết [23].

Cúc hoa vị ngọt đắng, tính hơi hàn, quy kinh Phế Can Thận có tác dụng hạ áp, làm sáng mắt, thanh nhiệt [19].

Chỉ xác vị chua, tính hàn, quy kinh Phế vị, có tác dụng phá khí hành đàm, giải độc trừ phong [27].

Bạch quả vị ngọt, đắng, chát, bình, quy kinh Phế Thận, có tác dụng trừ đàm, giáng nghịch, điều trị chứng vầng đầu, ù tai [3].

1.5. Các nghiên cứu về “Thông mạch Vintong”

1.5.1. Nghiên cứu độc tính cấp của “Thông mạch Vintong”

Chưa tìm thấy LD₅₀ của “Thông mạch Vintong” theo đường uống trên chuột nhắt trắng với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống (270g dược liệu/kg cân nặng) trong vòng 24 giờ (phụ lục).

1.5.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của “Thông mạch Vintong”

Trên chuột cống trắng dùng “Thông mạch Vintong” liều 15,12g được liệu/kg/ngày và liều 45,36g được liệu/kg/ngày trong 90 ngày liên tục không phát hiện các bất thường trên chuột thực nghiệm (chuột khỏe mạnh, tăng trọng đều, không làm thay đổi các chỉ số huyết học, sinh hóa, không gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận (phụ lục).

1.5.3. Đánh giá tác dụng tân tạo mạch máu não chuột sau đột quy của bài thuốc “Thông mạch Vintong”

Dịch chiết nước bài thuốc “Thông mạch Vintong” liều 25,92g/kg/24h và liều 51,84g/kg/24h có tác dụng tăng tân tạo mạch máu não trên mô hình gây nhồi máu não ở chuột nhắt trắng (phụ lục).

Chương 2

CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chất liệu nghiên cứu

Chất liệu nghiên cứu là bài thuốc Thông mạch Vintong, thành phần gồm các vị thuốc:

Bảng 2.1. Thành phần bài thuốc Thông mạch Vintong

Tên vị thuốc	Tên khoa học [6]	Hàm lượng (g)
Đình lăng	<i>Radix Codonopsis</i>	10
Ngưu tất	<i>Achyranthes bidentata</i>	15
Hà thủ ô	<i>Radix Fallopiae multiflorae</i>	10
Sơn tra	<i>Crataegus pinnatifida Bunge</i>	15
Tam thất	<i>Radix Panasus notoginseng</i>	02
Địa long	<i>Lumbricus</i>	05
Thủy điệt	<i>Whimania pigra</i>	05
Đông trùng hạ thảo	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	01
Xuyên khung	<i>Rhizoma Ligustici wallichii</i>	05
Xích thược	<i>Radix Paeonice Rubra</i>	15
Chỉ xác	<i>Fructus Citri Aurantii</i>	05
Cúc hoa	<i>Flos Chrysanthemi Morifolii</i>	10
Bạch quả	<i>Ginkgo biloba</i>	10

Tất cả các vị thuốc trong bài thuốc đều đạt tiêu chuẩn trong Dược điển Việt Nam V . Thuốc được chiết với dung môi là nước, bằng máy sắc thuốc tự động tại Khoa Dược Bệnh viện Tuệ Tĩnh. Dịch chiết thu được sau khi sắc có tỷ lệ 1:1 (100ml dịch chiết tương đương 100g dược liệu).

Từ dịch chiết 1:1 thuốc được cô đặc theo tỷ lệ thích hợp để cho chuột uống. Thuốc được cho chuột uống qua kim cong đầu tù chuyên dụng. Liều dùng của

thuốc được tính theo gam dược liệu. Tổng bài thuốc là 108g, được sử dụng trên người mỗi ngày 1 thang (108g). Như vậy liều dùng trên người là $108\text{g}/50\text{kg}/24\text{h} = 2,16\text{g}/\text{kg}/24\text{h}$. Quy đổi ra liều trên chuột nhắt trắng (hệ số quy đổi là 12) thì liều dự kiến trên chuột nhắt trắng là $25,92\text{g}/\text{kg}/24\text{h}$.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, giống đực, khoẻ mạnh, trọng lượng 18 – 22g do Ban chăn nuôi – Học viện Quân Y cung cấp.

Tất cả động vật thực nghiệm đều được nuôi dưỡng trong điều kiện phòng thí nghiệm ít nhất 1 tuần trước khi làm thí nghiệm, ăn thức ăn theo tiêu chuẩn thức ăn cho động vật nghiên cứu, nước (đun sôi để nguội) uống tự do.

2.3. Thời gian và địa điểm tiến hành nghiên cứu

Nghiên cứu dự kiến được tiến hành trong thời gian từ tháng 01/2020 đến tháng 12/2020 tại Học viện Quân Y.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

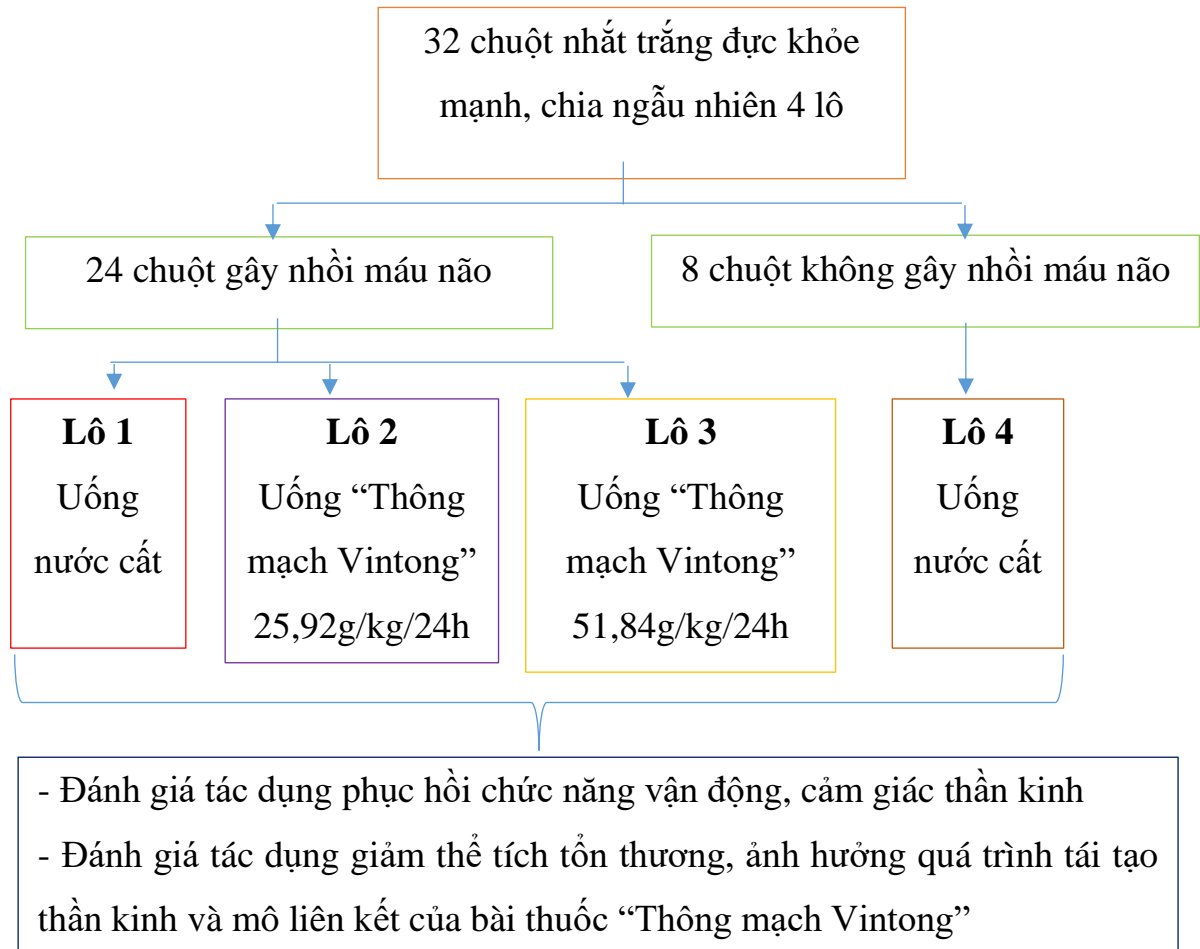
2.4.1. Thiết kế nghiên cứu

Tiến hành gây nhồi máu não tại động mạch não của chuột nhắt trắng bằng phản ứng quang hóa gây bởi sự chiếu tia laser, theo phương pháp của Hiroshi Sugimori và cộng sự (2004) [52],[53].

2.4.2. Chọn mẫu và cỡ mẫu

Chuột nhắt trắng 32 con, được chia làm 4 lô, mỗi lô 8 con. Trong số này có 24 con phẫu thuật gây nhồi máu não và 8 chuột phẫu thuật nhưng không nhồi máu não, được uống nước cất hoặc thuốc nghiên cứu với mức liều khác nhau.

2.4.3. Quy trình nghiên cứu



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng của Thông mạch Vintonong trên mô hình chuột gây đột quỵ não

2.4.4. Chỉ tiêu theo dõi

Vào các ngày 1, 3, 7, 14 và 28 sau phẫu thuật đánh giá:

- Tổn thương thần kinh qua test hành vi, cho điểm đánh giá về mức độ tổn thương thần kinh, theo phương pháp cho điểm được mô tả bởi Li và cộng sự (2000) [46].

- Tổn thương cảm giác vận động thông qua thử nghiệm rotarod.

Khi kết thúc thí nghiệm, mổ chuột đánh giá:

- Kích thước não tổn thương, thông qua nhuộm HE vùng trung tâm của não trước (the center of the forebrain).

- Mô bệnh học tái tạo thần kinh và mô liên kết thông qua nhuộm hoá mô miễn dịch vùng quanh nhồi máu thể vân và vỏ não.

2.4.5. Công cụ sử dụng trong nghiên cứu

- Kính hiển vi phẫu thuật;
- Kính hiển vi đọc tiêu bản nhuộm huỳnh quang (BX51; Olympus, Nhật Bản) và laser diode 488nm và một laser diode 543nm được sử dụng để phát hiện.
- Kính hiển vi đồng tiêu quét lazer (Olympus FV1000, Tokyo, Nhật Bản)
- Thiết bị chiếu laser.
- Máy cắt bệnh phẩm lạnh.
- Máy cắt tiêu bản đúc paraffin.
- Máy đúc khối parafin.
- Bể nhuộm, khuôn nhựa, phiến kính, lá kính, giá đựng tiêu bản..
- Cân phân tích, độ chính xác 10^{-4} g (Sartorius).
- Bộ dụng cụ mổ động vật cỡ nhỏ, kim cho chuột uống, chỉ phẫu thuật 6.0 và các dụng cụ thí nghiệm khác.
- Hồng bengal (Rose bengal dye) của Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan).
- Các hóa chất nhuộm HE: ethanol, xylen, Hematoxylin, Eosin
- Các hoá chất nhuộm hoá mô miễn dịch: rabbit anti-Ki67 (1:200; Abcam, Cambridge, CA, USA), guinea pig anti-DCX (1:1000; Millipore, Bedford, MA, USA), mouse anti-Nestin (1:200; Millipore), Alexa Fluor 555/488 mouse anti-rabbit IgG, rabbit anti-Olig2 (1:400; Millipore, Ab9610), fetal bovine serum, Triton X-100 (Sigma).

2.4.6. Phương pháp tiến hành

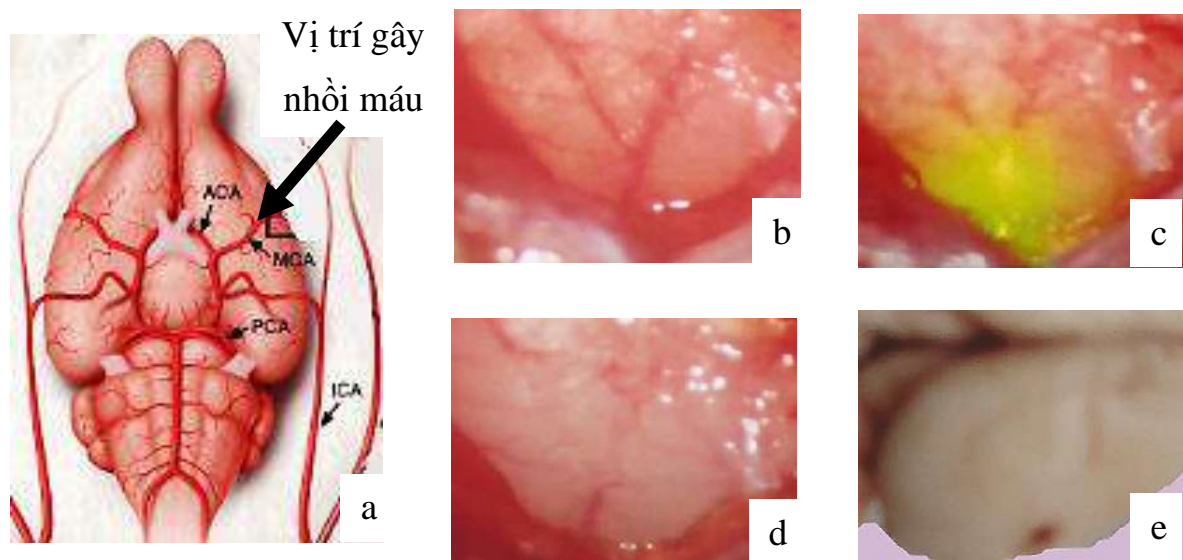
Phẫu thuật gây đột quỵ nhồi máu não trên chuột

Chuột nhắt trắng được gây mê bởi Nembutal đường phúc mạc với liều 40mg/kg thể trọng. Bộc lộ động mạch cảnh chung bên phải bằng một đường

rạch vùng cổ, đặt chỉ chờ tại động mạch này. Sau đó, thực hiện đường rạch giữa tai phải và mắt phải, bộ lộ vùng xương sọ và cơ thái dương bên phải. Cơ thái dương được tách ra khỏi xương thái dương và đẩy xuống dưới bằng bông tẩm nước muối, cho tới khi động mạch não giữa được bộc lộ [59].

Tiến hành chiếu tia laser vào vị trí của động mạch não giữa bên phải đã được bộc lộ, đồng thời tiêm chất nhạy cảm ánh sáng hồng bengal (20mg/kg), tiêm chậm qua tĩnh mạch đuôi trong thời gian 90 giây. Sau 4 phút chiếu tia laser, dịch vị trí chiếu tia tới một điểm khác trên động mạch não giữa bên phải, gần với điểm chiếu ban đầu và tiếp tục chiếu lần 2 trong thời gian 4 phút. Sau khi chiếu lần 2, tiến hành thắt động mạch cảnh chung bên phải, đưa cơ thái dương phải về vị trí ban đầu, khâu da vùng mổ lại.

Chuột được cho uống thuốc hoặc nước cất hàng ngày qua kim cong đầu tù, bắt đầu sau khi gây đột quỵ một ngày cho đến hết 28 ngày sau gây đột quỵ.



Hình 2.1. Hình ảnh minh họa mô hình gây nhồi máu não

- a. Hệ thống mạch máu não nhìn từ dưới lên và vị trí gây nhồi máu;*
b. Động mạch não giữa nhìn qua sọ chuột vùng bộc lộ;

c. Chiếu tia laser vào động mạch não giữa qua hộp sọ;

d. Sau khi chiếu laser, sự tắc mạch tạo ra một vùng trắng không có mạch máu xung quanh điểm chiếu;

e. Hình ảnh nhồi máu não tại động mạch não giữa.

Phẫu thuật không gây đột quy nhồi máu não trên chuột (sham surgery)

Chuột được phẫu thuật giống như phẫu thuật gây nhồi máu (bộc lộ động mạch não giữa, bộc lộ động mạch cảnh chung) nhưng không gây cục máu đông (không chiếu tia laser).

Chuột được cho uống thuốc hoặc nước cất hàng ngày qua kim cong đầu tù, bắt đầu sau khi phẫu thuật một ngày cho đến hết 28 ngày sau phẫu thuật.

Phân lô chuột nghiên cứu và cho uống thuốc

- Lô chứng phẫu thuật (n=8): phẫu thuật không gây nhồi máu + uống nước cất.

