

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



NGUYỄN THỊ BẢO AN

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP, BÁN TRƯỜNG DIỄN
VÀ TÁC DỤNG TÂN TẠO MẠCH MÁU NÃO CỦA
BÀI THUỐC “THÔNG MẠCH VINTONG” TRÊN
ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SỸ Y HỌC

HÀ NỘI – 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



NGUYỄN THỊ BẢO AN

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP, BÁN TRƯỜNG DIỄN
VÀ TÁC DỤNG TÂN TẠO MẠCH MÁU NÃO CỦA
BÀI THUỐC “THÔNG MẠCH VINTONG” TRÊN
ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC

Chuyên ngành: Y học cổ truyền

Mã số: 872 0115

Người hướng dẫn khoa học:

Hướng dẫn 1: TS. NGUYỄN DUY TUÂN

Hướng dẫn 2: PGS.TS. ĐẬU XUÂN CẢNH

HÀ NỘI – 2020

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 TS. Nguyễn Duy Tuân và 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 quan tâm, tạo 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

Nguyễn Thị Bảo An

LỜI CAM ĐOAN

Luận văn này do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của Thầy TS. Nguyễn Duy Tuân, PGS.TS. Đậu 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 trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày.....tháng.....năm.....

Người viết cam đoan

Nguyễn Thị Bảo An

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

| Viết tắt | Tiếng Việt | Tiếng Anh |
|------------------|---|--|
| ALT | Chỉ số enzyme gan | Alanin Amino Transferase |
| AST | Chỉ số enzyme gan | Aspartat Amino Transferase |
| CCA | Động mạch cảnh chung | Common carotid artery |
| D ₀ | Ngày đầu uống thuốc | Date 0 |
| D ₄₅ | Ngày thứ 45 sau uống thuốc | Date 45 |
| D ₉₀ | Ngày thứ 90 sau uống thuốc | Date 90 |
| ECA | Động mạch cảnh ngoài | External carotid artery |
| IgG | Globulin miễn dịch | Immunoglobulin G |
| IgM | Globulin miễn dịch | Immunoglobulin M |
| HE×400 | Nhuộm Hematoxylin - Eosin, độ phóng đại 400 lần | Hematoxylin - Eosin |
| LD ₅₀ | Độc tính cấp | Lethal dose, 50% |
| MCA | Động mạch não giữa | Middle cerebral artery |
| MCAO | Thuyên tắc động mạch não giữa | |
| NK | Tế bào diệt tự nhiên | Natural killer cell |
| OECD | Tổ chức hợp tác và phát triển kinh tế | Organisation for Economic Co-operation and Development |
| 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. Tổng quan về một số phương pháp xác định tính an toàn của thuốc ở giai đoạn tiền lâm sàng | 3 |
| 1.1.1. Xác định độc tính cấp | 3 |
| 1.1.2. Xác định độc tính bán trường diễn | 5 |
| 1.1.3. Xác định độc tính trường diễn | 6 |
| 1.1.4. Xác định độc tính trên di truyền | 7 |
| 1.1.5. Xác định độc tính sinh ung thư..... | 8 |
| 1.1.6. Xác định độc tính trên chức năng sinh sản và phát triển..... | 9 |
| 1.2. Tổng quan về đột quỵ não theo y học hiện đại | 12 |
| 1.2.1. Khái niệm..... | 12 |
| 1.2.2. Phân loại | 12 |
| 1.2.3. Cơ chế bệnh sinh..... | 12 |
| 1.2.4. Cơ chế hồi phục tổn thương trong đột quỵ não | 13 |
| 1.3. Tổng quan về mô hình thiếu máu não cục bộ | 13 |
| 1.3.1. Một số mô hình thiếu máu não | 14 |
| 1.3.2. Mô hình gây tắc động mạch não giữa (MCAO)..... | 14 |
| 1.4. Tổng quan về đột quỵ não theo y học cổ truyền | 15 |
| 1.4.1. Đặc điểm lâm sàng Trúng phong..... | 15 |
| 1.4.2. Điều trị trúng phong..... | 19 |
| 1.5. Tổng quan về “Thông mạch Vintong” | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 1.5.1. Xuất xứ | 22 |
| 1.5.2. Thành phần | 22 |
| 1.5.3. Cơ chế tác dụng | 23 |
| Chương 2 CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU..... | 28 |
| 2.1. Chất liệu nghiên cứu..... | 28 |
| 2.2. Đối tượng nghiên cứu..... | 29 |
| 2.2.1. Độc tính cấp..... | 29 |
| 2.2.2. Độc tính bán trường diễn..... | 29 |
| 2.2.3. Mô hình đột quy não..... | 29 |
| 2.3. Thời gian và địa điểm tiến hành nghiên cứu..... | 29 |
| 2.4. Phương pháp nghiên cứu..... | 29 |
| 2.4.1. Độc tính cấp..... | 29 |
| 2.4.2. Độc tính bán trường diễn..... | 32 |
| 2.4.3. Quy trình nghiên cứu độc tính bán trường diễn..... | 32 |
| 2.4.4. Mô hình đột quy não..... | 34 |
| 2.4.5. Phương pháp đánh giá kết quả..... | 37 |
| 2.5. Phương pháp xử lý số liệu..... | 37 |
| Chương 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU | 38 |
| 3.1. Độc tính cấp của dịch chiết “Thông mạch Vintong” | 38 |
| 3.2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn..... | 39 |
| 3.2.1. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng của chuột cống trắng khi dùng dài ngày..... | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.2. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” đối với một số chỉ tiêu huyết học của chuột. | 40 |
| 3.2.3. Đánh giá mức độ hủy hoại tế bào gan khi dùng dịch chiết “Thông mạch Vintong” dài ngày. | 43 |
| 3.2.4. Đánh giá ảnh hưởng lên chức năng gan khi dùng dịch chiết “Thông mạch Vintong” dài ngày. | 44 |
| 3.2.5. Đánh giá ảnh hưởng lên chức năng thận khi dùng dịch chiết “Thông mạch Vintong” dài ngày. | 46 |
| 3.2.6. Kết quả mô bệnh học tạng của chuột thí nghiệm | 47 |
| 3.3. Đánh giá tác dụng tân tạo mạch máu não sau đột quỵ của dịch chiết “Thông mạch Vintong” trên động vật thực nghiệm. | 51 |
| Chương 4 BÀN LUẬN | 54 |
| 4.1. Bàn luận về độc tính cấp của bài thuốc “Thông mạch Vintong” trên động vật thực nghiệm | 54 |
| 4.1.1. Về độc tính cấp của bài thuốc “Thông mạch Vintong” | 54 |
| 4.1.2. Về độc tính bán trường diễn của bài thuốc “Thông mạch Vintong” | 55 |
| 4.2. Bàn luận về tác dụng tân tạo mạch máu não sau đột quỵ của bài thuốc “Thông mạch Vintong” trên động vật thực nghiệm. | 61 |
| KẾT LUẬN..... | 64 |
| KIẾN NGHỊ..... | 66 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | |
| PHỤ LỤC | |

DANH MỤC BẢNG

| | |
|--|----|
| Bảng 2.1. Thành phần “Thông mạch Vintong” | 26 |
| Bảng 3.1. Độ tính cấp đường uống của dịch chiết “Thông mạch Vintong” trên chuột nhắt trắng..... | 38 |
| Bảng 3.2. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” đối với thể trọng chuột..... | 39 |
| Bảng 3.3. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột..... | 40 |
| Bảng 3.4. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột..... | 41 |
| Bảng 3.5. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên số lượng bạch cầu và tiểu cầu trong máu chuột..... | 42 |
| Bảng 3.6. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” đối với hoạt độ AST và ALT..... | 43 |
| Bảng 3.7. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên các chỉ số albumin và bilirubin toàn phần trong máu..... | 44 |
| Bảng 3.8. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên cholesterol toàn phần trong máu..... | 45 |
| Bảng 3.9. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên hàm lượng creatinin máu chuột..... | 46 |
| Bảng 3.10. Mật độ vi mạch ở các lô chuột nghiên cứu..... | 52 |

DANH MỤC SƠ ĐỒ

| | |
|--|----|
| Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu độc tính cấp..... | 29 |
| Sơ đồ 2.2. Sơ đồ nghiên cứu độc tính bán trường diễn..... | 32 |
| Sơ đồ 2.3. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng tăng tân tạo mạch máu của “Thông mạch Vintong” trên chuột nhắt trắng đột quy não..... | 34 |

DANH MỤC HÌNH VẼ

| | |
|--|----|
| Hình 2.1. Hình ảnh minh họa mô hình gây nhồi máu não..... | 36 |
| Ảnh 1: Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô chứng (chuột 06, lô chứng)..... | 47 |
| Ảnh 2: Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô trị 1 (chuột 12, lô trị 1).... | 47 |
| Ảnh 3: Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô trị 2 (chuột 24, lô trị..... | 47 |
| Ảnh 4: Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng (chuột 8, lô chứng)..... | 48 |
| Ảnh 5: Hình ảnh vi thể gan chuột lô trị 1 (chuột 16, lô trị 1)..... | 49 |
| Ảnh 6: Hình ảnh vi thể gan chuột lô trị 2 (chuột 22, lô trị 2)..... | 49 |
| Ảnh 7: Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng (chuột 9, lô chứng)..... | 49 |
| Ảnh 8: Hình ảnh vi thể lách chuột lô trị 1 (chuột 18, lô trị 1)..... | 50 |
| Ảnh 9: Hình ảnh vi thể lách chuột lô trị 2 (chuột 27, lô trị 2)..... | 50 |
| Ảnh 10: Hình ảnh vi thể thận chuột lô chứng (chuột 3, lô chứng)..... | 50 |
| Ảnh11: Hình ảnh vi thể thận chuột lô trị 1 (chuột 14, lô trị 1)..... | 51 |
| Ảnh12: Hình ảnh vi thể thận chuột lô trị 2 (chuột 26, lô trị 2)..... | 51 |
| Ảnh 13: Hình ảnh hóa mô miễn dịch huỳnh quang (độ phóng đại x 100) nhuộm CD31 đánh giá tân tạo mạch máu não sau đột quy..... | 51 |
| Ảnh 14: Hình ảnh hóa mô miễn dịch huỳnh quang nhân kép (độ phóng đại x 400) nhuộm CD31 (màu xanh) và VEGF (màu đỏ) đánh giá tân tạo mạch máu não sau đột quy | 53 |

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO - World Health Organization), đột quy não là một hội chứng lâm sàng “được đặc trưng bởi sự khởi phát đột ngột của các triệu chứng biểu hiện tổn thương của não (thường là khu trú), tồn tại trên 24 giờ hoặc bệnh nhân tử vong trước 24 giờ” [1]. Những triệu chứng thần kinh khu trú phù hợp với vùng não do động mạch bị tổn thương phân bố, loại trừ nguyên nhân chấn thương [2], [3]. Năm 2013, Hội đồng Đột quy Hoa Kỳ nhóm họp và đưa ra cập nhật định nghĩa đột quy não của thế kỷ 21: “Đột quy não hay nhồi máu hệ thần kinh trung ương (Central nervous system infarction) được định nghĩa là tình trạng chết tế bào não, tùy sống hoặc vãng mạng do thiếu máu, dựa trên giải phẫu bệnh, chẩn đoán hình ảnh thần kinh, và/hoặc các bằng chứng lâm sàng của tổn thương vĩnh viễn” [4]. Điều trị đặc hiệu ở giai đoạn sớm hiện nay được ưu tiên hàng đầu là các thuốc tiêu huyết khối (đường tĩnh mạch hoặc động mạch) kết hợp với lấy huyết khối bằng dụng cụ cơ học [5], tuy nhiên, vẫn có một tỷ lệ nhỏ bệnh nhân không đáp ứng điều trị và để lại những di chứng nặng nề về vận động, làm suy giảm chất lượng cuộc sống [1], [6].

Hiện nay, xu thế sử dụng thảo dược trong điều trị đang ngày càng phổ biến, không những chỉ ở các nước Châu Á mà cả khu vực Châu Âu bởi thành phần hóa học đa dạng, đa mục tiêu, thuốc y học cổ truyền dần chứng minh được hiệu quả trên những nhóm bệnh lý phức tạp. Năm 2018, Bộ y tế ra thông tư số 29/2018/TT-BYT hướng dẫn việc thử nghiệm lâm sàng giai đoạn I trên người khỏe mạnh của các thuốc mới yêu cầu cần có những khẳng định về tính an toàn với những chứng cứ rõ ràng trên thực nghiệm (độc tính cấp, bán cấp, bán trường diễn, trường diễn, gây mô hình bệnh...)[7]. Cùng với thông tư 05/2015/TT-BYT hướng dẫn về việc sử dụng đúng tên dược liệu y học cổ truyền và chấp nhận tính an toàn của các bài thuốc cổ phương, thuốc y học cổ

truyền từ đó cũng được bào chế dưới nhiều dạng sử dụng hơn nhằm mục đích tăng tối đa mức độ tuân thủ điều trị của bệnh nhân [8].

“Thông mạch Vintong” là bài thuốc nghiệm phương của Phó giáo sư, tiến sĩ Đậu Xuân Cảnh có tác dụng hoạt huyết, khứ ứ, hành khí, được sử dụng điều trị hoặc dự phòng đột quỵ nhồi máu não. Để có thêm cơ sở khoa học đưa viên hoàn ứng dụng trên lâm sàng, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài **“Nghiên cứu độc tính cấp, bán trường diễn và tác dụng tân tạo mạch máu não của bài thuốc “Thông mạch Vintong” trên động vật thực nghiệm”** với 2 mục tiêu sau:

- 1. Xác định độc tính cấp, bán trường diễn của bài thuốc “Thông mạch Vintong” trên động vật thực nghiệm.*
- 2. Đánh giá tác dụng tân tạo mạch máu sau đột quỵ của bài thuốc “Thông mạch Vintong” trên động vật thực nghiệm.*

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về một số phương pháp xác định tính an toàn của thuốc ở giai đoạn tiền lâm sàng

1.1.1. Xác định độc tính cấp

1.1.1.1. Mục tiêu

Thử độc tính cấp nhằm cung cấp thông tin cho việc xếp loại mức độ độc của thuốc; điều trị ngộ độc cấp; thiết lập mức liều cho những thử nghiệm độc tính tiếp theo [9]. Do vậy, các phép thử độc tính cấp cần xác định:

- Liều an toàn;
- Liều dung nạp tối đa;
- Liều gây ra độc tính có thể quan sát được;
- Liều thấp nhất có thể gây chết động vật thí nghiệm (nếu có);
- Liều LD₅₀ gần đúng (nếu có thể xác định được);
- Những triệu chứng ngộ độc điển hình có thể quan sát được trên động vật và khả năng hồi phục (nếu có) [10].

1.1.1.2. Động vật thực nghiệm

Động vật nghiên cứu: thử ít nhất trên 2 loài động vật có vú, trong đó có một loài không gặm nhấm. Tùy điều kiện, có thể chấp nhận thử độc tính cấp trên một loài động vật.

- Loài gặm nhấm thường sử dụng là chuột nhắt, chuột cống.
- Loài không gặm nhấm có thể dùng là chó hoặc khỉ.

Nên sử dụng số lượng động vật thí nghiệm nhỏ nhất, tùy theo mô hình áp dụng (thường là 3 đến 5 con/mức liều) [11].

1.1.1.3. Đường dùng

Theo đường dự kiến dùng cho người (đường uống, tiêm, hô hấp).