- Lô chứng nhồi máu (n=8): phẫu thuật gây nhồi máu + uống nước cất.

- Lô trị 1 (n=8): phẫu thuật gây nhồi máu + uống “Thông mạch Vintong” liều 25,92g/kg/24h.

- Lô trị 2 (n=8): phẫu thuật gây nhồi máu + uống “Thông mạch Vintong” liều 51,84 g/kg/24h.

2.4.7. Phương pháp đánh giá kết quả

2.4.7.1. Đánh giá mức độ tổn thương ở các lô chuột tại các thời điểm sau đột quy

Mức độ tổn thương ở các lô chuột tại các thời điểm sau đột quy được đánh giá dựa trên điểm số đánh giá tổn thương thần kinh (neurologic severity scores) - đánh giá bằng các test hành vi và mức độ tổn thương cảm giác vận động (sensorimotor deficits) đánh giá bằng thử nghiệm rotarod.

Thử nghiệm Rotarod

Thử nghiệm rotarod được tiến hành trên chuột vào 3 ngày liên tiếp trước khi gây đột quy, và các ngày 1, 3, 7, 14 và 28 sau khi gây đột quy.

Chuột được đặt lên trục quay (rotarod) với tốc độ tăng tốc từ 4 đến 40 vòng/phút trong vòng 5 phút. Thời gian chuột ở trên trục quay đến khi rơi xuống được tự động ghi lại. Mỗi chuột được thử nghiệm 3 lần trong một ngày, thời gian nghỉ giữa các lần thử là 15 phút. Lấy giá trị trung bình để so sánh.

Chỉ tiêu nghiên cứu: khả năng vận động, cảm giác thần kinh của chuột sau khi gây nhồi máu não.

Cho điểm đánh giá tổn thương thần kinh thông qua các test hành vi

Vào các ngày 1, 3, 7, 14 và 28 sau khi gây đột quỵ, chuột được thực hiện các test hành vi để cho điểm đánh giá về mức độ tổn thương thần kinh, theo phương pháp cho điểm được mô tả bởi Li và cộng sự (2000) [46].

Bảng 2.2. Cho điểm đánh giá mức độ tổn thương thần kinh đối với các test hành vi trên chuột [46]

Test hành vi	Điểm
1. Test vận động	
<i>Đánh giá liệt nửa người</i>	
<i>+ Nâng chuột bằng đuôi (cho điểm khi chuột không thực hiện được)</i>	
Uốn cong chân trước	1
Uốn cong chân sau	1
Đầu di chuyển hơn 10° đến trục thẳng đứng trong vòng 30 giây	1
<i>+ Đặt chuột trên sàn nhà, cho điểm khi có các biểu hiện:</i>	
Không có khả năng đi thẳng	1
Vòng tròn về phía bên liệt (paretic)	1
Rơi xuống bên liệt (paretic)	1
<i>Vận động bất thường (cho điểm khi có vận động bất thường)</i>	
Bất động và nhìn chăm chăm	1
Run (tremor) (như chó lắc khi bị ướt)	1

Loạn trương lực cơ (Myodystony), dễ bị kích thích (irritability), co giật kiểu động kinh (seizures), Giật rung cơ (myoclonus)	1
2. Test cảm giác	
<i>Test đặt chân để phát hiện cảm giác bề mặt và thị giác (Visual and tactile placing)</i>	
Di chuyển chuột theo hướng ngang về phía bàn, cho điểm khi chuột với chân tới bàn chạm hoặc không thể đặt chân chút nào	1
<i>Test đánh giá cảm giác sâu (Proprioceptive test)</i>	
Đẩy bàn chân vào cạnh bàn để kích thích cơ chân, cho điểm khi chuột mất sức đề kháng	1
3. Đánh giá phản xạ (cho điểm khi mất phản xạ)	
Phản xạ Pinna (lắc đầu khi chạm vào ống tai)	1
Phản xạ giác mạc (nháy mắt khi chạm nhẹ vào giác mạc bằng bông)	1
Phản xạ giật mình (đáp ứng vận động với tiếng động lớn ngắn khi đập kẹp giấy)	1

2.4.7.2. Đánh giá kích thước vùng thương tổn sau đột quy ở các lô chuột

Vào ngày cuối cùng của thí nghiệm, chuột được giết, lấy não nhuộm HE để đánh giá thể tích thương tổn. Chuột được gây mê sâu bằng Nembutal, tiêm phúc mạc 80 mg/kg thể trọng. Bộc lộ tim và truyền vào tâm thất trái dung dịch 0,01 M phosphate-buffered saline để làm sạch máu trong hệ tuần hoàn, sau đó truyền paraformaldehyde 4% để cố định. Sau đó lấy não ra, ngâm não trong dung dịch formalin 4%. Phần não nhuộm HE (vùng trung tâm của não trước) được đưa đi đúc paraffin. Các lát cắt 8 μ m ở trung tâm của não trước được sử dụng để nhuộm HE. Sử dụng các lát cắt nhuộm H & E thu được từ cùng một vùng não (trung tâm của não trước - the center of the forebrain) của mỗi con vật để xác định kích thước của “vùng thiếu máu cục bộ”, giới hạn bởi biên giới của vùng thiếu máu sau đột quy, được phân tích bằng phần mềm Image J.

Chỉ tiêu nghiên cứu: thể tích tổn thương sau đột quỵ của chuột (được đánh giá bằng tình trạng thiếu máu vùng tổn thương)

Phần trăm diện tích thiếu máu được tính toán theo công thức:

$$\% \text{ diện tích thiếu máu} = \frac{\text{Diện tích}_{\text{bán cầu lành}} - \text{Diện tích}_{\text{vùng lành của bán cầu tổn thương}}}{\text{Diện tích}_{\text{bán cầu lành}} \times 2}$$

2.4.7.3. Đánh giá mô bệnh học tái tạo thần kinh

Đánh giá mô bệnh học tái tạo thần kinh thông qua các biểu hiện Nestin, Ki67, Dcx. Nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép được thực hiện để làm cho nhìn thấy được Ki67, doublecortin (DCX), Nestin. Các lát cắt (ở thể vân bên não gây nhồi máu) đầu tiên được xử lý trước trong 5 phút với dung dịch citrate buffer (0,01 mol/L, pH 6,0) để thu hồi kháng nguyên, tiếp theo xử lý với 5% normal goat serum trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các lát cắt được ủ qua đêm ở 40C với hỗn hợp rabbit anti-Ki67 (1:200; Abcam, Cambridge, CA, USA) và guinea pig anti-DCX (1:1000; Millipore, Bedford, MA, USA) hoặc với mouse anti-Nestin (1:200; Millipore). Sau khi rửa ba lần trong phosphate-buffered saline (PBS) trong 5 phút mỗi lần, các lát cắt được ủ trong 1 giờ ở 370C với một kháng thể thứ cấp: Alexa Fluor 555/488 mouse anti-rabbit IgG (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Sau khi rửa, các lát cắt được gắn vào môi trường gắn huỳnh quang (Fluoroshield with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Sigma). Các tín hiệu huỳnh quang được kiểm tra dưới kính hiển vi (BX51; Olympus, Nhật Bản) và laser diode 488nm và một laser diode 543nm được sử dụng để phát hiện.

Chỉ tiêu nghiên cứu: hình ảnh mô bệnh học thần kinh

Phương pháp đánh giá: Tất cả các hình ảnh mô học được chụp ở cùng một mức phơi sáng và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích hình ảnh Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/DCX/Nestin trong vùng quanh nhồi máu thể vân được đếm trong năm trường không chồng chéo (425 μm \times 320 μm) dưới độ phóng đại 400 lần và được trình bày dưới dạng số tế bào

trung bình trên mỗi phần. Số lượng tế bào cuối cùng được tính cho mỗi dấu hiệu miễn dịch huỳnh quang ở mỗi con chuột là giá trị trung bình của số lượng tế bào trung bình trên mỗi trường trên tất cả các phần.

2.4.7.4. Đánh giá mô bệnh học tái tạo mô liên kết

Nhuộm hóa mô miễn dịch để đánh giá mô bệnh học tái tạo mô liên kết thông qua đánh giá biểu hiện Olig2. Để nhuộm hóa mô miễn dịch, một bước khóa (blocking step) được thực hiện trong 1h ở nhiệt độ phòng trong dung dịch fetal bovine serum 2% và Triton X-100 0.1% trong PBS 0.1 M. Kháng thể 1 (primary antibodies) được sử dụng là rabbit anti-Olig2 (1:400; Millipore, Ab9610). Các lát cắt não được ủ qua đêm 4°C với kháng thể 1 trong dung dịch khóa (blocking solution). Ngày hôm sau, các lát cắt được rửa 3 lần trong PBS 0,1 M (rửa 5, 10 và 15 phút ở nhiệt độ phòng) và ủ với kháng thể 2 phù hợp (1:400 trong PBS 0,1 M trong 1h ở nhiệt độ phòng). Các lát cắt sau đó được rửa 3 lần trong PBS 0,1 M (rửa 5, 10 và 15 phút ở nhiệt độ phòng).

Chỉ tiêu nghiên cứu: mô bệnh học tái tạo mô liên kết

Phương pháp đánh giá: cường độ tín hiệu huỳnh quang miễn dịch Olig2 được đánh giá từ các phần vỏ não 30 μ m (bregma 0,36 mm, 3 phần trên mỗi con chuột, n = 8 mỗi lô). Hình ảnh của vùng quan tâm ở vỏ não được chụp bằng kính hiển vi đồng tiêu quét laze (Olympus FV1000, Tokyo, Nhật Bản) với vật kính 10X. Vùng quan tâm được chọn để đánh giá là vùng quanh nhồi máu ở vỏ não. Số lượng tế bào dương tính với Olig2 được đếm và tính trung bình trên một đơn vị diện tích, sử dụng phần mềm Image J.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

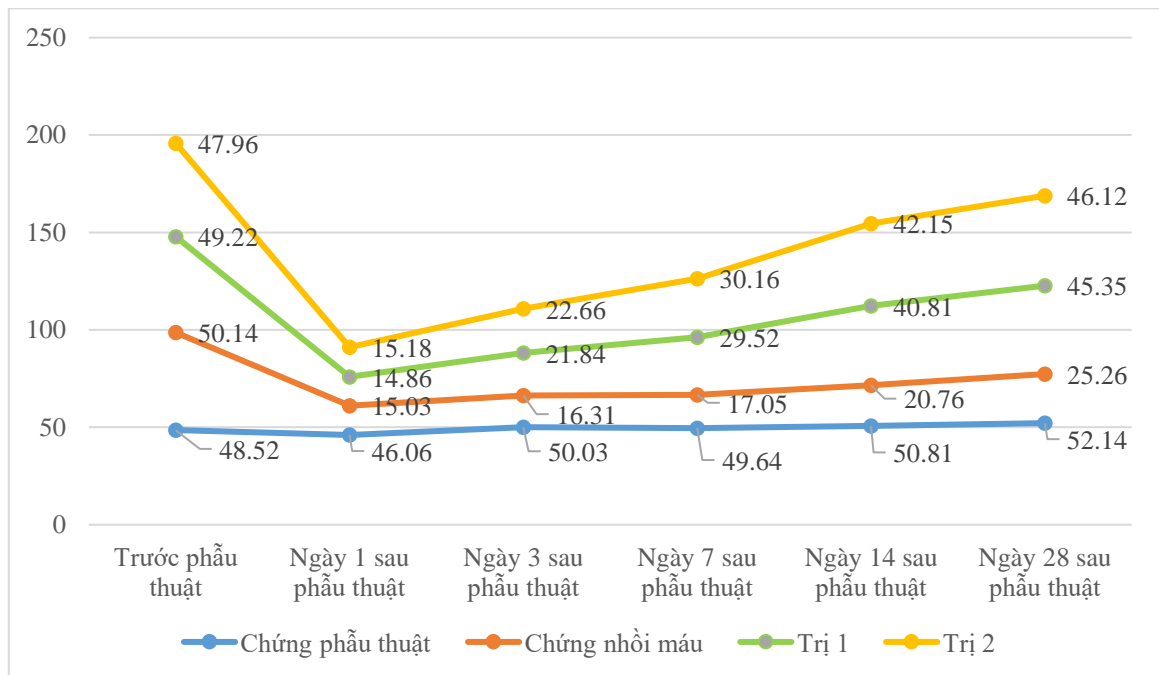
Các số liệu được trình bày dưới dạng Mean \pm SD. So sánh thống kê bằng test T-student, sử dụng phần mềm SPSS 16.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi p < 0,05.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả về tác dụng phục hồi chức năng vận động, cảm giác thần kinh trên chuột gây nhồi máu não của bài thuốc “Thông mạch Vintong”

3.1.1. Kết quả đánh giá bằng thử nghiệm rotarod



Biểu đồ 3.1. Kết quả thử nghiệm rotarod (n = 8, $\bar{X} \pm SD$)

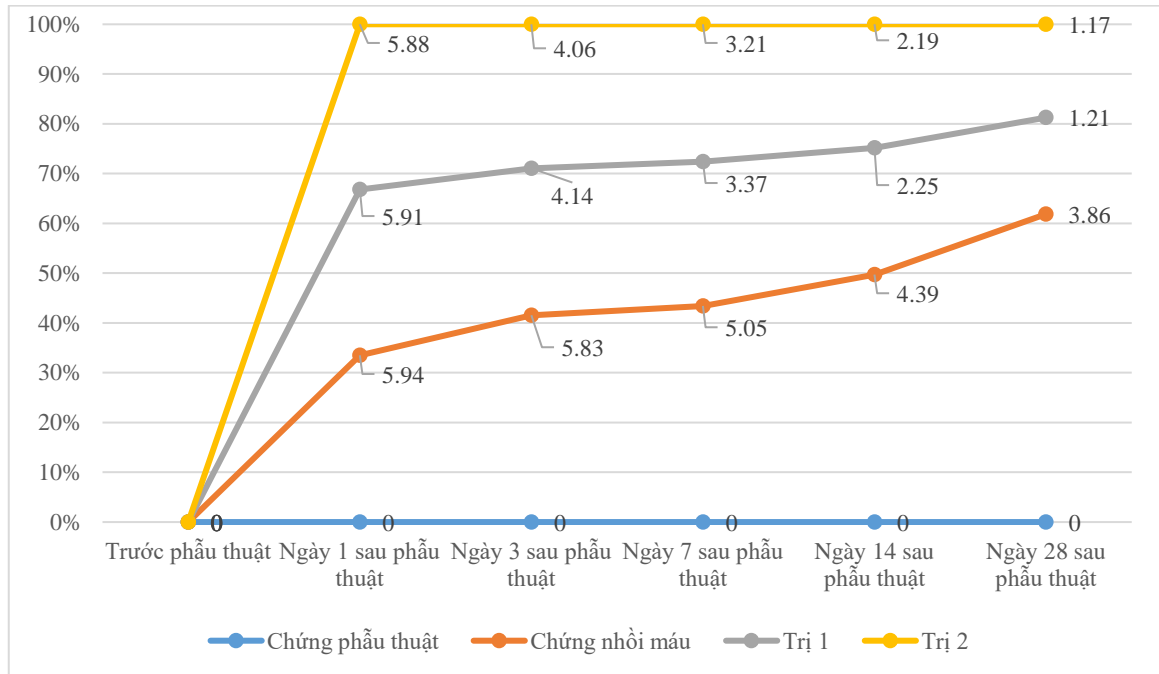
Nhận xét:

- Tại thời điểm trước phẫu thuật, thời gian chuột trên trục quay ở các lô chuột là như nhau ($p > 0,05$).
- Ngày 1 sau phẫu thuật gây nhồi máu, thời gian chuột trên trục quay ở các lô gây nhồi máu giảm rõ rệt so với lô chứng phẫu thuật (không gây nhồi máu), với $p < 0,001$. Thời gian chuột trên trục quay ở các lô gây nhồi máu (lô 2, 3, 4) tại thời điểm ngày 1 sau phẫu thuật (trước uống thuốc) là như nhau ($p > 0,05$).
- Tại thời điểm ngày thứ 3 và ngày thứ 7 sau nhồi máu (sau uống thuốc 2 và 6 ngày), thời gian chuột trên trục quay ở các lô trị 1 và trị 2 (gây nhồi máu và

uống thông mạch Vintong) lớn hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng nhồi máu (gây nhồi máu và uống nước cất), với $p < 0,01$. Lô trị 2 uống thông mạch Vintong liều cao có thời gian chuột trên trục quay lâu hơn so với ở lô trị 1 uống thông mạch Vintong liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Tại thời điểm ngày thứ 14 và ngày thứ 28 sau nhồi máu (sau uống thuốc 13 và 27 ngày), thời gian chuột trên trục quay ở các lô trị 1 và trị 2 (gây nhồi máu và uống thông mạch Vintong) lớn hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng nhồi máu (gây nhồi máu và uống nước cất), với $p < 0,001$. Thời gian chuột trên trục quay ở lô trị 1 và trị 2 lâu hơn, khác biệt ít hơn so với ở lô chứng phẫu thuật không gây nhồi máu ($p < 0,05$). Lô trị 2 uống thông mạch Vintong liều cao có thời gian chuột trên trục quay lâu hơn so với ở lô trị 1 uống thông mạch Vintong liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.1.2. Kết quả đánh giá mức độ tổn thương thần kinh theo thang điểm của Li và cộng sự



Biểu đồ 3.2. Ảnh hưởng của bài thuốc Thông mạch Vintong lên mức độ tổn thương thần kinh (vận động, cảm giác, phản xạ) của chuột theo thang điểm Li và cộng sự (n = 8, $\bar{X} \pm SD$)

Nhận xét:

- Tại thời điểm trước phẫu thuật, tất cả các chuột nghiên cứu đều không có tổn thương thần kinh, điểm đánh giá tổn thương thần kinh (vận động, cảm giác, phản xạ) theo thang điểm của Li và cộng sự đều bằng 0.
- Ở lô chứng phẫu thuật, các chuột không có tổn thương thần kinh, điểm đánh giá tổn thương thần kinh (vận động, cảm giác, phản xạ) theo thang điểm của Li và cộng sự đều bằng 0.
- Tại thời điểm 1 ngày sau phẫu thuật, chuột ở các lô gây nhồi máu não (lô 2, 3, 4) đều có tổn thương thần kinh, với điểm đánh giá tổn thương thần kinh (vận động, cảm giác, phản xạ) theo thang điểm của Li và cộng sự lần lượt là $5,94 \pm 0,62$; $5,91 \pm 1,01$; và $5,98 \pm 0,93$. So sánh giữa 3 lô 2, 3, 4 về điểm

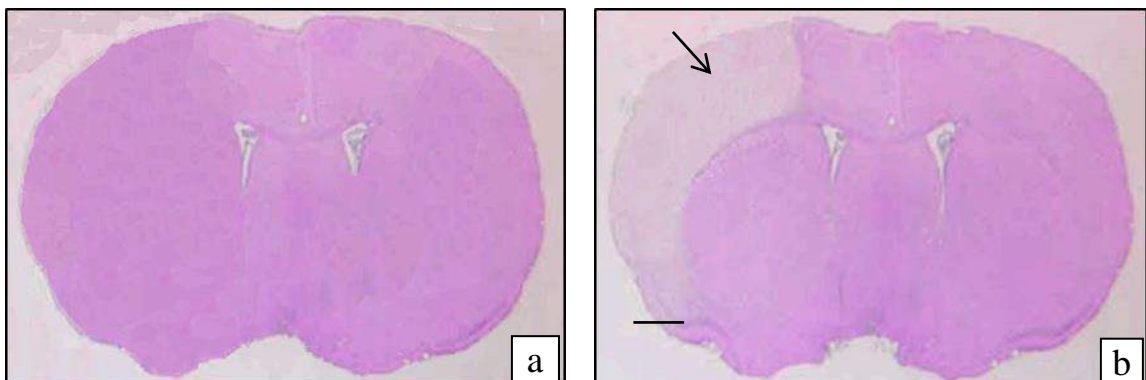
đánh giá tổn thương thần kinh, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

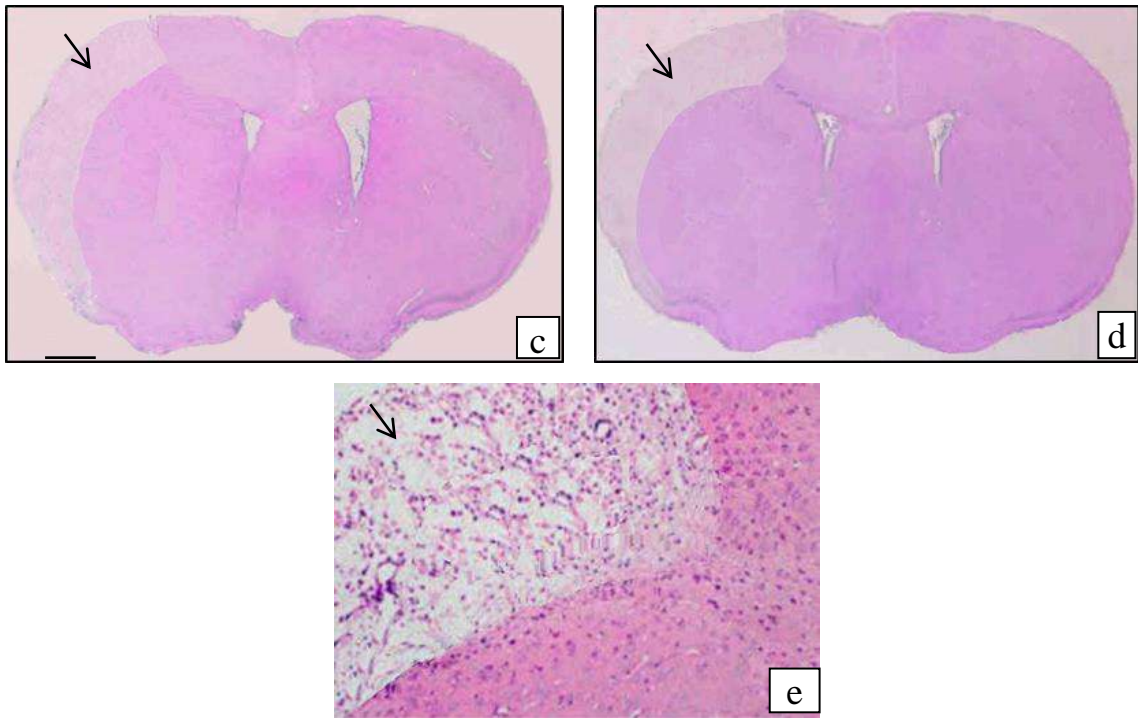
- Tại thời điểm ngày thứ 3 và ngày thứ 7 sau phẫu thuật (sau uống thuốc 2 và 6 ngày), điểm đánh giá tổn thương thần kinh ở các lô trị 1 và trị 2 (gây nhồi máu và uống thông mạch Vintong) nhỏ hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng nhồi máu (gây nhồi máu và uống nước cất), với $p < 0,05$. Lô trị 2 uống thông mạch Vintong liều cao có điểm đánh giá tổn thương thần kinh thấp hơn so với ở lô trị 1 uống thông mạch Vintong liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Tại thời điểm ngày thứ 14 và ngày thứ 28 sau nhồi máu (sau uống thuốc 13 và 27 ngày), điểm đánh giá tổn thương thần kinh ở các lô trị 1 và trị 2 (gây nhồi máu và uống thông mạch Vintong) nhỏ hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng nhồi máu (gây nhồi máu và uống nước cất), với $p < 0,01$. Lô trị 2 uống thông mạch Vintong liều cao có điểm đánh giá tổn thương thần kinh thấp hơn so với ở lô trị 1 uống thông mạch Vintong liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2. Kết quả đánh giá tác dụng giảm thể tích tổn thương, ảnh hưởng quá trình tái tạo thần kinh và mô liên kết của bài thuốc Thông mạch Vintong

3.2.1. Kết quả đánh giá giảm thể tích tổn thương sau đột quỵ nhồi máu não





Hình 3.1. Hình ảnh tiêu bản não chuột nhuộm HE của chuột nghiên cứu ở các lô

a. Chứng phẫu thuật; b. Chứng nhồi máu; c. Trị 1; d. Trị 2.

Thang tỷ lệ = 1 mm ở hình a, b, c, d và thang tỷ lệ = 0,1mm ở hình d.

Mũi tên chỉ biên giới của vùng thiếu máu

Nhận xét:

Hình ảnh tiêu bản nhuộm HE của não chuột được thực hiện với các lát cắt 8 μm ở trung tâm của não trước. Phần não chuột không bị tổn thương, hình ảnh tiêu bản nhuộm HE bắt màu hồng đỏ của thuốc nhuộm. Phần não chuột bị tổn thương do thiếu máu não có màu nhạt hơn hẳn, khác biệt rõ so với phần não không bị tổn thương. Trên hình ảnh nhuộm HE ta thấy rõ đường biên giới của vùng thiếu máu, phân cách vùng thiếu máu với vùng lành.

Kết quả tiêu bản nhuộm HE của não chuột cho thấy:

- Chuột ở lô chứng phẫu thuật không gây nhồi máu (hình 3.1.a), trên tiêu bản nhuộm HE của não chuột thấy hình ảnh bắt màu hồng đỏ của thuốc nhuộm ở

toàn bộ tiêu bản, chứng tỏ toàn bộ tiêu bản là hình ảnh của não chuột không bị tổn thương. Không thấy có hình ảnh của vùng não bắt màu nhạt màu, không có đường biên giới của vùng thiếu máu chứng tỏ không có hình ảnh tổn thương não do thiếu máu.

- Chuột ở các lô chứng nhồi máu (hình 3.1.b), lô trị 1 (hình 3.1.c) và lô trị 2 (hình 3.1.d), trên tiêu bản nhuộm HE của não chuột thấy có hình ảnh của vùng não bắt màu nhạt màu và hình ảnh đường biên giới của vùng thiếu máu rõ, cho phép dễ dàng nhận ra hình ảnh vùng não tổn thương não do thiếu máu. Quan sát một cách định tính cũng dễ dàng thấy được phần não tổn thương do thiếu máu ở lô chứng nhồi máu (hình 3.1.b) có diện tích lớn hơn so với ở các lô trị 1 (hình 3.1.c) và lô trị 2 (hình 3.1.d). Phần não tổn thương do thiếu máu ở lô trị 1 (hình 3.1.c) và lô trị 2 (hình 3.1.d) qua đánh giá bằng quan sát định tính trên tiêu bản nhuộm HE không thấy rõ sự khác biệt.

Để đánh giá định lượng kích thước của “vùng thiếu máu cục bộ” nhằm mục tiêu so sánh giữa các lô, các lát cắt nhuộm H & E được lấy từ cùng một vùng não (trung tâm của não trước - the center of the forebrain) của mỗi con vật, phân tích bằng phần mềm Image J để tính phần trăm diện tích thiếu máu, theo công thức nêu ở phần 2.4.7.2.

Kết quả đánh giá định lượng kích thước của “vùng thiếu máu cục bộ” ở các lô chuột nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.3.

Bảng 3.1. Phần trăm diện tích thiếu máu của não chuột

Lô chuột	Phần trăm diện tích thiếu máu (%)	Giảm so với chứng nhồi máu (%)
Chứng phẫu thuật (1)	0,00	-
Chứng nhồi máu (2)	18,65 ± 2,14	-

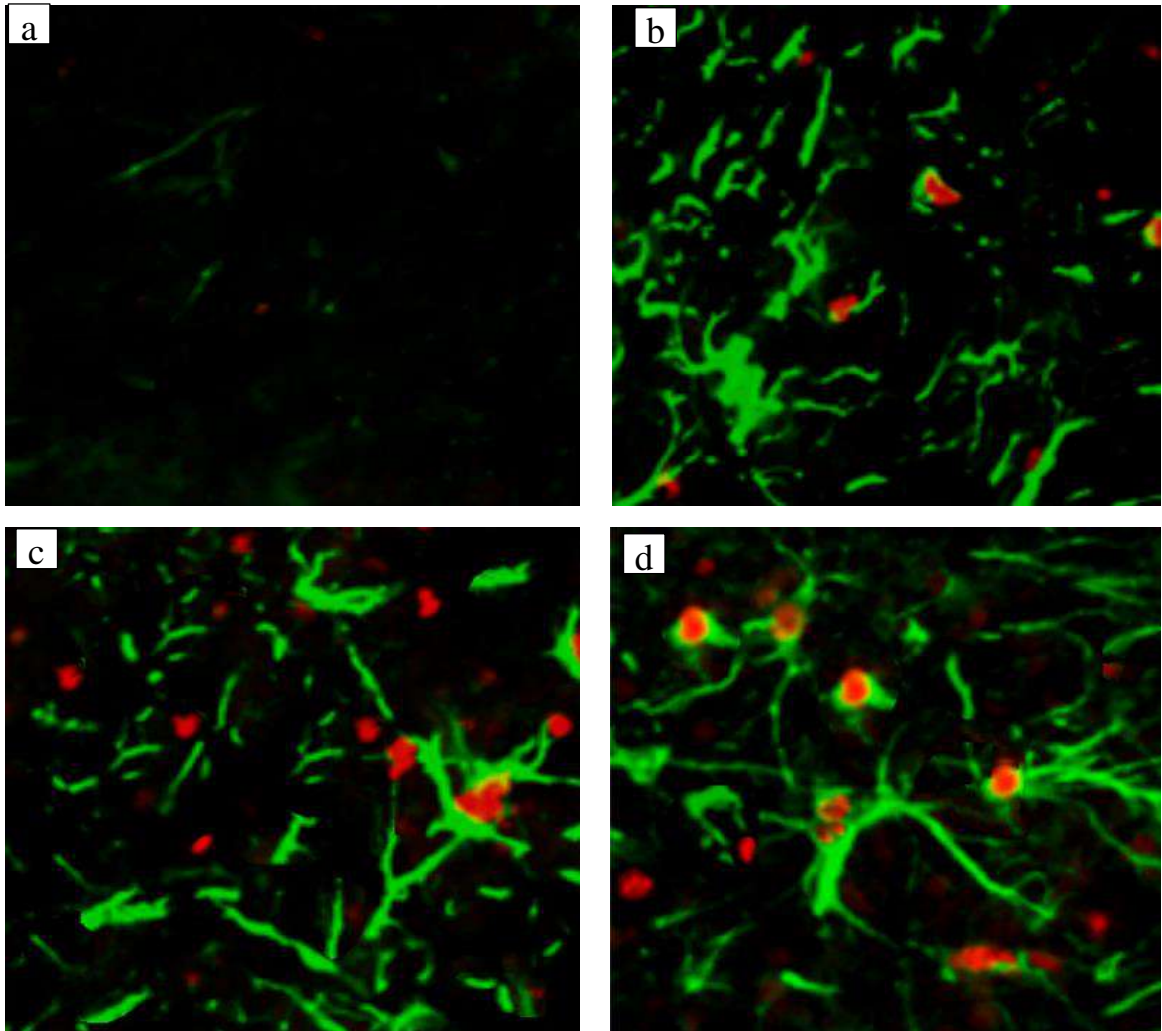
Trị 1 (3)	$12,92 \pm 2,17$	30,72
Trị 2 (4)	$12,24 \pm 1,83$	34,37
Giá trị p	$p_{3,4-2} < 0,01; p_{3-4} > 0,05$	

Nhận xét:

- Lô chứng phẫu thuật không có tổn thương thiếu máu não, phần trăm diện tích thiếu máu não bằng 0.
- Lô chứng nhồi máu có phần trăm diện tích thiếu máu là $18,65 \pm 2,14$. Các lô trị 1 và trị 2 có phần trăm diện tích thiếu máu lần lượt là $12,92 \pm 2,17$ và $12,24 \pm 1,83$. So sánh với lô chứng nhồi máu, phần trăm diện tích thiếu máu ở lô trị 1 giảm 30,72%, ở lô trị 2 giảm 34,37%, khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.
- So sánh giữa lô trị 1 và lô trị 2, phần trăm diện tích thiếu máu của não chuột ở lô trị 2 (dùng thông mạch Vintong liều cao) có xu hướng thấp hơn nhưng không có ý nghĩa thống kê so với ở lô trị 1 (dùng thông mạch Vintong liều thấp), giá trị $p > 0,05$.