1.1.1.4. *Mức liều thử*

Một số mô hình được dùng với số lượng động và số liều dùng ít nhất như:

- Mô hình liều cố định: thử với một số liều cố định 5, 50, 300, 2000, 5000mg/kg [32]. Dùng 5 con vật cho mỗi nhóm, thử lần lượt từng mức liều một. Lựa chọn liều khởi đầu là một trong số các liều cố định đã gợi ý, tùy theo kết quả đáp ứng của liều khởi đầu mà tiến hành thử tiếp những mức liều cao hơn hoặc thấp hơn [29]. Thử nghiệm sẽ được tiếp tục cho đến khi xác định được một mức liều gây độc tính rõ ràng, hoặc liều gây chết không quá 1 con, hoặc liều cao nhất không gây ảnh hưởng gì hoặc mức liều thấp nhất gây chết động vật thí nghiệm [12], [13].

- Mô hình phân loại độc: thử theo quy trình bậc thang, mỗi bước dùng 3 con cùng giới (uống một trong các mức liều đã được xác định). Tùy theo động vật có chết hay không ở một bước thử mà xác định cho bước thử tiếp theo, như không cần thử thêm nữa, hoặc thử thêm 3 con vật nữa với cùng mức liều đó hoặc thử thêm trên 3 con nữa ở mức liều cao hơn hoặc thấp hơn [14].

- Mô hình thử Tăng - Giảm: thử lần lượt các liều đơn đã được định trước, mỗi liều ở một thời điểm, cách nhau tối thiểu là 48 giờ. Con vật đầu tiên uống ở mức liều thấp hơn gần nhất với liều ước tính LD₅₀ [15]. Nếu con vật đó sống thì liều cho con tiếp theo sẽ tăng 3,2 lần so với liều vừa thử trước đó, còn nếu bị chết thì giảm liều xuống 3,2 lần. Quan sát cẩn thận tình trạng từng con vật trong suốt 48 giờ để quyết định nên cho con tiếp theo uống hay không và cho uống với liều bao nhiêu [16].

- Mô hình theo Litchfield – Wilcoxon: Động vật thường dùng là chuột nhắt trắng, cả 2 giống, trọng lượng $20 \pm 2g$, được chia thành từng lô, mỗi lô 10 con. Số lượng khoảng 100 con. Cho từng lô chuột uống thuốc thử với các liều khác nhau từ liều cao nhất không gây chết tới liều thấp nhất gây chết

100% chuột. Chuột được uống thuốc bằng kim hơi cong có đầu tù với độ dài đưa vào đến dạ dày chuột. Chuột được nhịn ăn 12 giờ trước khi uống thuốc, vẫn uống nước đầy đủ [17], [18].

1.1.1.5. Chỉ tiêu theo dõi

- Tình trạng chung của chuột: hoạt động tự nhiên, tư thế, màu sắc (mũi, tai, đuôi), lông, phân, nước tiểu...

- Tỷ lệ chuột chết trong vòng 72 giờ.

- Khi có chuột chết, mổ để quan sát đại thể các cơ quan phủ tạng. Nếu cần, làm thêm vi thể để xác định nguyên nhân [19].

1.1.2. Xác định độc tính bán trường diễn

1.1.2.1. Mục tiêu

Thử độc tính bán trường diễn chỉ tiến hành sau khi đã có thông tin về độc tính cấp trên một loài nào đó và mẫu thử được dự định dùng dài ngày trên người. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn để xác định được:

- Mức liều tối đa không gây ra những thay đổi đáng kể tới một số chỉ tiêu của sự sống;
- Mức liều tối đa có thể gây ra những thay đổi đáng kể một số chỉ tiêu cho sự sống khi dùng nhiều lần (nếu có);
- Những độc tính có thể quan sát được trên động vật và khả năng phục hồi nếu có thể [20].

1.1.2.2. Động vật thực nghiệm

Động vật nghiên cứu: thử ít nhất trên 2 loài động vật có vú, trong đó có một loài không gặm nhấm. Tùy điều kiện, có thể chấp nhận thử độc tính bán trường diễn trên một loài động vật.

- Loài gặm nhấm thường sử dụng là chuột nhắt, chuột cống.
- Loài không gặm nhấm có thể dùng là chó hoặc khỉ.

1.1.2.3. Đường dùng

Theo đường dự kiến dùng cho người (đường uống, tiêm, hô hấp).

1.1.2.4. Mức liều thử

Thử nghiệm nên được thực hiện với 3 mức liều

- Liều thấp: không gây ảnh hưởng độc nào trên động vật thí nghiệm
- Liều trung bình: mức liều có thể không gây những độc tính quan sát được hoặc gây ảnh hưởng không đáng kể
- Liều cao: mức liều dự kiến sẽ quan sát được biểu hiện ngộ độc trên động vật thí nghiệm.

Thử nghiệm nên được tiến hành song song với một nhóm chứng [20].

1.1.2.5. Thời gian thử nghiệm

Thời gian thử thuốc trên động vật được tính dựa theo thời gian dự kiến dùng trên người. Có thể áp dụng 2 mô hình thời gian thử trên động vật như sau:

- Thử độc theo mô hình “liều nhắc lại” với 3 mức thời gian cố định: 14 ngày, 28 ngày và 90 ngày.
- Thời gian thử thuốc được tính bằng 3-4 lần thời gian dự kiến dùng trên người [21].

1.1.2.6. Chỉ tiêu theo dõi

- Theo dõi hàng ngày tình trạng của động vật thí nghiệm.
- Xác định các chỉ tiêu đánh giá như trọng lượng, các chỉ số sinh hóa, huyết học. Tiến hành mổ để quan sát đại thể các tổ chức, so sánh với nhóm chứng, nếu cần thiết có thể quan sát vi thể. Theo dõi khả năng phục hồi cần bổ sung số con vật thí nghiệm muốn giữ lại để theo dõi sau khi hết thời gian dùng thuốc [20].

1.1.3. Xác định độc tính trường diễn

1.1.3.1. Mục tiêu

Mục tiêu của thử nghiệm độc tính trường diễn tương tự của độc tính bán trường diễn. Tuy nhiên, thử độc tính trường diễn là cần thiết đối với các thuốc được dùng lâu dài trong điều trị.

Động vật nghiên cứu: thử ít nhất trên 2 loài động vật có vú, trong đó có một loài không gặm nhấm. Tùy điều kiện, có thể chấp nhận thử độc tính trường diễn trên một loài động vật.

- Loài gặm nhấm thường sử dụng là chuột nhắt, chuột cống.
- Loài không gặm nhấm có thể dùng là chó, khỉ hoặc vượn.

1.1.3.2. Đường dùng

Theo đường dự kiến dùng cho người (đường uống, tiêm, hô hấp).

1.1.3.3. Mức liều thử

Thử nghiệm cũng được tiến hành với 3 mức liều tương tự như thử độc tính bán trường diễn và được tiến hành song song với một nhóm chứng.

1.1.3.4. Thời gian thử nghiệm

Thời gian thử nghiệm ít nhất là 6 tháng hoặc 9 tháng hoặc 1 năm [12].

1.1.3.5. Chỉ tiêu theo dõi

Tương tự thử độc tính bán trường diễn.

1.1.4. Xác định độc tính trên di truyền

Hiện nay thường dùng 2 phương pháp nghiên cứu độc tính của thuốc trên di truyền:

- Nghiên cứu độc tính gây đột biến nhiễm sắc thể ở mức tế bào
- Nghiên cứu độc tính gây đột biến gen ở mức hóa học, hoặc xác định gián tiếp qua biểu hiện ở thế hệ con [12].

1.1.4.1. Phương pháp nghiên cứu đột biến nhiễm sắc thể

Động vật nghiên cứu

Thường sử dụng chuột nhắt và chuột cống.

Đường dùng

Theo đường dự kiến dùng cho người trên lâm sàng

Thời gian dùng thuốc

Có thể cho chuột dùng thuốc nhiều đợt, mỗi đợt 5-7 ngày, nghỉ xen kẽ 5-7 ngày giữa các đợt, hoặc dùng liên tục 30 ngày.

Chỉ tiêu đánh giá

Đánh giá đột biến nhiễm sắc thể của tế bào tủy xương và tế bào tinh hoàn qua các tiêu bản.

Chỉ tiêu theo dõi là những thay đổi về số lượng trên bội, dưới bội và những thay đổi về cấu trúc như nhạt khuyết nhạt kép, đứt đơn và đứt kép nối nhiễm sắc tử, rối loạn kiểu nhiễm sắc thể như đứt đoạn, mất đoạn, đảo đoạn, nhân đoạn, nhòe, nát cả cụm.

1.1.4.2. Phương pháp nghiên cứu đột biến gen

Thường sử dụng chuột nhắt hoặc chuột cống trong thử nghiệm.

Đường dùng thuốc như dự kiến dùng trên người.

Kỹ thuật phát hiện đột biến gen rất phức tạp. Hiện nay thường gián tiếp dựa vào những tính trạng của thế hệ con, kết quả của tổ chức đực cái [19].

1.1.5. Xác định độc tính sinh ung thư

1.1.5.1. Mục tiêu

Mục tiêu của nghiên cứu độc tính sinh ung thư nhằm xác định liều cao nhất không gây ra sự biến đổi về số lượng và khối u đồng thời xác định liều thấp nhất gây ra sự thay đổi về số lượng và khối lượng khối u trên động vật thí nghiệm.

1.1.5.2. Động vật thực nghiệm

Thường dùng chuột cống trắng hoặc thỏ. Cũng có thể dùng chuột nhắt trắng hoặc chuột hamster. Sử dụng cả đực và cái.

1.1.5.3. Đường dùng

Nên dùng đường dùng dự kiến trên lâm sàng.

1.1.5.4. Mức liều thử

Thường dùng 3 mức liều, xác định một liều qua thử nghiệm sơ bộ, sau đó dùng thêm một liều gấp đôi và một liều bằng một nửa.

1.1.5.5. Thời gian thử nghiệm

- Thời gian dùng thuốc khoảng 24-30 tháng đối với chuột cống trắng; 18-24 tháng đối với chuột nhắt trắng hoặc chuột hamster.
- Thời gian thử nghiệm phải kéo dài thêm 1-3 tháng sau khi ngừng thuốc, hoặc khi số con vật trong lô dùng thuốc hoặc lô chứng chết 75% thì kết thúc thí nghiệm [16].

1.1.5.6. Chỉ tiêu theo dõi

- Theo dõi tình trạng hàng ngày của động vật thí nghiệm.
- Xác định trọng lượng của động vật (trong tháng đầu, theo dõi hàng tuần, sau đó 1 tháng một lần).
- Xét nghiệm mô bệnh học: quan sát vi thể và đại thể, đặc biệt là các khối u ở các cơ quan và mô của tất cả các con vật vừa mới chết và tất cả các con vật hấp hối, triển vọng sẽ chết. Xác định tỷ lệ số lượng khối u, khối lượng khối u của các con vật.
- So sánh các chỉ tiêu trên giữa nhóm dùng thuốc và nhóm chứng [20].

1.1.6. Xác định độc tính trên chức năng sinh sản và phát triển

1.1.6.1. Mục tiêu

Nghiên cứu độc tính trên chức năng sinh sản và phát triển nhằm xác định liều không gây ảnh hưởng đến động vật bố mẹ và con, để có nhận định về liều an toàn và liều bắt đầu có ảnh hưởng đến thể hệ động vật bố mẹ và động vật thế hệ sau.

1.1.6.2. Dùng thuốc nghiên cứu sớm và trong giai đoạn sớm của thai kì

Động vật thí nghiệm

Thường dùng chuột cống trắng, chuột nhắt trắng, thỏ

Đường dùng

Là đường dùng trên lâm sàng ở người

Liều dùng

Thường dùng 3 liều khác nhau: liều thấp, liều trung bình và liều cao. Nên dùng liều hơn kém nhau 2 lần.

Thời gian dùng thuốc

- Con đực: dùng chuột 40 ngày tuổi. Cho dùng thuốc liên tục 60 ngày hoặc nhiều hơn trước khi ghép đôi và tiếp tục dùng cho đến khi thấy giao phối.

- Con cái: dùng thuốc hàng ngày trước khi ghép ít nhất 14 ngày, trong khi ghép đôi và sau khi thấy giao phối, cho đến khi chuẩn bị bắt đầu giai đoạn tạo thành cơ quan của thai [12].

Chỉ tiêu theo dõi

- Biểu hiện bên ngoài, cân nặng

- Sau khi giao phối thành công, sau từng thời kì (cần xác định độc tính trên giai đoạn nào), mổ chuột cái. Xác định số lượng hoàng thể, số thai đậu, số thai chết.

- Nếu có chuột không thấy giao phối, sau một thời gian thích hợp, mổ chuột để quan sát đại thể các cơ quan, đặc biệt là cơ quan sinh sản, xem xét ảnh hưởng như thế nào mà chuột không thụ tinh được [14].

1.1.6.3. Dùng thuốc trong giai đoạn hình thành các cơ quan của thai

Động vật thí nghiệm

Thường dùng chuột, thỏ, loại đã giao phối có kết quả

Đường dùng

Theo đường dự kiến dùng trên lâm sàng cho người

Liều dùng

Thường dùng 3 liều khác nhau: liều thấp, liều trung bình và liều cao. Nên dùng liều hơn kém nhau 2 lần.

Thời gian dùng thuốc

Cho động vật thử nghiệm dùng thuốc từ khi bắt đầu thấy có giao phối đến khi tạo thành các cơ quan của thai và mổ con mẹ.

Chỉ tiêu theo dõi

- Biểu hiện bên ngoài, cân nặng
- Đến giai đoạn hoàn thành sớm sự phát triển của các cơ quan thai, chuột cống trắng hoặc chuột nhắt trắng sẽ được mổ 2/3 số động vật và mổ 100%. Xác định số chuột mẹ có thai, số chuột mẹ có thai chết, số lượng và khối lượng, hình thái thai còn sống.
- Số chuột mẹ còn lại, đẻ đẻ tự nhiên, xem số lượng chuột dị dạng.
- Số chuột con đẻ ra: số lượng chuột con trong 1 ổ, tỷ lệ chuột con chết, khối lượng chuột con đẻ ra, quan sát bộ phận sinh dục và hình thái chuột con.
- Sự lớn lên và phát triển của chuột con: theo dõi sự lớn lên, sự phát triển, hành vi giao phối, khả năng có thai và sinh con [14].

Dùng thuốc trong thời kì chu sinh và nuôi con bú.

Động vật thí nghiệm

Thường dùng chuột cống trắng, chuột nhắt trắng có thai chuẩn bị đẻ.

Đường dùng thuốc

Theo đường dùng dự kiến trên lâm sàng cho người

Thời gian dùng thuốc

- Cho sinh: từ khi chuẩn bị đẻ đến khi đẻ xong
- Cho con bú: từ khi đẻ xong đến khi ngừng cho con bú

Chỉ tiêu theo dõi

- Biểu hiện bên ngoài, cân nặng
- Để chuột đẻ tự nhiên và nuôi con tự nhiên: con mẹ đẻ ra có gì bất thường không, tỷ lệ chuột con chết, thay đổi cơ quan sinh dục và hình thái bên ngoài, khối lượng từng chuột con.
- Theo dõi chuột con lớn lên và phát triển: sự lớn lên, sự phát triển, khả năng có thai và sinh con [19].

1.2. Tổng quan về đột quỵ não theo y học hiện đại

1.2.1. Khái niệm

Theo định nghĩa của Tổ chức y tế thế giới (WHO- World Health Organization), đột quỵ não là dấu hiệu phát triển nhanh trên lâm sàng của một rối loạn khu trú chức năng của não kéo dài trên 24 giờ và thường do nguyên nhân mạch máu [22].

1.2.2. Phân loại

Dựa vào tiêu chuẩn của WHO (1989), đột quỵ não gồm hai loại chính:

- Nhồi máu não hoặc thiếu máu não cục bộ: Là tình trạng khi một mạch máu bị tắc hoặc nghẽn, khu vực não mà mạch máu đó cung cấp bị thiếu máu và hoại tử.