3.2.2. Kết quả đánh giá mô bệnh học tái tạo thần kinh

Kết quả về hình ảnh tiêu bản não chuột nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép K67/ Nestin được trình bày ở hình 3.2.



Hình 3.2. Hình ảnh tiêu bản não chuột nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép Ki67/Nestin của chuột nghiên cứu ở các lô

a. Chứng phẫu thuật; b. Chứng nhồi máu; c. Trị 1; d. Trị 2.

(Thang tỷ lệ = 20 μ m).

Nhận xét:

Hình ảnh tiêu bản nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép K67/ Nestin của não chuột được thực hiện với các lát cắt ở thể vân bên não gây nhồi máu. Trên

hình ảnh nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép K67/ Nestin, K67 có biểu hiện màu đỏ, Nestin có biểu hiện màu xanh lá cây.

Kết quả tiêu bản nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép K67/ Nestin của não chuột cho thấy:

- Chuột ở lô chứng phẫu thuật không gây nhồi máu (hình 3.2.a), hầu như không thấy có biểu hiện của Ki67/Nestin.
- Chuột ở các lô chứng nhồi máu (hình 3.2.b), lô trị 1 (hình 3.2.c) và lô trị 2 (hình 3.2.d), trên tiêu bản nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép K67/ Nestin của não chuột thấy có biểu hiện rõ của Ki67/Nestin.

Quan sát một cách định tính, dễ dàng thấy được biểu hiện của Ki67/Nestin ở các lô trị 1 (hình 3.2.c) và lô trị 2 (hình 3.2.d) nhiều hơn so với ở lô chứng nhồi máu (hình 3.2.b).

Biểu hiện của Ki67/Nestin ở lô trị 1 (hình 3.2.c) và lô trị 2 (hình 3.2.d) qua đánh giá bằng quan sát định tính trên tiêu bản nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép K67/ Nestin không thấy rõ sự khác biệt.

Để đánh giá định lượng biểu hiện miễn dịch huỳnh quang kép K67/ Nestin nhằm mục tiêu so sánh giữa các lô, tất cả các hình ảnh mô học được chụp ở cùng một mức phơi sáng và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích hình ảnh Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/Nestin được tính toán theo phương pháp nêu ở phần 2.4.7.3.

Kết quả đánh giá số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/Nestin được trình bày ở bảng 3.4.

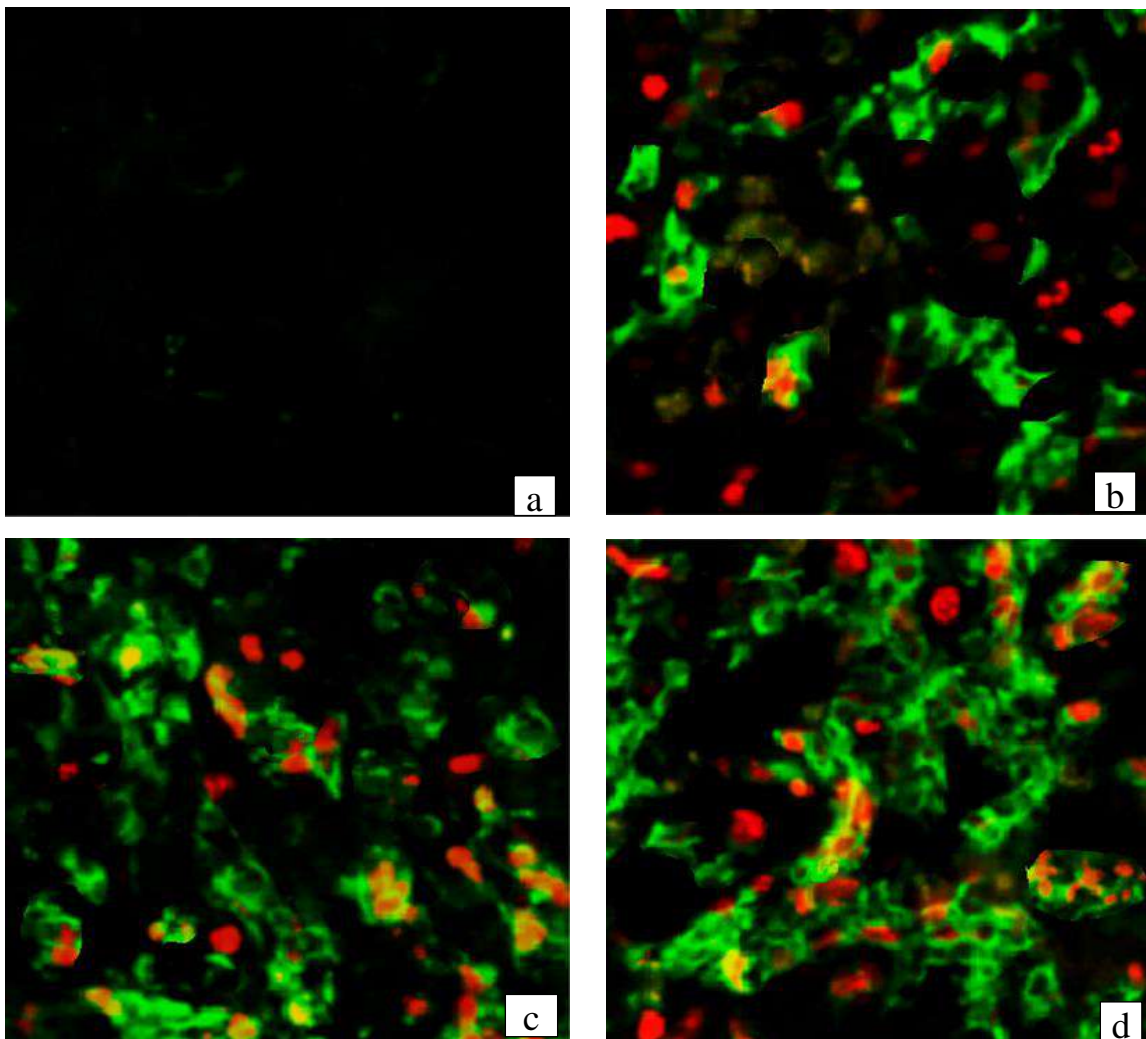
Bảng 3.2. Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/Nestin ở các lô chuột nghiên cứu

Lô chuột	Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/Nestin	Tăng so với chứng nhồi máu (%)
Chứng phẫu thuật (1)	0,00	-
Chứng nhồi máu (2)	12,47 ± 1,62	-
Trị 1 (3)	16,99 ± 2,05	36,25
Trị 2 (4)	17,22 ± 1,96	38,09
Giá trị p	$p_{3,4-2} < 0,01$; $p_{3-4} > 0,05$	

Nhận xét:

- Lô chứng phẫu thuật không có biểu hiện miễn dịch huỳnh quang kép K67/Nestin, số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/Nestin bằng 0.
- Lô chứng nhồi máu có số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/Nestin là $12,47 \pm 1,62$. Các lô trị 1 và trị 2 có số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/Nestin lần lượt là $16,99 \pm 2,05$ và $17,22 \pm 1,96$. So sánh với lô chứng nhồi máu, số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/Nestin ở lô trị 1 tăng 36,25%, ở lô trị 2 tăng 38,09%, khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.
- So sánh giữa lô trị 1 và lô trị 2, số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/Nestin ở lô trị 2 (dùng thông mạch Vintong liều cao) có xu hướng cao hơn nhưng không có ý nghĩa thống kê so với ở lô trị 1 (dùng thông mạch Vintong liều thấp), giá trị $p > 0,05$.

Kết quả về hình ảnh tiêu bản não chuột nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép K67/DCX được trình bày ở hình 3.3.



Hình 3.3. Hình ảnh tiêu bản não chuột nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép Ki67/DCX của chuột nghiên cứu ở các lô.

a. Chứng phẫu thuật; b. Chứng nhồi máu; c. Trị 1; d. Trị 2.

Thang tỷ lệ = 20 μ m

Nhận xét:

Hình ảnh tiêu bản nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép K67/DCX của não chuột được thực hiện với các lát cắt ở thể vân bên não gây nhồi máu. Trên hình ảnh nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép K67/DCX, K67 có biểu hiện màu đỏ, DCX có biểu hiện màu xanh lá cây.

Kết quả tiêu bản nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép K67/DCX của não chuột cho thấy:

- Chuột ở lô chứng phẫu thuật không gây nhồi máu (hình 3.3.a), hầu như không thấy có biểu hiện của Ki67/DCX.
- Chuột ở các lô chứng nhồi máu (hình 3.3.b), lô trị 1 (hình 3.3.c) và lô trị 2 (hình 3.3.d), trên tiêu bản nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép K67/DCX của não chuột thấy có biểu hiện rõ của Ki67/DCX.

Quan sát một cách định tính, dễ dàng thấy được biểu hiện của Ki67/Nestin ở các lô trị 1 (hình 3.3.c) và lô trị 2 (hình 3.3.d) nhiều hơn so với ở lô chứng nhồi máu (hình 3.3.b).

Biểu hiện của Ki67/DCX ở lô trị 1 (hình 3.3.c) và lô trị 2 (hình 3.3.d) qua đánh giá bằng quan sát định tính trên tiêu bản nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép K67/DCX không thấy rõ sự khác biệt.

Để đánh giá định lượng biểu hiện miễn dịch huỳnh quang kép K67/DCX nhằm mục tiêu so sánh giữa các lô, tất cả các hình ảnh mô học được chụp ở cùng một mức phơi sáng và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích hình ảnh Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/DCX được tính toán theo phương pháp nêu ở phần 2.4.7.3.

Kết quả đánh giá số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/DCX được trình bày ở bảng 3.5.

Bảng 3.3. Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/DCX ở các lô chuột nghiên cứu

Lô chuột	Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/DCX	Tăng so với chứng nhồi máu (%)
Chứng phẫu thuật (1)	0,00	-
Chứng nhồi máu (2)	21,68 ± 2,69	-
Trị 1 (3)	28,64 ± 3,51	32,10
Trị 2 (4)	29,96 ± 3,83	38,19
Giá trị p	p _{3,4-2} < 0,01; p ₃₋₄ > 0,05	

Nhận xét:

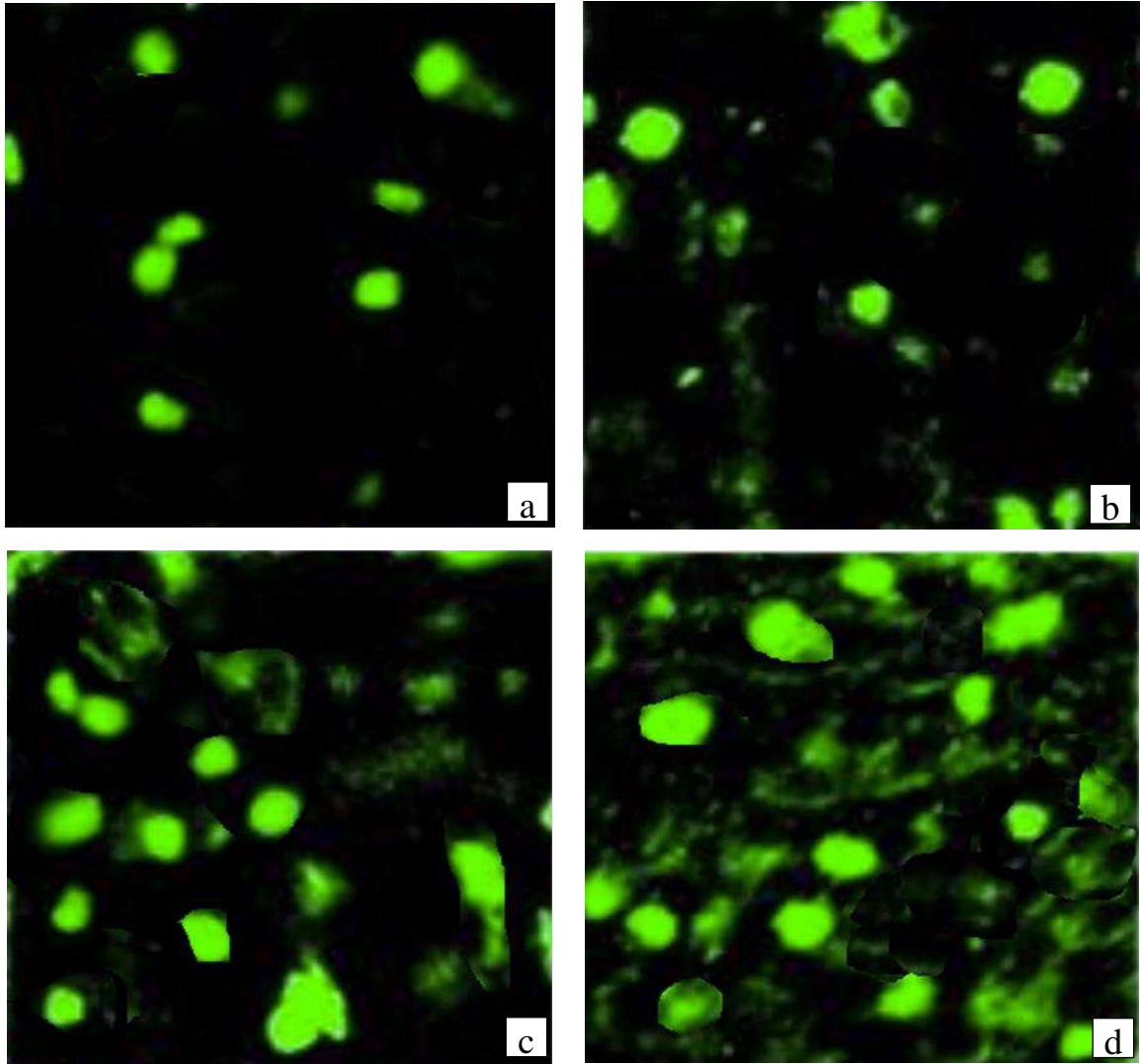
- Lô chứng phẫu thuật không có biểu hiện miễn dịch huỳnh quang kép K67/Nestin, số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/Nestin bằng 0.

- Lô chứng nhồi máu có số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/DCX là 21,68 ± 2,69. Các lô trị 1 và trị 2 có số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/DCX lần lượt là 28,64 ± 3,51 và 29,96 ± 3,83. So sánh với lô chứng nhồi máu, số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/DCX ở lô trị 1 tăng 32,10%, ở lô trị 2 tăng 38,19%, khác biệt có ý nghĩa thống kê với p < 0,01.

- So sánh giữa lô trị 1 và lô trị 2, số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Ki67/DCX ở lô trị 2 (dùng thông mạch Vintong liều cao) có xu hướng cao hơn nhưng không có ý nghĩa thống kê so với ở lô trị 1 (dùng thông mạch Vintong liều thấp), giá trị p > 0,05.

3.3. Kết quả đánh giá mô bệnh học tái tạo mô liên kết Olig2

Kết quả về hình ảnh tiêu bản não chuột nhuộm miễn dịch huỳnh quang Olig2 được trình bày ở hình 3.4.



Hình 3.4. Hình ảnh tiêu bản não chuột nhuộm miễn dịch huỳnh quang Olig2 của chuột nghiên cứu ở các lô

a. Chứng phẫu thuật; b. Chứng nhồi máu; c. Trị 1; d. Trị 2.

Thang tỷ lệ = 20 μm

Nhận xét:

Hình ảnh tiêu bản nhuộm miễn dịch huỳnh quang Olig2 của não chuột được thực hiện với các lát cắt ở vùng vỏ não bên não gây nhồi máu. Trên hình ảnh nhuộm miễn dịch huỳnh quang, Olig2 có biểu hiện màu xanh lá cây.

Kết quả tiêu bản nhuộm miễn dịch huỳnh quang Olig2 của não chuột cho thấy:

- Chuột ở lô chứng phẫu thuật không gây nhồi máu (hình 3.4.a), cường độ tín hiệu biểu hiện của Olig2 có nhưng rải rác, ít.
- Chuột ở lô chứng nhồi máu (hình 3.4.b) có cường độ tín hiệu biểu hiện của Olig2 nhiều hơn so với ở lô chứng phẫu thuật không gây nhồi máu, tuy nhiên hình ảnh tín hiệu vẫn còn rải rác, chưa nhiều.
- Chuột ở lô trị 1 (hình 3.4.c) và lô trị 2 (hình 3.4.d) có cường độ tín hiệu biểu hiện của Olig2 nhiều hơn so với ở 2 lô chứng (chứng phẫu thuật và chứng nhồi máu). Số lượng hình ảnh tín hiệu nhiều, tập trung thành đám.

Quan sát một cách định tính, dễ dàng thấy được biểu hiện của Olig2 ở các lô trị 1 (hình 3.4.c) và lô trị 2 (hình 3.4.d) nhiều hơn so với ở lô chứng nhồi máu (hình 3.4.b).

Biểu hiện của Olig2 ở các lô trị 1 (hình 3.4.c) và lô trị 2 (hình 3.4.d) qua đánh giá bằng quan sát định tính trên tiêu bản nhuộm miễn dịch huỳnh quang Olig2 không thấy rõ sự khác biệt.

Để đánh giá định lượng biểu hiện miễn dịch huỳnh quang Olig2 nhằm mục tiêu so sánh giữa các lô, tất cả các hình ảnh mô học được chụp ở cùng một mức phơi sáng và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích hình ảnh Image J. Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Olig2 được tính toán theo phương pháp nêu ở phần 2.4.7.4.

Kết quả đánh giá số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Olig2 được trình bày ở bảng 3.6.

Bảng 3.4. Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Olig2 ở các lô chuột nghiên cứu

Lô chuột	Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Olig2 (tế bào/mm ²)	Tăng so với chứng nhồi máu (%)	Tăng so với chứng phẫu thuật (%)
Chứng phẫu thuật (1)	1029,54 ± 254,82	-	-
Chứng nhồi máu (2)	1431,62 ± 262,36	-	39,05
Trị 1 (3)	1805,93 ± 312,54	26,15	75,41
Trị 2 (4)	1894,16 ± 341,68	32,31	83,98
Giá trị p	P ₂₋₁ < 0,05; p _{3,4-1} < 0,01; p _{3,4-2} < 0,05; p ₃₋₄ > 0,05		-

Nhận xét:

- So với lô chứng phẫu thuật:

+ Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Olig2 ở lô chứng nhồi máu tăng 39,05%, khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

+ Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Olig2 ở lô trị 1 và lô trị 2 tăng lần lượt là 75,41% và 83,98%, khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

- So với lô chứng nhồi máu:

+ Số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Olig2 ở lô trị 1 và lô trị 2 tăng lần lượt là 26,15% và 32,31%, khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- So sánh giữa lô trị 1 và trị 2, số lượng tế bào nhạy cảm với miễn dịch Olig2 ở 2 lô này khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Về mô hình gây nhồi máu não

Trong công cuộc tìm kiếm những phương pháp mới điều trị đột quỵ, các thử nghiệm tiền lâm sàng là không thể thiếu vì thế việc xây dựng mô hình đột quỵ trên động vật để tiến hành các thử nghiệm tiền lâm sàng là vô cùng quan trọng và cấp thiết. Mô hình gây đột quỵ não được thiết lập ở một số loài, nhưng tối ưu nhất vẫn là trên các loài linh trưởng, tuy nhiên do yêu cầu về mặt đạo đức, nên các nghiên cứu hiện nay phổ biến nhất vẫn là trên một số loài gặm nhấm như chuột nhắt hoặc chuột cống. Việc lựa chọn đối tượng là loài gặm nhấm do một số đặc điểm mang tính ưu việt của đối tượng này như: về mặt y đức đối tượng này dễ được chấp nhận hơn so với những loài động vật có vú ở cấp cao hơn, chi phí nuôi dưỡng và duy trì thấp, có giải phẫu mạch máu tương tự như con người. Hơn nữa những hiểu biết về cấu trúc thần kinh, cơ chế phân tử dẫn đến chết tế bào trong đột quỵ thiếu máu cục bộ trên loài gặm nhấm đã được nghiên cứu rất nhiều, những mô hình bệnh lý liên quan đến đột quỵ như tăng huyết áp, xơ vữa động mạch, đái tháo đường hay béo phì đã được thiết lập sẵn và rất phong phú trên loài gặm nhấm như chuột cống hay chuột nhắt. Do sự tương đồng cao về cấu trúc giải phẫu và các cơ chế chuyển hóa trong cơ thể giữa loài gặm nhấm và con người nên việc đánh giá tác dụng tiền lâm sàng của các phương pháp điều trị đột quỵ trên các loài gặm nhấm là rất gần với việc có thể áp dụng trên người.

Trong nghiên cứu này, mô hình gây nhồi máu não với can thiệp phẫu thuật tối thiểu, và không cần khoan hộp sọ của chuột. Kỹ thuật sử dụng trong mô hình nghiên cứu này là tương đối đơn giản, cho phép việc ổn định mô hình tốt hơn, tính lặp lại cao hơn. Do can thiệp phẫu thuật tối thiểu, chuột hầu

như không bị tổn thương khác ngoài tổn thương do nhồi máu não, do đó kết quả đánh giá tác dụng điều trị của thuốc có tính tin cậy cao hơn. Thực tế kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy chuột ở lô phẫu thuật không gây đột quỵ không có tổn thương thực thể về vận động, điểm đánh giá theo thang điểm Li và cộng sự của tất cả các chuột ở lô này đều bằng không. Đánh giá bằng thử nghiệm rotarod cho thấy lô chứng phẫu thuật có thời gian bám trên trụ quay tại các thời điểm đo đều như nhau, không có sự thay đổi.

Ngoài ra, mô hình còn có ưu điểm là tương đối ổn định. Khi bộc lộ vùng sọ có động mạch não giữa nằm phía dưới, qua kính hiển vi ta quan sát được cấu trúc mạch não ở dưới vùng sọ này. Với một số chuột có cấu trúc mạch não bất thường, ta loại bỏ khỏi nghiên cứu. Điều đó cho phép các chuột đưa vào nghiên cứu có cấu trúc mạch não giữa khá tương đồng nhau, cho phép tính lặp lại cũng như độ chính xác của thử nghiệm cao.

Brant D. Watson (1985) đã sử dụng phản ứng quang hóa *in vivo* để tạo ra huyết khối có thể chống lại được dẫn đến nhồi máu não ở chuột. Sau khi tiêm vào tĩnh mạch hợp chất Rose bengal, một loại thuốc nhuộm cảm quang mạnh, một tổn thương thiếu máu cục bộ được hình thành bằng cách chiếu xạ phần lõi cầu bên trái của hộp sọ tiếp xúc trong 20 phút bằng ánh sáng xanh lục (560nm) từ đèn hồ quang xenon đã được lọc. Động vật chỉ sống sót sau 30 phút đến 15 ngày sau khi chiếu xạ. Sự thiếu hụt vi thể ban đầu trong vùng được chiếu xạ bao gồm sự hình thành các nút huyết khối và ứ đọng tế bào hồng cầu lân cận trong các mạch máu và nhu mô. Kính hiển vi điện tử quét cho thấy các tập hợp tiểu cầu thường xuyên bám vào nội mạc mạch máu, dẫn đến tắc mạch máu [60].

Việc xây dựng thành công mô hình là phương tiện quan trọng giúp thử nghiệm đánh giá một số thuốc mới có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị đột quỵ nhồi máu trước khi phát triển sử dụng điều trị trên người. Chúng

tôi hy vọng kết quả nghiên cứu của chúng tôi sẽ mở ra những hướng nghiên cứu mới trong tìm ra phương thuốc điều trị đột quỵ nhồi máu mới hiệu quả, đặc biệt là phương tiện quan trọng để chỉ ra cơ sở khoa học của một số thuốc đông y hiện nay đang được sử dụng rộng rãi trong dân gian hỗ trợ điều trị đột quỵ nhồi máu.

4.2. Về tác dụng phục hồi chức năng vận động, cảm giác thần kinh trên chuột gây nhồi máu não của bài thuốc “Thông mạch Vintong”

4.2.1. Về kết quả đánh giá bằng thử nghiệm rotarod

Các chỉ tiêu đánh giá trên mô hình được thực hiện gồm có đánh giá tổn thương thần kinh và đánh giá tổn thương mô bệnh học. Đánh giá tổn thương thần kinh được thực hiện tại nhiều thời điểm, vào các ngày 1, 3, 7, 14 và 28 sau phẫu thuật, cho phép đánh giá được cả quá trình hồi phục sau đột quỵ. Tổn thương thần kinh được đánh giá qua test hành vi và qua thử nghiệm rotarod. Test hành vi cho điểm đánh giá về mức độ tổn thương thần kinh, theo phương pháp cho điểm được mô tả bởi Li và cộng sự. Các điểm đánh giá của test hành vi cho phép đánh giá một cách tương đối đầy đủ, toàn diện về tổn thương hoạt động thần kinh bao gồm tổn thương vận động (liệt, vận động bất thường), tổn thương cảm giác (cảm giác xúc giác, thị giác và cảm giác sâu), tổn thương phản xạ (phản xạ pina, phản xạ giác mạc, phản xạ giật mình) [46]. Trên cơ sở đánh giá tương đối đầy đủ về tổn thương thần kinh, mức độ tổn thương thần kinh được lượng hoá bằng phương pháp cho điểm, cho phép so sánh giữa các lô nghiên cứu bằng phương pháp thống kê y sinh học để đưa ra kết quả khách quan, khoa học.

Bên cạnh đó, thử nghiệm rotarod được sử dụng để đánh giá sự phối hợp vận động và sự thay đổi cân bằng ở loài gặm nhấm. Lần đầu tiên thử nghiệm rotarod được Brant giới thiệu để nghiên cứu chức năng thần kinh và sau đó đã được cải tiến để điều tra tình trạng tổn thương vận động của chuột và ảnh

hưởng của việc dùng thuốc [60]. Kể từ đó, nhiều nghiên cứu đã sử dụng thử nghiệm rotarod để đánh giá về chấn thương não như đột quy. Thiết bị rotarod là một thanh quay với tốc độ điều chỉnh được. Tốc độ của thanh tăng dần theo thời gian, và thời gian con vật còn lại trên thiết bị được ghi lại. Động vật bị thiếu máu cục bộ đã được chứng minh là có thời gian ở trên thanh quay ngắn hơn đáng kể. Đối với thử nghiệm này, nhà nghiên cứu chỉ cần dành một khoảng thời gian tối thiểu để huấn luyện từng con vật nguyên vẹn thực hiện nhiệm vụ này trước khi bị chấn thương não. Trên lâm sàng, những bệnh nhân sau đột quy thường bị tổn thương phối hợp vận động, do đó thử nghiệm rotarod được xem là thích hợp cho đánh giá tổn thương này. Jung Yeon Lim và cộng sự thử nghiệm động cơ sử dụng xi lanh Rotarod (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA). Xi lanh được tăng tốc từ 4 đến 40 vòng/phút trong vòng 5 phút, và thời gian cắt là 300s. Những con vật được tiêm hUCB-MSCs trong da hoặc qua đường tĩnh mạch có khả năng hồi phục cao hơn trong 21 ngày so với những con vật được điều trị bằng PBS và tiếp tục hồi phục lên đến 28 ngày. Ở 28 ngày sau khi tiêm, có sự khác biệt đáng kể ($P < 0,05$) giữa các nhóm hUCB-MSC ($90,35\% \pm 4,48\%$) và PBS ($78,83\% \pm 3,22\%$) trong thử nghiệm Rotarod và điểm đánh giá loại bỏ chất kết dính là $23,6 \pm 10,57$ so với $49,77 \pm 10,1$ ($P < 0,05$). Cũng có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm hUCB-MSC và PBS được tiêm tĩnh mạch trong thử nghiệm Rotarod ($87,76\% \pm 4,5\%$ so với $75,89\% \pm 0,3\%$, $P < 0,05$) và điểm kiểm tra loại bỏ chất kết dính ($25,58 \pm 7,6$ so với $51,65 \pm 9,1$, $P < 0,05$) [66].

Trong nghiên cứu, trước phẫu thuật, thời gian chuột trên trục quay ở các lô chuột là như nhau ($p > 0,05$). Ngày 1 sau phẫu thuật gây nhồi máu, thời gian chuột trên trục quay ở các lô gây nhồi máu giảm rõ rệt so với lô chứng phẫu thuật (không gây nhồi máu), với $p < 0,001$. Thời gian chuột trên trục quay ở các lô gây nhồi máu (lô 2, 3, 4) tại thời điểm ngày 1 sau phẫu thuật (trước

uống thuốc) là như nhau ($p > 0,05$). Ở thời điểm ngày thứ 3 và ngày thứ 7 sau nhồi máu (sau uống thuốc 2 và 6 ngày), thời gian chuột trên trục quay ở các lô trị 1 và trị 2 (gây nhồi máu và uống thông mạch Vintong) lớn hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng nhồi máu (gây nhồi máu và uống nước cất), với $p < 0,01$. Lô trị 2 uống thông mạch Vintong liều cao có thời gian chuột trên trục quay lâu hơn so với ở lô trị 1 uống thông mạch Vintong liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tại thời điểm ngày thứ 14 và ngày thứ 28 sau nhồi máu (sau uống thuốc 13 và 27 ngày), thời gian chuột trên trục quay ở các lô trị 1 và trị 2 (gây nhồi máu và uống thông mạch Vintong) lớn hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng nhồi máu (gây nhồi máu và uống nước cất), với $p < 0,001$. Thời gian chuột trên trục quay ở lô trị 1 và trị 2 lâu hơn, khác biệt ít hơn so với ở lô chứng phẫu thuật không gây nhồi máu ($p < 0,05$). Lô trị 2 uống thông mạch Vintong liều cao có thời gian chuột trên trục quay lâu hơn so với ở lô trị 1 uống thông mạch Vintong liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

4.2.2. Về mức độ tổn thương thần kinh theo thang điểm của Li và cộng sự

Mục đích cuối cùng của điều trị nhồi máu não là cải thiện sức khỏe cơ thể và bất kỳ thuốc hoặc sự can thiệp nào cũng cần không chỉ là bảo vệ mô não hoặc thúc đẩy phục hồi, mà còn cần hồi phục chức năng toàn diện. Điều này dẫn đến các nhà nghiên cứu nhồi máu não nói riêng và đột quy nói chung đánh giá hành vi thường xuyên hơn trong nghiên cứu của họ, làm cho nó trở thành một khía cạnh quan trọng trong nghiên cứu đột quy.

Chúng tôi đánh giá mức độ tổn thương thần kinh học theo thang điểm Li và cộng sự [46]. Chuột bị tổn thương não bên nào sẽ ảnh hưởng đến thần kinh của não bên đối diện vì vậy sẽ có biểu hiện vận động nửa người đối diện bất thường. Tổn thương thần kinh não càng nghiêm trọng thì biểu hiện liệt nửa

người đối bên thể hiện càng rõ (biểu hiện qua các yếu tố vận động, cảm giác, phản xạ) tương đương điểm tổn thương thần kinh của chuột càng lớn.