- Chảy máu não: Máu thoát khỏi mạch máu chảy vào nhu mô não. Có thể chảy máu ở nhiều vị trí trong não, vùng bao trong, vùng nhân xám trung ương, thùy não, thân não, tiểu não [23].

Theo thống kê trên thế giới và Việt Nam hiện nay tỷ lệ nhồi máu não chiếm 60 – 70% các đột quỵ não, tỷ lệ chảy máu não khoảng 20 – 30% [24].

1.2.3. Cơ chế bệnh sinh

1.2.3.1. Chảy máu não

Có hai thuyết:

- **Thuyết vỡ các túi phồng vi thể của Charcot và Bouchard (1868):** Do tình trạng tăng huyết áp kéo dài làm giảm tính đàn hồi chủ yếu là các động mạch nhỏ, Khi có tăng huyết áp các động mạch này có những nơi phình ra tạo các vi phình mạch Charcot và Bouchard. Những túi phình động mạch não có thể bẩm sinh, có thể được hình thành do tổn thương thành động mạch. Khi có sự gắng sức hoặc cơn tăng huyết áp kịch phát, các vi phình mạch này có thể vỡ gây ra chảy máu não.

- **Thuyết xuyên mạch của Rouchoux (1884):** Do động mạch bị xơ vữa hoặc kích thích co thắt không đều, chỗ giãn chỗ hẹp gây thoát hồng cầu và huyết tương thành các ổ nhỏ, rồi các ổ nhỏ tập trung thành ổ lớn [25].

1.2.3.2. Nhồi máu não

Giai đoạn đầu lớp áo trong của thành mạch bị xơ vữa trở nên thô ráp tạo điều kiện cho tiểu cầu bám vào. Vì cục máu tắc cấu tạo bởi tiểu cầu nên không bền và dễ vỡ, có thể tự tan đi hoặc có thể do tuần hoàn bàng hệ hình thành kịp thời tưới bù cho vùng thiếu máu, cho nên trên lâm sàng có thể nhận thấy một số trường hợp phục hồi hoàn toàn trong 24 giờ. Giai đoạn sau, chỗ vữa xơ ngoài tiểu cầu còn có hồng cầu, sợi tơ huyết bám vào nên cục máu tắc bền hơn và khi bong ra trôi lên não gây tắc mạch gây thiếu máu não cục bộ [3].

1.2.4. Cơ chế hồi phục tổn thương trong đột quy não

Khi đột quy xảy ra cứ mỗi phút qua đi tại vùng não tổn thương do động mạch bị tắc có hàng triệu tế bào não chết đi không hồi phục, tổn thương nghiêm trọng nhất là vùng hoại tử, đây là vùng não không còn khả năng cứu chữa. Các tế bào xung quanh tổn thương trong đột quy gọi là vùng “tranh tối tranh sáng”. Các tế bào này mặc dù chưa chết nhưng đã giảm chuyển hóa đến mức tối thiểu vì vậy gần như mất chức năng.

Như vậy, mục tiêu của việc điều trị đột quy là không để cho các tế bào này chết và bình thường hóa hoạt động của nó. Vì vậy, nhiều tác giả còn gọi vùng này là “vùng điều trị”. Tất cả các can thiệp thuốc hay các phương pháp trị liệu khác sau giai đoạn cấp nhằm cứu vãn các tế bào vùng này [3], [25].

1.3. Tổng quan về mô hình thiếu máu não cục bộ

Để hiểu rõ hơn về cơ chế bệnh sinh của đột quy thiếu máu não cục bộ 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.

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 [26], [27].

1.3.1. Một số mô hình thiếu máu não

1.3.1.1. Thiếu máu não toàn thể

- Tắc 2 CCA + hạ huyết áp
 - Tắc cả 4 động mạch nuôi não
 - Ngừng tuần hoàn [27]
 - Thiếu máu não cục bộ
 - Phẫu thuật sọ não
- + Tạm thời: phẫu thuật kẹp/tái tưới máu, huyết khối tại chỗ/ly giải [26].
- + 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 [27].

1.3.2. Mô hình gây tắc động mạch não giữa (MCAO)

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 [26].

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) [28].

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 nilon 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 [27].

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 của “Thông mạch Vintong” [28].

1.4. Tổng quan về đột quy não theo y học cổ truyền

1.4.1. Đặc điểm lâm sàng Trúng phong

1.4.1.1. Bệnh danh "Trúng phong"

Trong YHCT thuật ngữ "Trúng phong" được Trương Trọng Cảnh ghi trong sách "Kim quỹ yếu lược" và được dùng liên tục cho đến ngày nay. Ngoài ra sách còn ghi chép nhiều thuật ngữ khác như: Bộc kích, Thiên khô, Thiên phong, Thiên thân bất dạng [29], [30], [31]. Vương Thanh Nhiệm đời nhà Thanh có ghi "Bán thân bất toại".

Ngày nay sách y học cổ truyền cũng như các thầy thuốc thực hành lâm sàng lấy tên "trúng phong hoặc bán thân bất toại" và mô tả, biện chứng trong hai thể "trúng phong kinh lạc và trúng phong tạng phủ" [30], [32].

1.4.1.2. Phân loại "Trúng phong"

Việc phân loại trúng phong có từ rất lâu nhằm nâng cao hiệu quả điều trị và phòng bệnh, tùy thuộc vào mức độ bệnh, chứng trạng, độ nông hay sâu mà đề ra pháp luận trị phù hợp. "Y kinh tố hội tập" của Vương Lữ chia làm hai loại: chân trúng phong và loại trúng phong. Sách Kim quỹ yếu lược của Trương Trọng Cảnh có ghi "trúng phong" và "phi phong". Dương Trang Tử chia hai loại của trúng phong "chứng bế" và "chứng thoát" [33], [34].

Ngày nay trong các sách y học cổ truyền và y văn hiện đại, chứng trúng phong được chia làm hai loại: Trúng phong kinh lạc và trúng phong tạng phủ.

- Trúng phong kinh lạc: Mức độ biểu hiện triệu chứng nhẹ, không có hôn mê, tà khí trúng vào phần kinh mạch, lạc mạch gây miệng méo, tê bại nửa người, rêu lưỡi trắng [35], [36].

- Trúng phong tạng phủ: Biểu hiện triệu chứng nặng do tà khí trực trúng vào tạng, phủ biểu hiện hai mức độ:

*Chứng bế: Hôn mê nông, liệt nửa người, ú ớ, thở khò khè, miệng méo, mắt lệch, chân tay còn ấm, mạch hoạt [35], [36].

*Chứng thoát: Hôn mê sâu, thở khò khè, ra nhiều mồ hôi, chân tay lạnh, đại tiện không tự chủ, lưỡi rụt, mạch huyền tế vô lực [35], [36].

1.4.1.3. Nguyên nhân, cơ chế bệnh sinh Trúng phong

- Nguyên nhân:

Theo y học cổ truyền, nguyên nhân gây bệnh được chia làm ba loại: Ngoại nhân (lục dâm), Nội nhân (thất tình) và bất nội ngoại nhân. Việc phân định nguyên nhân chính yếu hay thứ yếu không thể rạch ròi mà thường có sự đan xen, kết hợp nhau gây bệnh. Mặc dù vậy nguyên nhân tập trung vào ba nhóm gây bệnh chính là phong, hỏa và đàm.

+ Nguyên nhân do Phong: Phong chủ khí về mùa xuân, thuộc dương khí, di chuyển đi lên và ra ngoài. Bên ngoài gây bệnh ở biểu, cơ khớp, cảm mạo, viêm dây thần kinh ngoại vi; bên trong thường gây tăng huyết áp, bán thân bất toại, bại liệt, mê man bất tỉnh, miệng lưỡi méo, cứng [35], [36].