Chúng tôi thực hiện đánh giá tổn thương thần kinh vào các ngày 1, 3, 7, 14 và 28 sau khi gây đột quy, chuột được thực hiện các test hành vi để cho điểm đánh giá về mức độ tổn thương thần kinh. Những khoảng thời gian này giúp chúng tôi có thể đánh giá một cách toàn diện nhất về sự thay đổi điểm tổn thương thần kinh của chuột cũng như thấy được chuyển biến tích cực của các lô thuốc

Từ kết quả đánh giá mức độ tổn thương thần kinh cho thấy:

Trước phẫu thuật, tất cả các chuột nghiên cứu đều không có tổn thương thần kinh, điểm đánh giá tổn thương thần kinh (vận động, cảm giác, phản xạ) theo thang điểm của Li và cộng sự đều bằng không. Ở lô chứng phẫu thuật, các chuột không có tổn thương thần kinh, điểm đánh giá tổn thương thần kinh (vận động, cảm giác, phản xạ) theo thang điểm của Li và cộng sự đều bằng 0. Tại thời điểm 1 ngày sau phẫu thuật, chuột ở các lô gây nhồi máu não (lô 2, 3, 4) đều có tổn thương thần kinh, với điểm đánh giá tổn thương thần kinh (vận động, cảm giác, phản xạ) theo thang điểm của Li và cộng sự lần lượt là $5,94 \pm 0,62$; $5,91 \pm 1,01$; và $5,98 \pm 0,93$. So sánh giữa 3 lô 2, 3, 4 về điểm đánh giá tổn thương thần kinh, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tại thời điểm ngày thứ 3 và ngày thứ 7 sau phẫu thuật (sau uống thuốc 2 và 6 ngày), điểm đánh giá tổn thương thần kinh ở các lô trị 1 và trị 2 (gây nhồi máu và uống thông mạch Vintong) nhỏ hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng nhồi máu (gây nhồi máu và uống nước cất), với $p < 0,05$. Lô trị 2 uống thông mạch Vintong liều cao có điểm đánh giá tổn thương thần kinh thấp hơn so với ở lô trị 1 uống thông mạch Vintong liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tại thời điểm ngày thứ 14 và ngày thứ 28 sau nhồi máu (sau uống thuốc 13 và 27 ngày), điểm đánh giá tổn thương

thần kinh ở các lô trị 1 và trị 2 (gây nhồi máu và uồng thông mạch Vintong) nhỏ hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng nhồi máu (gây nhồi máu và uồng nước cất), với $p < 0,01$. Lô trị 2 uồng thông mạch Vintong liều cao có điểm đánh giá tổn thương thần kinh thấp hơn so với ở lô trị 1 uồng thông mạch Vintong liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Kết quả đánh giá cho thấy chuột gây đột quỵ nhồi máu não có tổn thương thần kinh rõ rệt trên cả test hành vi và thử nghiệm rotarod. Chuột cho uồng Thông mạch vintong là giảm rõ rệt số điểm đánh giá tổn thương thần kinh và làm tăng thời gian chuột ở trên trục quay. Kết quả này chứng tỏ bài thuốc Thông mạch vintong có tác dụng rõ rệt làm giảm tổn thương thần kinh trên mô hình gây nhồi máu não ở chuột.

Kết quả nghiên cứu đạt được hoàn toàn phù hợp với tác dụng của bài thuốc theo lý luận y học cổ truyền. Bài thuốc Thông mạch vintong gồm 13 vị thuốc: Đinh lăng, Ngưu tất, Hà thủ ô, Sơn tra, Tam thất, Địa long, Thủy điệt, Đông trùng hạ thảo, Xuyên khung, Xích thược, Chỉ xác, Cúc hoa, Bạch quả. Trong bài Đinh lăng, Ngưu tất, Tam thất, Xích thược có tác dụng hoạt huyết, thông kinh lạc, bổ khí huyết can thận; Hà thủ ô dưỡng huyết, Xuyên khung lý khí trong huyết, trừ phong, giảm đau; Chỉ xác, Sơn tra, Bạch quả hóa đàm, lý khí, hành ú; Đông trùng hạ thảo ích phế, thận, bổ tinh tủy, hóa đờm; Địa long thanh nhiệt, trấn kinh, thông kinh lạc; Cúc hoa thanh nhiệt, giải độc, tán phong, minh mục kết hợp với Địa long làm tăng thêm tác dụng thanh nhiệt, tán phong. Thủy điệt hoạt huyết, giải thông ú trệ, tan huyết khối. Các vị thuốc trong bài phối hợp có tác dụng chính hoạt huyết, khứ ú, hành khí. Nhờ vậy, các hoạt động bị tổn thương do khí huyết ú trệ được cải thiện. Kết quả đạt được của nghiên cứu chính là cơ sở khoa học khẳng định cho tính đúng đắn trong phối hợp các vị thuốc để xây dựng nên bài thuốc.

Kết quả nghiên cứu đạt được hoàn toàn phù hợp với tác dụng dược lý của những vị thuốc thành phần. Theo y học hiện đại, các dược liệu thành phần đã được chứng minh có hiệu quả tốt đối với tình trạng bệnh lý của nhồi máu não.

Ngưu tất (*Achyranthes bidentata*) có tác dụng tăng tốc độ tái tạo dây thần kinh ngoại vi ở thỏ, giảm quá trình chết tế bào do glutamate gây ra ở các tế bào thần kinh hồi hải mã [66]. Nghiên cứu của Qiong Cheng và cộng sự về hoạt chất *Achyranthes bidentata* polypeptide k (ABPPk) được phân lập từ Ngưu tất thể hiện tác dụng bảo vệ thần kinh đối với chuột tắc động mạch não giữa thoáng qua dạng sợi (tMCAO) và phát hiện ra rằng ABPPk làm giảm thể tích nhồi máu và duy trì tính toàn vẹn của tế bào thần kinh trong đột quy thiếu máu não cục bộ. Ngoài ra, ABPPk có thể làm giảm sự hình thành của các huyết khối nhỏ thông qua việc ngăn ngừa tổn thương oxy hóa do thiếu máu cục bộ của tế bào nội mô não và kích hoạt yếu tố mô (TF), chất ức chế hoạt hóa plasminogen-1 (PAI-1) và NF- κ B. ABPPk cũng ức chế sự xâm nhập của bạch cầu đa nhân trung tính (PMNs) và sự hoạt hóa metalloproteinase-2 / -9 (MMP-2 / -9) trong tiểu vùng thiếu máu cục bộ [72].

Hà thủ ô (*Polygonum multiflorum Thunb*) được sử dụng rộng rãi như một loại thuốc bổ và chống lão hóa. TSG (2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2- O - β -D-glucoside) được trích xuất từ Hà thủ ô đã được chứng minh là một chất chống oxy hóa, ức chế quá trình apoptosis và bảo vệ các tế bào thần kinh, được sử dụng trong điều trị và dự phòng bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, và tổn thương do thiếu máu cục bộ/tái tưới máu não [65]. Một nghiên cứu khác của Sung Min Ahn và cộng sự về hoạt chất emodin được phân lập từ Hà thủ ô có thể có tác dụng bảo vệ thần kinh đáng kể chống lại quá trình chết rụng do glutamate thông qua việc kích hoạt con đường tín hiệu PI3K / Akt, từ đó tăng cường chức năng hành vi trong bệnh thiếu máu não [73].

Tam thất (*Notoginsengnosides*) được chứng minh có tác dụng làm tăng tổng hợp chất hoạt hóa plasminogen loại mô (t-PA) và giảm hoạt động của chất ức chế chất hoạt hóa plasminogen-1 (PAI-1) trong tế bào nội mô của người được nuôi cấy từ các nguồn mạch máu khác nhau. Thuốc được sử dụng trong một số bệnh lý nhồi máu não, nhồi máu cơ tim... Nghiên cứu của Chang-Pei Xiang và cộng sự trên tổng số 165 loại saponin của Tam thất gồm saponin protopanaxadiol (55 loài), saponin protopanaxadiol (37 loài) và saponin loại cấu trúc đặc biệt (73 loài), tác dụng điều trị thiếu máu não được chứng minh qua 5 khía cạnh: chống stress oxy hóa, giảm apoptosis, giảm phản ứng viêm, ức chế quá tải canxi và bảo vệ hàng rào máu não [74].

Năm 1991, Mihara et al. phát hiện ra rằng giun đất thuộc họ Lumbricidae có thể trực tiếp phân giải fibrin và hoạt hóa plasminogen [68]. Enzyme tiêu sợi huyết của giun đất (EFE) giúp làm tiêu sợi huyết, làm giảm độ nhớt của máu, giảm kết tập tiểu cầu, và thúc đẩy tan huyết khối trong máu [68], do đó được nghiên cứu làm tan huyết khối đường uống [69]. Nghiên cứu của Liu C. và cộng sự về tác dụng chữa bệnh của *Pheretima aspergillum* (giun đất) trên chuột bị tắc động mạch não giữa gây ra bởi mô hình MCAo. Việc sử dụng giun đất trong hai tuần đã làm giảm thành công các vùng nhồi máu não ở vỏ não và thể vân, đồng thời cũng làm giảm tổng điểm trên thang điểm đánh giá thiếu sót thần kinh có hồi phục do thiếu máu. Trên lô chuột gây đột quy bởi MCAo được điều trị bằng giun đất cho thấy sự giảm đi đáng kể quá trình chết của tế bào thần kinh, giảm tăng sinh mô liên kết và protein S100B trong vùng penumbra của vỏ não và trong vùng lõi thiếu máu cục bộ của vỏ não [76].

Ginkgo biloba là một loại thuốc cổ truyền đã được sử dụng trong nhiều chứng rối loạn khác nhau trong nhiều thế kỷ. Chiết xuất *Ginkgo biloba* (EGb), EGb761, chứa các loại flavone glycoside và terpenoide khác nhau. EGb761

đã được chứng minh có tác dụng tốt trên mô hình gây nhồi máu não nhờ khả năng chống oxy hoá của nó. EGb761 làm tăng các chất chống oxy hoá (glutathione và superoxide dismutase), làm giảm sự tăng các sản phẩm của quá trình oxy hoá (malondialdehyde, nitric oxide) khi đánh giá trên chuột gây tắc mạch não giữa [70],[71]. Nghiên cứu của Darioush Savadi Oskouei và cộng sự trên 52 bệnh nhân điều trị bằng Ginkgo biloba và 50 bệnh nhân dùng giả dược. Kết quả cho thấy có sự khác biệt về điểm trung bình trên thang điểm đột quy NIHSS theo dõi trong 4 tháng và điểm NIHSS lúc nhập viện lần lượt là $4,7 \pm 2,7$ và $4,1 \pm 3,0$ ở nhóm G biloba và giả dược ($P > 0,05$), giảm 50% điểm NIHSS sau 4 tháng theo dõi so với điểm NIHSS ban đầu, đạt 17 bệnh nhân sử dụng G biloba (58,6%) và 5 bệnh nhân sử dụng giả dược (18,5%) với $p < 0,05$. Ngoài ra, hồi quy đa biến theo tuổi và giới tính cho thấy sự giảm điểm NIHSS đáng kể ở nhóm G biloba so với nhóm giả dược ($p < 0,05$). Một nghiên cứu khác của Imad A-J Thanoon và cộng sự trên các bệnh nhân đột quy do thiếu máu cục bộ được chia thành hai nhóm: nhóm I ($n = 15$) được điều trị thông thường; nhóm II ($n = 16$) được điều trị thông thường kết hợp với G. biloba (1500 mg / ngày) trong 30 ngày. Các mẫu máu được lấy từ bệnh nhân và thực hiện xét nghiệm nồng độ MDA, TAS, và hsCRP trong huyết thanh. So với nhóm chứng, nồng độ MDA và hsCRP trong huyết thanh của bệnh nhân cao hơn đáng kể ($p \leq 0,001$) và TAS thấp hơn đáng kể. Bệnh nhân nhóm I và II báo cáo giảm đáng kể nồng độ MDA và hsCRP trong huyết thanh và tăng đáng kể nồng độ TAS trong huyết thanh so với mức trước khi điều trị. Không có sự khác biệt đáng kể ($p = 0,19$) về nồng độ MDA huyết thanh giữa nhóm I và II, trong khi nồng độ TAS huyết thanh cao hơn có ý nghĩa ($p \leq 0,01$) và hsCRP thấp hơn đáng kể ($p \leq 0,01$) ở nhóm II. Nghiên cứu đưa ra kết luận rằng: đột quy cấp có liên quan đến stress oxy hóa và phản ứng

viêm trong thời kỳ đầu. *G. biloba* đóng một vai trò tiềm năng trong việc giảm tổn thương oxy hóa và phản ứng viêm [75].

4.3. Về kết quả đánh giá tác dụng giảm thể tích tổn thương, ảnh hưởng quá trình tái tạo thần kinh và mô liên kết của bài thuốc “Thông mạch Vintong”

Đánh giá tổn thương mô bệnh học được thực hiện ở thời điểm kết thúc thí nghiệm. Mặc dù tổn thương mô bệnh học không được đánh giá tại nhiều thời điểm của diễn tiến bệnh, việc đánh giá ở thời điểm kết thúc thí nghiệm cho phép ta thấy được kết quả của một quá trình diễn tiến bệnh và tác dụng của thuốc nghiên cứu. Mức độ tổn thương não chuột và khả năng hồi phục, thu hẹp vùng tổn thương được đánh giá thông qua các tiêu bản não chuột nhuộm HE. Vùng trung tâm của não trước (the center of the forebrain) là vùng tổn thương rộng, đầy đủ nhất của tổn thương não trên mô hình gây nhồi máu não bằng gây tắc mạch não giữa. Vì vậy, vùng này được lựa chọn để đánh giá tổn thương não chuột. Việc đánh giá được tiến hành cả trên đánh giá định tính bằng quan sát mô tả và bằng đánh giá định lượng, phân tích bằng phần mềm Image J. Phần trăm vùng thiếu máu não được tính toán theo công thức nêu ở phần 2.4.7.2. Cụ thể:

$$\% \text{ diện tích thiếu máu} = \frac{\text{Diện tích}_{\text{bán cầu lạnh}} - \text{Diện tích}_{\text{vùng lạnh của bán cầu tổn thương}}}{\text{Diện tích}_{\text{bán cầu lạnh}} \times 2}$$

Trong công thức này, diện tích vùng thiếu máu được tính toán thông qua diện tích vùng lạnh. Do tính đối xứng của não, bình thường hai bán cầu não có kích thước như nhau, nên với lát cắt cân đối thì tổng phần diện tích mặt cắt của cả não bằng diện tích mặt cắt của nửa bán cầu não nhân 2, đây chính là mẫu số của công thức. Diện tích vùng não thiếu máu không tính bằng cách đo trực tiếp vùng thiếu máu vì những biến đổi của quá trình não bị tổn thương do thiếu máu như phù, viêm... sẽ làm thay đổi đáng kể hình dạng kích

thước của vùng này, việc đánh giá sẽ không thể chính xác. Cũng dựa trên tính cân đối của hai bán cầu, diện tích phần thiếu máu ở bên bán cầu tổn thương được tính bằng diện tích bán cầu lành trừ đi diện tích vùng lành của bán cầu tổn thương. Cách tính này cho phép tính toán diện tích vùng não bị tổn thương một cách chính xác hơn. Trên cơ sở lượng giá được % diện tích thiếu máu, sự so sánh giữa các lô nghiên cứu được thực hiện bằng phép so sánh thống kê y sinh học, cho kết quả nghiên cứu khoa học, khách quan, có độ tin cậy cao.

Đồng thời với đánh giá chung về mức độ tổn thương và sự hồi phục tổn thương não chuột trên hình ảnh tiêu bản nhuộm HE, các đánh giá sâu hơn về tế bào thần kinh và mô liên kết của não chuột cũng được đánh giá trong nghiên cứu. Mô bệnh học tái tạo thần kinh và mô liên kết được đánh giá thông qua nhuộm hoá mô miễn dịch vùng quanh nhồi máu thể vân và vỏ não. Đây là các kỹ thuật hiện đại, tiến hành trên các thiết bị nghiên cứu hiện đại, cho kết quả chính xác cao và mức độ hiểu biết sâu hơn về quá trình bệnh và tác dụng của thuốc.

Sau khi bị nhồi máu não, vùng não thiếu máu gây tổn thương. Các tổn thương của tế bào thần kinh và mô liên kết của não là nguyên nhân gây ra các tổn thương vận động, cảm giác, phản xạ. Theo cơ chế tự nhiên, cơ thể sẽ có những đáp ứng nhằm hồi phục lại các tổn thương. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy ở lô chứng nhồi máu có hình ảnh tăng tái tạo thần kinh và mô liên kết so với lô chứng phẫu thuật. Đây là một đáp ứng tích cực của cơ thể, giúp cho quá trình hồi phục tổn thương. Dịch chiết bài thuốc “Thông mạch Vintong” khi cho chuột uống đã làm tăng đáp ứng này, thể hiện qua kết quả các biểu hiện của tái tạo thần kinh và mô liên kết ở 2 lô chuột uống “Thông mạch Vintong” tăng cao hơn so với lô chứng nhồi máu.