* Ngoại phong: Gây bệnh trên cơ sở nội tại hư yếu, lạc mạch hư rỗng, khởi đầu từ biểu dẫn vào lý. Sách Nội kinh đã ghi "Thiên khô" thuộc về chứng "chính khí hư, tà khí lưu lại". Sách Kim quỹ yếu lược cũng đề cập đến ngoại phong "mạch thốn khẩu phù khẩn, khẩn là hàn, phù là hư", nội hư không bảo vệ được cơ thể, ngoại tà thừa cơ xâm nhập, lưu lại gây méo miệng, tê bại nửa người [34], [37], [38].

* Nội phong: Diệp Thiên Sĩ cho rằng trúng phong là do nội phong liên quan trực tiếp đến Can mộc. Can huyết hư không chế ước được phần dương, Can dương thượng nhiều gây nên bệnh [38]. Trúng phong do nội phong liên quan đến Can Thận âm hư, lý giải dựa trên mối quan hệ ngũ tạng: Thận tàng tinh, tinh sinh huyết, huyết sinh tinh. Trên cơ sở đó Can âm được thủy hóa nuôi dưỡng mà chế được Can dương. Trường hợp thận thủy suy mà không dưỡng được Can mộc gây chứng Can âm suy, Can dương vượng (Can hỏa vượng) gây ảnh hưởng đến phần âm của Thận mà gây ra Thận âm hư [37].

+ Nguyên nhân do Hỏa: Hỏa và nhiệt thuộc dương tà, hướng đi lên, bên ngoài kết hợp với phong, thấp, thử mà biểu hiện các chứng phong nhiệt, thấp nhiệt, thử nhiệt, bên trong gây chứng Tâm hỏa, Can hỏa, nhẹ thì gây hao tổn tân dịch, nặng thì gây động huyết, bức huyết vong hành, sốt cao mê sảng [39], [40]. Trường hợp Can khí uất kết lâu ngày hóa hỏa, Can hỏa thịnh gây chứng huyễn vựng, không được điều trị dẫn đến Can phong nội động mà bị trúng phong [38], [39], [40].

+ Nguyên nhân do Đàm: Nguồn gốc sinh ra đàm là do chức năng của Tỳ, Phế, Thận suy giảm, không vận hóa, túc giáng, khí hóa được thủy dịch làm đình trệ

mà sinh ra đàm [38], [39], [40]. Đàm kết hợp với Phong, Nhiệt, Hàn, và Thấp mà gây chứng Phong đàm, Nhiệt đàm, Hàn đàm, Thấp đàm. Đàm ở Phế ảnh hưởng đến chức năng tuyên phát, tức giáng gây hen suyễn, lâu ngày gây tổn thương Phế âm. Đàm ở Tâm gây bút rút, phiền muộn, mất ngủ, lâu ngày gây tắc trở thần minh, che lấp tâm khiếu mà sinh ra điên cuồng, lưỡi rứt, thất ngôn. Đàm uất ở Can, ngưng ở Thận, lưu ở kinh lạc mà gây bệnh chứng của Can, Thận và Kinh lạc [40], [41].

- Cơ chế bệnh sinh của trúng phong

Trúng phong không nằm ngoài hai cơ chế: Trúng ngoại tà và nội thương. Tuy nhiên mỗi thời kỳ có những quan điểm và thiên hướng khác nhau. Để nâng cao năng lực chẩn đoán và trị bệnh, ngày nay các tác giả tập trung biện chứng cơ chế bệnh sinh trúng phong theo từng thể của y học cổ truyền [38], [39], [42].

+ Nội phong gây "trúng phong" thể Can dương thượng cương: Do mất cân bằng giữa Can dương và Can âm (Can huyết), Can huyết hư không dưỡng được Can dương, làm cho phần dương của Can vượng mạnh gây phong động, kết hợp với nhiệt thúc phong đi lên mà thành bệnh [38], [43].

+ Nội phong gây "trúng phong" thể Tâm hỏa thịnh: Lưu Hà Gian lý giải: Thận thủy hư suy, Thận âm không chế ước được Hỏa, Tâm hỏa thượng nghịch mà thành bệnh [38], [43].

+ Nội phong gây "trúng phong" thể khí hư: Lý Đông Viên cho rằng bệnh liên quan đến tuổi và thể chất, "người ngoài bốn mươi tuổi là lúc khí hư suy hoặc lo nghĩ, giận dữ mà tổn thương phân khí" [38], [43], [44].

+ Nội phong gây "trúng phong" thể Can Thận âm hư: Người tuổi cao, chức năng tạng phủ hư suy, hoặc do lao lực quá độ mà Can Thận âm hư, Can dương vượng, âm dương mất điều hòa, âm hư ở dưới, dương phù ở trên, còn gọi thượng thực hạ hư [42], [43].

+ Nội phong gây "trúng phong" thể đàm nhiệt tắc trở: Do ăn uống quá độ, lo nghĩ căng thẳng mà ảnh hưởng đến chức năng kiện vận của Tỳ thổ sinh ra đàm, lâu ngày đàm trọc hóa nhiệt, nhiệt cực sinh phong.

1.4.2. Điều trị trúng phong

1.4.2.1. Nguyên tắc điều trị trúng phong

- Nguyên tắc chung: Cấp trị tiêu, hoãn trị bản.
- Nguyên tắc trị bệnh theo học thuyết vệ - khí - dinh - huyết [45], [46].
- Thông dinh vệ, điều hòa hàn nhiệt, ích khí bổ huyết, áp dụng khí vệ khí hư, phong tà xâm nhập gây bệnh.
- Khu phong thanh nhiệt, bổ hư hạ đàm, áp dụng khí dương khí kém, phong tà tấn công vào "kinh" hóa nhiệt.
- Dưỡng huyết khu phong: Áp dụng trường hợp phong gây tổn thương vào phần huyết làm huyết hư, phong động.
- Ích khí hoạt huyết: Áp dụng điều trị huyết hư và huyết ứ.
- Thông phủ tiết trọc: Áp dụng điều trị khí huyết nghịch, rối loạn nhị tiện.
- Tĩnh thần khai khiếu: Áp dụng điều trị âm dương không điều hòa, nội phong thượng nghịch kết hợp đàm hỏa.
- Bình can tiềm dương: Điều trị âm hư dương xung, điều hòa âm dương, khí huyết.
- Thanh nhiệt hóa đàm: Áp dụng điều trị nhiệt đàm che lấp thanh khiếu gây mê man, bất tỉnh.

1.4.2.2. Điều trị trúng phong

Trúng phong kinh lạc: Biểu hiện triệu chứng liệt nửa người không có hôn mê, bao gồm các thể sau [38], [47], [48]

=> Thể Can phong nội động:

- + Triệu chứng: Liệt nửa người, hoa mắt, váng đầu, chân tay co quắp, mặt, mắt đỏ, hay cáu giận, mạch huyền sắc...
- + Pháp điều trị: Bình can tức phong.

+ Thuốc: Sử dụng bài Thiên ma câu đằng ẩm: Thiên ma, Câu đằng, Thạch quyết minh, Chi tử, Hoàng cầm, Ngưu tất, Đỗ trọng, Ích mẫu, Tang ký sinh, Dạ giao đằng, Phục thần [49].

=> Thể phong đàm tắc trở:

+ Triệu chứng: Liệt nửa người, miệng lưỡi méo, nói khó, chân tay tê bì, lưỡi tím, mạch huyền hoạt [37], [49].

+ Pháp điều trị: Khu phong thông lạc hóa đàm.

+ Thuốc: Bài Hóa đàm thông lạc: Đờm nam tinh, Bán hạ chế, Thiên ma, Phục linh, Bạch truật, Đan sâm, Thiên trúc hoàng, Đại hoàng, Hương phụ.

=> Thể đàm nhiệt phủ thực:

+ Triệu chứng: Liệt nửa người, bút rút, miệng méo, nói khó, bụng đầy chướng, tăng tiết đờm rãi, mặt đỏ, bí đại tiểu tiện, mạch huyền đại [37], [49].