Chỉ tiêu đánh giá quá trình tái tạo thần kinh được đánh giá thông qua hình ảnh nhuộm hoá mô miễn dịch cho biểu hiện Ki67/Nestin và Ki67/DCX. Ki67 là kháng nguyên ở nhân tế bào, hiện diện ở kỳ hoạt động của tế bào. Ki67 thường được sử dụng như một chất đánh dấu tế bào thần kinh của chu kỳ và tăng sinh tế bào. Nestin là một sợi trung gian không điển hình được biểu hiện mạnh mẽ ở các tiền thân thần kinh và do đó được sử dụng rộng rãi như một chất đánh dấu tiền thân. Một số lượng nhỏ các tế bào thần kinh vỏ não phôi thai biểu hiện thoáng qua nestin trong sợi trục của chúng. Do đó, biểu hiện Nestin không bị giới hạn ở các tiền thân thần kinh, nhưng vẫn tồn tại trong 2-3 ngày ở mức độ thấp hơn ở các tế bào thần kinh sơ sinh. Các tế bào thần kinh biểu hiện nestin có các tế bào hình nón phát triển nhỏ hơn, cho thấy rằng nestin ảnh hưởng đến động lực học của tế bào. Doublecortin (DCX) là một protein liên kết với vi ống được biểu hiện bởi các tế bào tiền thân tế bào thần kinh và các tế bào thần kinh chưa trưởng thành trong cấu trúc vỏ não của phôi thai và người trưởng thành. Các tế bào tiền thân thần kinh bắt đầu biểu hiện DCX trong khi tích cực phân chia, và các tế bào con thần kinh của chúng tiếp tục biểu hiện DCX trong 2-3 tuần khi tế bào trưởng thành thành tế bào thần kinh. Quá trình điều hòa DCX bắt đầu sau 2 tuần, và xảy ra cùng lúc khi các tế bào này bắt đầu biểu hiện NeuN, một dấu hiệu cho các tế bào thần kinh trưởng thành. Do sự biểu hiện gần như độc quyền của DCX trong các tế bào thần kinh đang phát triển, protein này ngày càng được sử dụng như một chất đánh dấu cho sự hình thành thần kinh. “Thông mạch Vintong” làm tăng số lượng các tế bào có biểu hiện Ki67/Nestin và Ki67/DCX, là bằng chứng rõ ràng cho tác dụng làm tăng khả năng tái tạo thần kinh của bài thuốc trên mô hình động vật gây đột quy nhồi máu não.

Chỉ tiêu đánh giá quá trình tái tạo mô liên kết được đánh giá thông qua hình ảnh nhuộm hoá mô miễn dịch cho biểu hiện Olig2. Oligodendrocyte

transcription factor (OLIG2) là một yếu tố phiên mã chuỗi xoắn cơ bản (bHLH) được mã hóa bởi gen Olig2. Protein có chiều dài 329 axit amin, kích thước 32kDa và chứa 1 vùng liên kết DNA dạng xoắn cơ bản. OLIG2 đóng một vai trò chức năng trong việc sửa chữa dây thần kinh. Các nghiên cứu cho thấy rằng số lượng tế bào biểu hiện OLIG2 tăng lên trong tổn thương sau chấn thương ở vỏ não. Kết quả nghiên cứu thực nghiệm cho thấy cho thấy số lượng tế bào biểu hiện OLIG2 tăng lên ở lô chứng nhồi máu, hoàn toàn phù hợp với các kết quả của các tác giả khác, và là đáp ứng có lợi cho sự hồi phục tổn thương thần kinh. “Thông mạch Vintong” làm tăng số lượng các tế bào có biểu hiện OLIG2, cho thấy thuốc cũng có vai trò kích thích đáp ứng có lợi cho sự hồi phục tổn thương, tăng tái tạo mô liên kết trên mô hình chuột gây nhồi máu não.

Các kết quả đánh giá về tác dụng hồi phục cấu trúc não tổn thương cũng hoàn toàn phù hợp với kết quả đánh giá về khả năng hồi phục các tổn thương chức năng thần kinh (vận động, cảm giác...).

Các kết quả nghiên cứu cho thấy bài thuốc Thông mạch Vintong thể hiện hiệu quả tốt, làm hồi phục về cấu trúc và chức năng của não tổn thương do nhồi máu. Đây là cơ sở cho những nghiên cứu sâu về tác dụng của bài thuốc, cũng như là cơ sở cho đánh giá lâm sàng để ứng dụng rộng rãi trong điều trị và phát triển sản phẩm.

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu tác dụng điều trị Nhồi máu não của bài thuốc “Thông mạch Vintong” trên mô hình động vật thực nghiệm, nhóm nghiên cứu đưa ra kết luận sau:

1. Kết luận về tác dụng phục hồi chức năng vận động, cảm giác thần kinh trên chuột gây nhồi máu não

Dịch chiết nước bài thuốc “Thông mạch Vintong liều 25,92g/kg/24h và liều 51,84g/kg/24h dùng đường uống trên chuột nhắt trắng gây nhồi máu não có tác dụng phục hồi chức năng vận động và cảm giác thông qua thử nghiệm Rotarod và đánh giá các test hành vi (test vận động, test cảm giác, test phản xạ), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng gây nhồi máu ($p < 0,01$).

2. Kết luận về tác dụng giảm thể tích tổn thương, ảnh hưởng quá trình tái tạo thần kinh và mô liên kết của bài thuốc “Thông mạch Vintong”

Dịch chiết nước bài thuốc “Thông mạch Vintong liều 25,92g/kg/24h và liều 51,84g/kg/24h dùng đường uống trên chuột nhắt trắng gây nhồi máu não có tác dụng làm giảm thể tích tổn thương não khi đánh giá bằng tiêu bản não chuột nhuộm HE, làm tăng tái tạo thần kinh và mô liên kết khi đánh giá bằng tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch, khác biệt rõ so với lô chứng gây nhồi máu.

KIẾN NGHỊ

- Đánh giá thêm về tính an toàn, nghiên cứu sâu hơn về tác dụng của bài thuốc trên động vật thực nghiệm.
- Đánh giá tính an toàn và tác dụng của bài thuốc trên lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. **Nguyễn Đạt Anh, Mai Duy Tôn** (2016). *Điều trị tiêu huyết khối ở bệnh nhân nhồi máu não cấp*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. **Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự** (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập I, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
3. **Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự** (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập II, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
4. **Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự** (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập III, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
5. **Bộ Y tế** (2018). Thông tư 29/2018/TT-BYT, Thông tư quy định về thử thuốc trên lâm sàng.
6. **Bộ Y tế** (2015). Thông tư 05/2015/TT-BYT Ban hành các danh mục thuốc đông y, thuốc từ dược liệu và vị thuốc y học cổ truyền thuộc phạm vi thanh toán của bảo hiểm y tế.
7. **Bộ Y tế** (2012). Thông tư 03/2012/TT-BYT, Thông tư hướng dẫn về thử thuốc trên lâm sàng.
8. **Bộ Y tế** (2017). *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ năm, tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
9. **Lê Quang Cường chủ biên** (2015). *Hướng dẫn thử nghiệm phi lâm sàng và lâm sàng đông y, thuốc từ dược liệu*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
10. **Trần Chí Cường chủ biên** (2016), *Chẩn đoán và điều trị bệnh mạch máu thần kinh – đột quy*, Nhà xuất bản Y học thành phố Hồ Chí Minh, Hồ Chí Minh.

11. **Trịnh Bình Dy** (2006). Sinh lý tế bào và màng tế bào; Tuần hoàn địa phương, *Sinh lý học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, Tập 1, 36-50; 232- 245.
12. **Đỗ Trung Đàm** (1996). *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
13. **Nguyễn Văn Đăng** (2000). *Tai biến mạch máu não – Chẩn đoán và điều trị*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
14. **Nguyễn Văn Đăng** (2003). *Tai biến mạch máu não, Thực hành thần kinh các bệnh và hội chứng thường gặp*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 569-636.
15. **Nguyễn Văn Đăng** (2006). *Tai biến mạch máu não*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
16. **Nguyễn Văn Đăng** (2001), *Đột quỵ não người trẻ, một số kinh nghiệm chẩn đoán, điều trị*, Hội thảo chuyên đề liên khoa, Báo cáo khoa học, Bệnh viện Bạch Mai, Hà Nội, tr 36-39.
17. **Lê Đức Hình** (2002). Một số đặc điểm dịch tễ học về tai biến mạch máu não tại Việt Nam, *Hội thảo quốc tế lần thứ nhất, chuyên đề tai biến mạch máu não*, Bệnh viện Bạch Mai, tr 35.
18. **Lê Đức Hình** (2009). “Tai biến mạch máu não”, *Thần kinh học trong thực hành đa khoa*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
19. **Nguyễn Nhược Kim chủ biên** (2015). *Phương tế học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
20. **Hoàng Khánh** (2008), Các yếu tố nguy cơ gây tai biến mạch máu não, *Tai biến mạch máu não hướng dẫn chẩn đoán và xử trí*, Hà Nội, Nhà xuất bản y học, tr.84-105.
21. **Hoàng Khánh** (2004), Các yếu tố nguy cơ của tai biến mạch máu não, *Thần kinh học lâm sàng*, Thành phố Hồ Chí Minh, Nhà xuất bản Y học, tr.164-170.

22. **Trần Văn Kỳ** (2014). *Dược học cổ truyền*. Nhà xuất bản Đồng Nai.
23. **Đỗ Tất Lợi** (2015). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
24. **Vũ Anh Nhị** (2012), *Sổ tay lâm sàng thần kinh*, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, Hồ Chí Minh, tr.73-102.
25. **Vũ Anh Nhị** (2013): *Thần kinh học*, Bộ môn Thần kinh, Đại học Y dược TPHCM, NXB Đại học Quốc gia TPHCM.
26. **Vũ Anh Nhị, Nguyễn Bá Thắng** (2012), Điều trị dự phòng trước và sau đột quy, *Chẩn đoán và điều trị tai biến mạch máu não*, Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh, TP Hồ Chí Minh, tr. 71 - 75.
27. **Uông Ngang, Trần Văn Quảng** dịch (2015). *Thang đầu ca quyết*, Nhà xuất bản Phương Đông.
28. **Hoàng Duy Tân, Hoàng Anh Tuấn** (2016). *Phương tế học*, Nhà xuất bản Thuận Hóa.
29. **Lê Văn Thành** (2015), "Mạng lưới chăm sóc đột quy chặng đường đã qua và tương lai", *Tạp chí y dược lâm sàng 108*, 10, tr.11 - 14.
30. **Nguyễn Bá Thắng** (2014), Bài giảng Đột quy - lâm sàng, chuẩn đoán và điều trị - Dành cho đối tượng sinh viên YĐK và YHCT
31. **Lê Văn Thính, Lê Đức Hình, Lê Trọng Luân, Nguyễn Chương** (2000). Phân loại tai biến nhồi máu não, *Công trình nghiên cứu khoa học Bệnh viện Bạch Mai*, tr 417-422.
32. **Đào Xuân Vinh** (2008). *Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hóa*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
33. **Viện dược liệu** (2006). *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo*, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật.
34. **Viện kiểm nghiệm** (2005). Dự thảo hướng dẫn thử độc tính của thuốc

Tiếng Anh

35. **AHFS** (2019), *Clinical drug information*, Elsevier.
36. **Lapchak Paul A.** (2010). A critical assesement of edaravone acute ischemic stroke efficacy trials: Is edaravone an effective neuroprotective therapy?, *Expert opinion on pharmacotherapy*, 11(10), pg 1753-1763.
37. **Eward S.C., Walker R.** (1999). *Clinical pharmacy and therapeutics*, Churchill and Livingstone, 2nd ed.
38. **LeBeau J.E.** (1983). The role of the LD50 determination in drug safety evaluation, *Regul Toxicol Pharmacol*, 3(1), pg 71-74.
39. **Shaheen E, Annette K and Magdalena H** (2009). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *Journal of Translational Medicine*, 7(1), 97-107.
40. **Gerhard Vogel Hans** (2012). *Drug discovery and evaluation Pharmacological assays*, Springer.
41. **Goldszmidt, A. J., Caplan L. R.** (2010), *Stroke Essentials 2010, Chapter 1: Overview of Stroke*, Jones & Bartlett Learning, pp. 3 - 16.
42. **Adamson R.H.** (2016). The acute lethal dose 50 (LD50) of caffeine in albino rats, *Regul Toxicol Pharmacol*, 80, pg 274-276
43. **Tattersall M.L.** (1982). Statistics and the LD50 study, *Arch Toxicol Suppl*, 5, pg 267-70.
44. **Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP et al** (2013). An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association, *Stroke*, 44(7), pg 2064-2089.
45. **Sun M.** (1983). Lots of talk about LD50, *Science*, 222(4628), pg 1106.

46. **Hsieh-Li H.M., Chang J.G., Jong Y.J. et al** (2000). A mouse model for spinal muscular atrophy, *Nat Genet*, 24(1), pg 66-70.
47. **Kim J.S.** (2014). *Pathophysiology of transient ischaemic attack and ischaemic stroke*, In *norrving B (ed), Oxford Textbook of stroke and cerebro-vascular disease*, Oxford Univ, Press.
48. **Bo Norrving, Didier Leys, Michael Brainin et al** (2013). Stroke Definition in the ICD-11 at the WHO, *World Neurology*, 31(1), pg 56-59.
49. **OECD** (2001). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, acute oral toxicity, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment, No 19.
50. **Arun Kumar Sharman** (1972). *Chromosome techniques, Theory and practice*, 2nd ed, Elsevier.
51. **B.H. Ch. Stricker** (1992). *Drug induced hepatic injury, Drug – induced disorder Vol.5*, Elsevier
52. **Hiroshi Sugimoriab, Heather Spellera, Seth P Finklestein** (2001). Intravenous basic fibroblast growth factor produces a persistent reduction in infarct volume following permanent focal ischemia in rats, *Neuroscience Letters*, Volume 300, Issue 1, pg 13-16.
53. **Hiroshi Sugimoriab, Hiroshi Yaobc, Hiroaki Ooboshi et al** (2004). Krypton laser-induced photothrombotic distal middle cerebral artery occlusion without craniectomy in mice, *Brain Research Protocols*, Volume 13, Issue 3, pg 189-196.
54. **Adewusi S.R., Oke O.L.** (1985). On the metabolism of amygdalin. 1. The LD50 and biochemical changes in rats, *Can J Physiol Pharmacol*, 63(9), pg 1080-1083.

55. **The Stroke Association** (2015), State of the National Stroke Statistic, Report, 1-40.
56. **Chiang T., Messing R.O. et al** (2011). Mouse model of middle cerebral artery occlusion, *J Vis Exp*, 1-3(48), pg e2761
57. **Dirnag Ulrich, Hermann Dirk M.** (2016). Rodent models of stroke, *Plos One*, pg 219-220.
58. **World Health Organization** (2015). Working group on the safety and efficacy of herbal medicine, Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization.
59. **Bei W., Peng W. et al** (2007). Neuroprotective effects of a standardized extract of diospyros kali leaves on MCAO transient focal cerebral ischemic rats and cultured neurons injured by glutamate or hypoxia, *Planta Med*, 73(7), pg 636-643.
60. **Watson, B. D., Dietrich, W. D., et al** (1985). Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Annals of Neurology*, 17(5), 497–504.
61. **Nakano-Doi, A.; Sakuma, R.; Matsuyama, T. And et al** (2018). Ischemic stroke activates the VE-cadherin promoter and increases VE-cadherin expression in adult mice. *Histol Histopathol.* 33, 507–521
62. **Nakano-Doi, A.; Nakagomi, T.; Fujikawa, M.; and et al** (2010) Matsuyama, T. Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. *Stem Cells*, 28, 1292–1302.
63. **Saino, O.; Taguchi, A.; Nakagomi, T. et al** (2010). Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke. *J Neurosci. Res*, 88, 2385–2397

64. **Sakuma, R.; Kawahara, M.; Nakano-Doi, A. and et al** (2016). Brain pericytes serve as microglia-generating multipotent vascular stem cells following ischemic stroke. *J Neuroinflamm.* 2016, 13, 57
65. **Kasahara, Y.; Nakagomi, T.; Matsuyama, T. and et al** (2012). Cilostazol reduces the risk of hemorrhagic infarction after administration of tissue-type plasminogen activator in a murine stroke model. *Stroke*, 43, 499–506.
66. **Lim, J., Jeong, C., Jun, J., Kim, S., Ryu, C., Hou, Y. et al** (2011). Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. *Stem Cell Research & Therapy*, 2(5), 38.
67. **Truelsen T, Begg S, Mathers C** (2015) *The global burden of cerebrovascular disease*, Global Burden of Disease
68. **Mihara H, Sumi H, Yoneta T, et al** (1991) A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Japanese Journal of Physiology*. 41(3):461–472
69. **Jin L, Jin H, Zhang G, Xu G** (2000). Changes in coagulation and tissue plasminogen activator after the treatment of cerebral infarction with lumbrokinase. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 23(2–4):213–218.
70. **Ahlemeyer B, Krieglstein J** (2003). Pharmacological studies supporting the therapeutic use of Ginkgo biloba extract for Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry*. 36 Suppl 1:S8-14. doi: 10.1055/s-2003-40454.
71. **Dubey AK, Shankar PR, Upadhyaya D, Deshpande VY** (2004). Ginkgo biloba--an appraisal. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)*. 2(3):225-9.