+ Pháp điều trị: Thông tiện, tiết nhiệt hóa đàm.

+ Thuốc: Sử dụng bài Tinh lâu thừa khí thang: Qua lâu nhân, Đờm nam tinh, Đại hoàng, Mang tiêu. Sau thông tiện, tiết nhiệt cần sử dụng pháp: thanh nhiệt hóa đàm thông lạc để tránh tổn thương khí.

=> Thể khí hư huyết ứ:

+ Triệu chứng: Liệt nửa người, chân tay mềm yếu, nói khó, miệng lưỡi méo lệch, mệt mỏi, ngại vận động, hồi hộp trống ngực, tự hãn, lưỡi đỏ, có điểm ứ huyết, mạch hư tế [37], [49].

+ Pháp điều trị: Ích khí hoạt huyết thông lạc

+ Thuốc: Sử dụng bài Bô dương hoàn ngũ thang: Hoàng kỳ, Quy vĩ, Xích thực, Đan sâm, Xuyên khung, Hồng hoa, Đào nhân, Địa long.

=> Thể âm hư dương xung:

Triệu chứng: Liệt nửa người, miệng méo, nói ngọng, mất ngủ, chóng mặt, lòng bàn tay chân nóng, lưỡi hồng, mạch huyền sắc [37], [49].

+ Pháp điều trị: Tư âm tiềm dương, trấn can tức phong.

+ Thuốc: Bài Trấn can tức phong thang: Long cốt, Mẫu lệ, Huyền sâm, Thiên môn, Quy bản, Ngưu tất, Bạch thược, Nhân trần, Mạch nha, Xuyên luyện tử, Cam thảo.

- Trúng phong tạng phủ: Biểu hiện triệu chứng nặng, liệt nửa người có hôn mê, gồm các chứng:

=> Dương bế:

+ Triệu chứng: Đột nhiên ngã, bất tỉnh, hôn mê, miệng méo, liệt nửa người, mặt mắt đỏ, cứng gáy, chân tay co quắp, mạch huyền sắc [37], [49].

+ Pháp điều trị: Thanh nhiệt tức phong, tỉnh thần khai khiếu. Trường hợp đàm hỏa thịnh: Thanh nhiệt tiêu đàm, khai khiếu tỉnh thần.

+ Thuốc sử dụng bài "Thiên ma câu đằng" kết hợp "Chí bảo đơn" đối với phong hỏa thịnh và bài "Linh dương giác" kết hợp với "Tô hợp hương" đối với đàm hỏa thịnh.

=> Âm bế

+ Triệu chứng: Hôn mê, liệt nửa người, chân tay lạnh, mềm nhũn, thờ khờ khờ, nhiều đờm rãi, nói khó, nói ngọng, sắc mặt trắng, môi tím, lưỡi tím, mạch trầm hoạt [37], [49].

+ Pháp điều trị: Táo thấp hóa đàm, khai khiếu tỉnh thần.

+ Thuốc: Bài "Địch đàm thang": Đờm nam tinh, Bán hạ, Chỉ thực, Thạch xương bồ, Trần bì, Trúc nhự, Phục linh, Sinh khương, Nhân sâm, Cam thảo.

=> Thoát chứng:

Triệu chứng: Hôn mê, ra nhiều mồ hôi, mắt mở, miệng há, chân tay liệt mềm, thờ yếu, sắc mặt trắng, đại tiểu tiện không tự chủ, chất lưỡi tím, mạch vi muôn tuyệt [37], [49].

+ Pháp điều trị: Ích khí ôn dương, phù chính cố thoát.

+ Thuốc: Bài "Sâm phụ thang" gồm nhân sâm, Phụ tử chế, Sinh khương, có thể kết hợp cứu, day ấn huyết nhân trung, thần khuyệt, khí hải, thiên khu.

- Điều trị hỗ trợ trúng phong bằng An cung ngưu hoàng hoàn

+ Thành phần: Ngưu hoàng 30g, Hùng hoàng 30g, Băng phiến 7,5g, Uất kim 30g, Chu sa 30g, Xạ hương 7,5g, Sừng tê giác 3g (hiện nay thay bằng sừng trâu nước - Thủy ngưu giác 30g), Chi tử 30g, Trân châu 15g, Hoàng liên 30g, Hoàng cầm 30g [50].

+ Bào chế viên hoàn: 3g/viên, bảo quản bọc nhũ, quả sáp, sản xuất tại Đồng Nhân đường, Bắc Kinh, Trung Quốc.

+ Tác dụng: thanh nhiệt, khai khiếu, trừ đàm giải độc [50].

+ Liều dùng: người lớn 01 viên/24giờ, uống 3 đến 5 ngày. Trẻ em liều bằng một nửa người lớn.

1.5. Tổng quan về “Thông mạch Vintong”

1.5.1. 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, khứ ứ, hành khí, giúp làm tiêu cục máu đông, được sử dụng trong điều trị và dự phòng đột quy nhồi máu não.

1.5.2. Thành phần

Bài thuốc 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 ứ; 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 ứ trệ, tan huyết khối. Các vị thuốc trong bài phối hợp có tác dụng chính hoạt huyết, khứ ứ, hành khí.

1.5.3. Cơ chế tác dụng

1.5.3.1. Theo dược lý học hiện đại

Đình lăng có chứa nhiều saponin, có tác dụng tăng sức dẻo dai của cơ thể, kích thích các hoạt động của não bộ [51].

Cúc hoa có tác dụng giải độc, làm sáng mắt [30].

Bạch quả có tác dụng tăng cường trí nhớ [48].

Ngưu tất có tác dụng giãn mạch, hạ áp, lợi tiểu [30].

Son tra có tác dụng hạ áp, tăng lưu lượng máu mạch vành, giãn mạch [31].

Tam thất có chứa 2 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 [52].

Địa long có tác dụng hạ huyết áp và chống co giật, tăng hoạt tính ly giải của fibrin, chống hình thành huyết khối [31].

Thủy điệt có tác dụng chống đông máu [54].

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 [55].

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 chóng 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 [55].

Xích thực 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 [33].

1.5.3.2. Theo phối ngũ lập phương y học cổ truyền

- Đinh lăng có vị ngọt, hơi đắng, tính bình, quy vào kinh Phê, tỳ, thận.

Thành phần: Trong thân củ đã tìm thấy có các alcaloit, glucozit, saponin, flavonoit, tanin, vitamin B1 các axit amin trong đó có lyzin, xystei, và methionin.

Có tác dụng thông huyết mạch, bồi bổ khí huyết, lợi sữa, giải độc. Chủ trị: Suy nhược cơ thể và suy nhược thần kinh, tiêu hóa kém, ngủ kém, phụ nữ sau đẻ ít sữa [30], [33].

- Ngưu tất vị đắng, chua, bình, quy kinh Can Thận.

Thành phần: Saponin khi thủy phân cho acid oleanic, galactoza, rhamnoza, glucoza; Ecdysteron, inokosteron và muối kale.

Có tác dụng hoạt huyết thông kinh, mạnh gân cốt, bổ can thận. Chủ trị: Dùng trị đau lưng gối, mỏi gân xương; bế kinh, kinh nguyệt không đều, tăng huyết áp [56], [33].

- Sơn tra vị chua ngọt, tính hơi ôn, quy kinh Tỳ Vị Can

Thành phần: axit xitric, vitamin C, hydrat cacbon và protit, 2,76% tamin, 16,4% chất đường, 2,7% axit hữu cơ.

Có tác dụng tiêu thực tích, hành ú, hóa đàm. Chủ trị: ăn không tiêu, đau bụng, đầy trướng, ợ chua, đàm ẩm, bụng kết hòn cục, sản hậu ứ huyết, đau bụng [55].

- Hà thủ ô vị đắng, ngọt, sáp, hơi ôn, quy kinh Can thận.