72. **Qiong Cheng, Fang Tong, Yuntian Shen, et al** (2019), “*Achyranthes bidentata* polypeptide k improves long-term neurological outcomes through reducing downstream microvascular thrombosis in experimental ischemic stroke”, *Brain Res*, 2019 Mar 1;1706:166-176
73. **Sung Min Ahn, Ha Neui Kim, Yu Ri Kim et al** (2016), Emodin from *Polygonum multiflorum* ameliorates oxidative toxicity in HT22 cells and deficits in photothrombotic ischemia, *J Ethnopharmacol*, 2016 Jul 21;188:13-20.
74. **Chang-Pei Xiang, Rui Zhou, Yi Zhang et al** (2020), Research progress on saponins in *Panax notoginseng* and their molecular mechanism of anti-cerebral ischemia, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2020 Jul;45(13):3045-3054.
75. **Imad A-J Thanoon, Hilmy As Abdul-Jabbar, Dhia A Taha** (2012), Oxidative Stress and C-Reactive Protein in Patients with Cerebrovascular Accident (Ischaemic Stroke): The role of *Ginkgo biloba* extract, *Sultan Qaboos Univ Med J*, 2012 May;12(2):197-205.
76. **Chung-Hsiang Liu, Yi-Wen Lin, Nou-Ying Tang, et al** (2012), Effect of oral administration of *Pheretima aspergillum* (earthworm) in rats with cerebral infarction induced by middle-cerebral artery occlusion, *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2012 Oct 1;10(1):66-82.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

[1]	Nguyễn Đạt Anh, Mai Duy Tôn (2016). <i>Điều trị tiêu huyết khối ở bệnh nhân nhồi máu não cấp</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[2]	Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự (2006). <i>Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam</i> , tập I, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
[3]	Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự (2006). <i>Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam</i> , tập II, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
[4]	Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự (2006). <i>Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam</i> , tập III, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
[5]	Bộ Y tế (2018). Thông tư 29/2018/TT-BYT, Thông tư quy định về thử thuốc trên lâm sàng.
[6]	Bộ Y tế (2015). Thông tư 05/2015/TT-BYT Ban hành các danh mục thuốc đông y, thuốc từ dược liệu và vị thuốc y học cổ truyền thuộc phạm vi thanh toán của bảo hiểm y tế.
[7]	Bộ Y tế (2012). Thông tư 03/2012/TT-BYT, Thông tư hướng dẫn về thử thuốc trên lâm sàng.
[8]	Bộ Y tế (2017). <i>Dược điển Việt Nam</i> , lần xuất bản thứ năm, tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[9]	Lê Quang Cường chủ biên (2015). <i>Hướng dẫn thử nghiệm phi lâm sàng và lâm sàng đông y, thuốc từ dược liệu</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[10]	Trần Chí Cường chủ biên (2016), <i>Chẩn đoán và điều trị bệnh mạch máu thần kinh – đột quy</i> , Nhà xuất bản Y học thành phố Hồ Chí

	Minh, Hồ Chí Minh.
[11]	Trịnh Bình Dy (2006). Sinh lý tế bào và màng tế bào; Tuần hoàn địa phương, <i>Sinh lý học</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, Tập 1, 36-50; 232-245.
[12]	Đỗ Trung Đàm (1996). <i>Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[13]	Nguyễn Văn Đăng (2000). <i>Tai biến mạch máu não – Chẩn đoán và điều trị</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[14]	Nguyễn Văn Đăng (2003). Tai biến mạch máu não, <i>Thực hành thần kinh các bệnh và hội chứng thường gặp</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 569-636.
[15]	Nguyễn Văn Đăng (2006). <i>Tai biến mạch máu não</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[16]	Nguyễn Văn Đăng (2001), <i>Đột quỵ não người trẻ, một số kinh nghiệm chẩn đoán, điều trị</i> , Hội thảo chuyên đề liên khoa, Báo cáo khoa học, Bệnh viện Bạch Mai, Hà Nội, tr 36-39.
[17]	Lê Đức Hình (2002). Một số đặc điểm dịch tễ học về tai biến mạch máu não tại Việt Nam, <i>Hội thảo quốc tế lần thứ nhất, chuyên đề tai biến mạch máu não</i> , Bệnh viện Bạch Mai, tr 35.
[18]	Lê Đức Hình (2009). “Tai biến mạch máu não”, <i>Thần kinh học trong thực hành đa khoa</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[19]	Nguyễn Nhược Kim chủ biên (2015). <i>Phương tễ học</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[20]	Hoàng Khánh (2008), Các yếu tố nguy cơ gây tai biến mạch máu não, <i>Tai biến mạch máu não hướng dẫn chẩn đoán và xử trí</i> , Hà Nội, Nhà xuất bản y học, tr.84-105.

[21]	Hoàng Khánh (2004), Các yếu tố nguy cơ của tai biến mạch máu não, <i>Thần kinh học lâm sàng</i> , Thành phố Hồ Chí Minh, Nhà xuất bản Y học, tr.164-170.
[22]	Trần Văn Kỳ (2014). <i>Dược học cổ truyền</i> . Nhà xuất bản Đồng Nai.
[23]	Đỗ Tất Lợi (2015). <i>Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[24]	Vũ Anh Nhị (2012), <i>Sổ tay lâm sàng thần kinh</i> , Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, Hồ Chí Minh, tr.73-102.
[25]	Vũ Anh Nhị (2013): <i>Thần kinh học</i> , Bộ môn Thần kinh, Đại học Y dược TPHCM, NXB Đại học Quốc gia TPHCM.
[26]	Vũ Anh Nhị, Nguyễn Bá Thắng (2012), Điều trị dự phòng trước và sau đột quy, <i>Chẩn đoán và điều trị tai biến mạch máu não</i> , Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh, TP Hồ Chí Minh, tr. 71 - 75.
[27]	Uông Ngang, Trần Văn Quảng dịch (2015). <i>Thang đầu ca quyết</i> , Nhà xuất bản Phương Đông.
[28]	Hoàng Duy Tân, Hoàng Anh Tuấn (2016). <i>Phương tế học</i> , Nhà xuất bản Thuận Hóa.
[29]	Lê Văn Thành (2015), "Mạng lưới chăm sóc đột quy chặng đường đã qua và tương lai", <i>Tạp chí y dược lâm sàng 108</i> , 10, tr.11 - 14.
[30]	Nguyễn Bá Thắng (2014), Bài giảng Đột quy - lâm sàng, chuẩn đoán và điều trị - Dành cho đối tượng sinh viên YDK và YHCT
[31]	Lê Văn Thịnh, Lê Đức Hình, Lê Trọng Luân, Nguyễn Chương (2000). Phân loại tai biến nhồi máu não, <i>Công trình nghiên cứu khoa học Bệnh viện Bạch Mai</i> , tr 417-422.
[32]	Đào Xuân Vinh (2008). <i>Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hóa</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

[33]	Viện dược liệu (2006). <i>Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo</i> , Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật.
[34]	Viện kiểm nghiệm (2005). Dự thảo hướng dẫn thử độc tính của thuốc

Tiếng Anh

[35]	AHFS (2019), <i>Clinical drug information</i> , Elsevier.
[36]	Lapchak Paul A. (2010). A critical assesment of edaravone acute ischemic stroke efficacy trials: Is edaravone an effective neuroprotective therapy?, <i>Expert opinion on pharmacotherapy</i> , 11(10), pg 1753-1763.
[37]	Eward S.C., Walker R. (1999). <i>Clinical pharmacy and therapeutics</i> , Churchill and Livingstone, 2nd ed.
[38]	LeBeau J.E. (1983). The role of the LD50 determination in drug safety evaluation, <i>Regul Toxicol Pharmacol</i> , 3(1), pg 71-74.
[39]	Shaheen E, Annette K and Magdalena H (2009). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. <i>Journal of Translational Medicine</i> , 7(1), 97-107.
[40]	Gerhard Vogel Hans (2012). <i>Drug discovery and evaluation Pharmacological assays</i> , Springer.
[41]	Goldszmidt, A. J., Caplan L. R. (2010), <i>Stroke Essentials 2010, Chapter 1: Overview of Stroke</i> , Jones & Bartlett Learning, pp. 3 - 16.
[42]	Adamson R.H. (2016). The acute lethal dose 50 (LD50) of caffeine in albino rats, <i>Regul Toxicol Pharmacol</i> , 80, pg 274-276
[43]	Tattersall M.L. (1982). Statistics and the LD50 study, <i>Arch Toxicol Suppl</i> , 5, pg 267-70.
[44]	Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP et al (2013). An updated

	definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association, <i>Stroke</i> , 44(7), pg 2064-2089.
[45]	Sun M. (1983). Lots of talk about LD50, <i>Science</i> , 222(4628), pg 1106.
[46]	Hsieh-Li H.M., Chang J.G., Jong Y.J. et al (2000). A mouse model for spinal muscular atrophy, <i>Nat Genet</i> , 24(1), pg 66-70.
[47]	Kim J.S. (2014). <i>Pathophysiology of transient ischaemic attack and ischaemic stroke</i> , In <i>norrving B (ed), Oxford Textbook of stroke and cerebro-vascular disease</i> , Oxford Univ, Press.
[48]	Bo Norrving, Didier Leys, Michael Brainin et al (2013). Stroke Definition in the ICD-11 at the WHO, <i>World Neurology</i> , 31(1), pg 56-59.
[49]	OECD (2001). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, acute oral toxicity, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment, No 19.
[50]	Arun Kumar Sharman (1972). <i>Chromosome techniques, Theory and practice</i> , 2nd ed, Elsevier.
[51]	B.H. Ch. Stricker (1992). <i>Drug induced hepatic injury, Drug – induced disorder Vol.5</i> , Elsevier
[52]	Hiroshi Sugimoriab, Heather Spellera, Seth P Finklestein (2001). Intravenous basic fibroblast growth factor produces a persistent reduction in infarct volume following permanent focal ischemia in rats, <i>Neuroscience Letters</i> , Volume 300, Issue 1, pg 13-16.
[53]	Hiroshi Sugimoriab, Hiroshi Yaobc, Hiroaki Ooboshi et al (2004).

	Krypton laser-induced photothrombotic distal middle cerebral artery occlusion without craniectomy in mice, <i>Brain Research Protocols</i> , Volume 13, Issue 3, pg 189-196.
[54]	Adewusi S.R., Oke O.L. (1985). On the metabolism of amygdalin. 1. The LD50 and biochemical changes in rats, <i>Can J Physiol Pharmacol</i> , 63(9), pg 1080-1083.
[55]	The Stroke Association (2015), State of the National Stroke Statistic, Report, 1-40.
[56]	Chiang T., Messing R.O. et al (2011). Mouse model of middle cerebral artery occlusion, <i>J Vis Exp</i> , 1-3(48), pg e2761
[57]	Dirnag Ulrich, Hermann Dirk M. (2016). Rodent models of stroke, <i>Plos One</i> , pg 219-220.
[58]	World Health Organization (2015). Working group on the safety and efficacy of herbal medicine, Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization.
[59]	Bei W., Peng W. et al (2007). Neuroprotective effects of a standardized extract of diospyros kali leaves on MCAO transient focal cerebral ischemic rats and cultured neurons injured by glutamate or hypoxia, <i>Planta Med</i> , 73(7), pg 636-643.
[60]	Watson, B. D., Dietrich, W. D., et al (1985). Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. <i>Annals of Neurology</i> , 17(5), 497–504.
[61]	Nakano-Doi, A.; Sakuma, R.; Matsuyama, T. And et al (2018). Ischemic stroke activates the VE-cadherin promoter and increases VE-cadherin expression in adult mice. <i>Histol Histopathol.</i> 33, 507–521
[62]	Nakano-Doi, A.; Nakagomi, T.; Fujikawa, M.; and et al (2010)

	Matsuyama, T. Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. <i>Stem Cells</i> , 28, 1292–1302.
[63]	Saino, O.; Taguchi, A.; Nakagomi, T. et al (2010). Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke. <i>J Neurosci. Res</i> , 88, 2385–2397
[64]	Sakuma, R.; Kawahara, M.; Nakano-Doi, A. and et al (2016). Brain pericytes serve as microglia-generating multipotent vascular stem cells following ischemic stroke. <i>J Neuroinflamm.</i> 2016, 13, 57
[65]	Kasahara, Y.; Nakagomi, T.; Matsuyama, T. and et al (2012). Cilostazol reduces the risk of hemorrhagic infarction after administration of tissue-type plasminogen activator in a murine stroke model. <i>Stroke</i> , 43, 499–506.
[66]	Lim, J., Jeong, C., Jun, J., Kim, S., Ryu, C., Hou, Y. et al (2011). Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. <i>Stem Cell Research & Therapy</i> , 2(5), 38.
[67]	Truelsen T, Begg S, Mathers C (2015) <i>The global burden of cerebrovascular disease</i> , Global Burden of Disease
[68]	Mihara H, Sumi H, Yoneta T, et al (1991) A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, <i>Lumbricus rubellus</i> . <i>Japanese Journal of Physiology</i> . 41(3):461–472
[69]	Jin L, Jin H, Zhang G, Xu G (2000). Changes in coagulation and tissue plasminogen activator after the treatment of cerebral infarction with lumbrokinase. <i>Clinical Hemorheology and</i>

	<i>Microcirculation</i> . 23(2–4):213–218.
[70]	Ahlemeyer B, Krieglstein J (2003). Pharmacological studies supporting the therapeutic use of Ginkgo biloba extract for Alzheimer's disease. <i>Pharmacopsychiatry</i> . 36 Suppl 1:S8-14. doi: 10.1055/s-2003-40454.
[71]	Dubey AK, Shankar PR, Upadhyaya D, Deshpande VY (2004). Ginkgo biloba--an appraisal. <i>Kathmandu Univ Med J (KUMJ)</i> . 2(3):225-9.
[72]	Qiong Cheng, Fang Tong, Yuntian Shen, et al (2019), “ <i>Achyranthes bidentata</i> polypeptide k improves long-term neurological outcomes through reducing downstream microvascular thrombosis in experimental ischemic stroke”, <i>Brain Res</i> , 2019 Mar 1;1706:166-176
[73]	Sung Min Ahn, Ha Neui Kim, Yu Ri Kim et al (2016), Emodin from <i>Polygonum multiflorum</i> ameliorates oxidative toxicity in HT22 cells and deficits in photothrombotic ischemia, <i>J Ethnopharmacol</i> , 2016 Jul 21;188:13-20.
[74]	Chang-Pei Xiang, Rui Zhou, Yi Zhang et al (2020), Research progress on saponins in <i>Panax notoginseng</i> and their molecular mechanism of anti-cerebral ischemia, <i>Zhongguo Zhong Yao Za Zhi</i> , 2020 Jul;45(13):3045-3054.
[75]	Imad A-J Thanoon, Hilmy As Abdul-Jabbar, Dhia A Taha (2012), Oxidative Stress and C-Reactive Protein in Patients with Cerebrovascular Accident (Ischaemic Stroke): The role of Ginkgo biloba extract, <i>Sultan Qaboos Univ Med J</i> , 2012 May;12(2):197-205.
[76]	Chung-Hsiang Liu, Yi-Wen Lin, Nou-Ying Tang, et al (2012), Effect of oral administration of <i>Pheretima aspergillum</i> (earthworm) in

	rats with cerebral infarction induced by middle-cerebral artery occlusion, <i>Afr J Tradit Complement Altern Med</i> , 2012 Oct 1;10(1):66-82.
--	--