Thành phần: Củ chứa: 1,7% antraglucosid trong đó chủ yếu là: emodin, chrysophanola, rhein. Ngoài ra còn có 1,1% protid, 45,2% tinh bột, 3,1% chất béo, 4,5% chất vô cơ, 26,4% các chất tan trong nước, lecitin. Sau khi chế, còn 3,82% tanin. 0,1127%, dẫn chất anthraquinon tự do và 0,2496% dẫn chất anthraquinon toàn phần.

Có tác dụng dưỡng huyết, bổ can thận, nhuận tràng thông tiện, làm xanh tóc. Chủ trị: Huyết hư thiếu máu, da xanh, gầy, đau lưng, di tinh, tóc bạc sớm, táo bón [56], [33].

- Tam thất vị ngọt hơi đắng, ôn, quy kinh Can, Vị.

Thành phần: Thành phần chủ yếu là saponin (4,42-12,00%), thuộc kiểu protopanaxadiol và protopanaxatriol. Nhiều ginsenoid và glucoginsenoid. Ngoài ra còn có các notoginsenoid, tinh dầu, flavonoid, phytosterol (β -sitosterol, stigmasterol, daucosterol), polysaccarid.

Có tác dụng tán ứ, chỉ huyết, tiêu sưng, giảm đau. Chủ trị: Các loại chảy máu, nhất là chảy máu có ứ huyết như: thổ huyết, khối huyết, nục huyết, tiểu tiện ra huyết, sưng đau do chấn thương, ngực bụng đau nhói [57], [33].

- Địa long vị mặn tính hàn, quy kinh Can, tỳ, phế, bàng quang.

Thành phần: Lumbroferine, Lumbritin, Terrestro-lumbrolysin, Hypoxathine, Xan thine, Adenine, Guanine, Choline, Guanidine, nhiều loại Acid amin, Vitamin và muối hữu cơ.

Có tác dụng thanh nhiệt, trấn kinh, thông kinh lạc, bình suyễn, lợi niệu. Chủ trị: Sốt cao bất tỉnh, kinh gân co quắp, đau khớp, chân tay tê bại, bán thân bất toại, trúng phong ho suyễn do phế nhiệt, phú thũng, tiểu ít, cao huyết áp [30], [33].

- Thủy điệt vị mặn đắng, tính ôn và hơi độc, quy kinh Can.
Có tác dụng Hoạt huyết, giải thông ứ trệ, tan huyết khối [52], [54].
- Xuyên khung vị cay, tính ôn, quy kinh Can Đởm, Tâm bào.

Thành phần: Một ancaloit dễ bay hơi, công thức $C_{27}H_{37}N_3$; một axit $C_{10}H_{10}O_4$ với tỷ lệ chừng 0,02 gần giống axit ferulic, một chất có tính chất phenola với công thức $C_{24}H_{46}O_4$ hoặc $C_{23}H_{44}O_4$, độ chảy $108^{\circ}C$, một chất trung tính có công thức $C_{26}H_{28}O_4$, độ chảy $98^{\circ}C$.

Thuốc có tác dụng hành khí, hoạt huyết, trừ phong, giảm đau. Chủ trị: Điều kinh, nhức đầu, hoa mắt, cảm mạo phong hàn, phong thấp nhức mỏi, ngực bụng đau tức, nhọt độc sưng đau [35], [33].

- Xích thược vị chua, đắng, tính hơi hàn qui kinh can tỳ.

Thành phần: Tinh bột, tanin, nhựa, chất đường, sắc tố và acid benzoic. Tỷ lệ acid benzoic trong Xích thược là thấp hơn Bạch thược(0,92%), tinh dầu, Xích thược tố A, Paeoniflorin.

Có tác dụng lương huyết, tán ứ, giảm đau. Chủ trị: Ôn độc phát ban, ỉa máu, chảy máu cam, mắt đỏ sưng đau, can uất, sườn đau, kinh bế, hành kinh đau bụng, hòn cục trong bụng, sưng đau do sang chấn, nhọt độc sưng đau [54], [55].

- Cúc hoa vị ngọt, đắng, tính lương. Quy vào các kinh tỳ vị, phế, thận.

Thành phần: Carotenoid (chrysanthemoxanthin); Tinh dầu trong đó có α -pinen, β -pinen, sabinen, cadinol, cineol, α – terpinen, myrcen..; Sesquiterpen: Angelyl cumambrin B, artelasin A, angeloyajadin, yejuhua lacton, handelin, ...; Flavonoid; Acid amin: adenin, cholin, stachydrin. Các thành phần khác gồm: indicumenon, β –snosterol, α -amyrin, β –amyrin, vitamin A...

Có tác dụng thanh nhiệt, giải độc, tán phong, minh mục. Chủ trị: Các chứng hoa mắt, chóng mặt, nhức đầu, đau mắt đỏ, chảy nhiều nước mắt, huyết áp cao, đình độc mụn nhọt, sưng đau [58], [55].

- Chỉ xác vị đắng, cay, tính lương. Quy vào kinh tỳ, vị.

Thành phần: Tinh dầu (α -Pinene, Limonene, Camphene, Terpinene, p-Cymene, Caryophyllene, flavonoid (Hesperidin, Neohesperidin, Naringin), pectin, saponin, alcaloid, acid hữu cơ.

Có tác dụng phá khí đờm tiêu tích (Hòa hoãn hơn Chỉ thực). Chữa ngực trướng đau do khí trệ, khó tiêu do đờm trệ [56], [55].

- Bạch quả vị đắng, ngọt, tính bình, quy kinh Phế tỳ.

Thành phần: Hạt hàm chứa 4-O-methylpyridoxine, gọi là ginkgotoxin. Còn hàm chứa 6- (pentadec-8-enyl-2,4-dihydroxybenzoic acid, 6-tridecyl-2,4-dihydroxybenzoic acid, anacardic acid và kali, lân, magiê, canxi, kẽm, đồng v.v... Nhân hàm chứa protein, chất béo, carbohydrate, đường v.v...

Có tác dụng liễm phế, định suyễn, chỉ đờm trọc, súc tiêu tiện, điều trị chứng chữa ho, hen, đờm suyễn, đái đục, đái nhiều, đái són, đái dầm [35], [32], [33].

- Đông trùng hạ thảo vị ngọt, tính ôn, quy kinh phế, thận.

Thành phần: chứa 25 – 32% protid, khi thủy phân cho tới 14 – 19 axit amin khác nhau như: aspartic acid, glutamic acid, serine, histidine...; 8,4% chất béo; 7 – 29% D-manitol; các vitamin như: A, B1, B2, B12, C và các nguyên tố vi lượng: Na, K, Ca, Mg, Al, Mn, Cu, Zn, Bo, Fe, Tc... trong đó cao nhất là phosphorum. Ngoài ra, các chất khác như uracil, adenine, adenine nucleoside, ergosterol, cholesteryl palmitate...

Có tác dụng ích phế, thận, bổ tinh tủy, hóa đờm, dùng chữa hư lao sinh ho, ho ra máu, liệt dương, lưng gối đau mỏi, di tinh. Chữa thần kinh suy nhược.

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 “Thông mạch Vintong”

| Tên vị thuốc | Tên khoa học [8] | 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 |
| Son 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 [55]. 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. 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 nhất

trắng (hệ số quy đổi là 12) thì liều dự kiến trên chuột nhất trắng là 5,92g/kg/24h. Quy đổi ra liều trên chuột cống (hệ số 7) là 15,12g/kg/24h.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

2.2.1. Độ tính cấp

Chuột nhất trắng chủng Swiss, cả 2 giống, khoẻ mạnh, trọng lượng 18 – 22g do Ban chăn nuôi - Học viện Quân Y cung cấp.

2.2.2. Độ tính bán trường diễn

Chuột cống trắng chủng Wistar, trọng lượng 180 ± 20 g do Ban chăn nuôi – Học viện Quân Y cung cấp.

2.2.3. Mô hình đột quy não

Chuột nhất 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 được tiến hành trong thời gian từ tháng 6/2020 đến tháng 10/2020 tại Học viện Quân Y.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Độ tính cấp

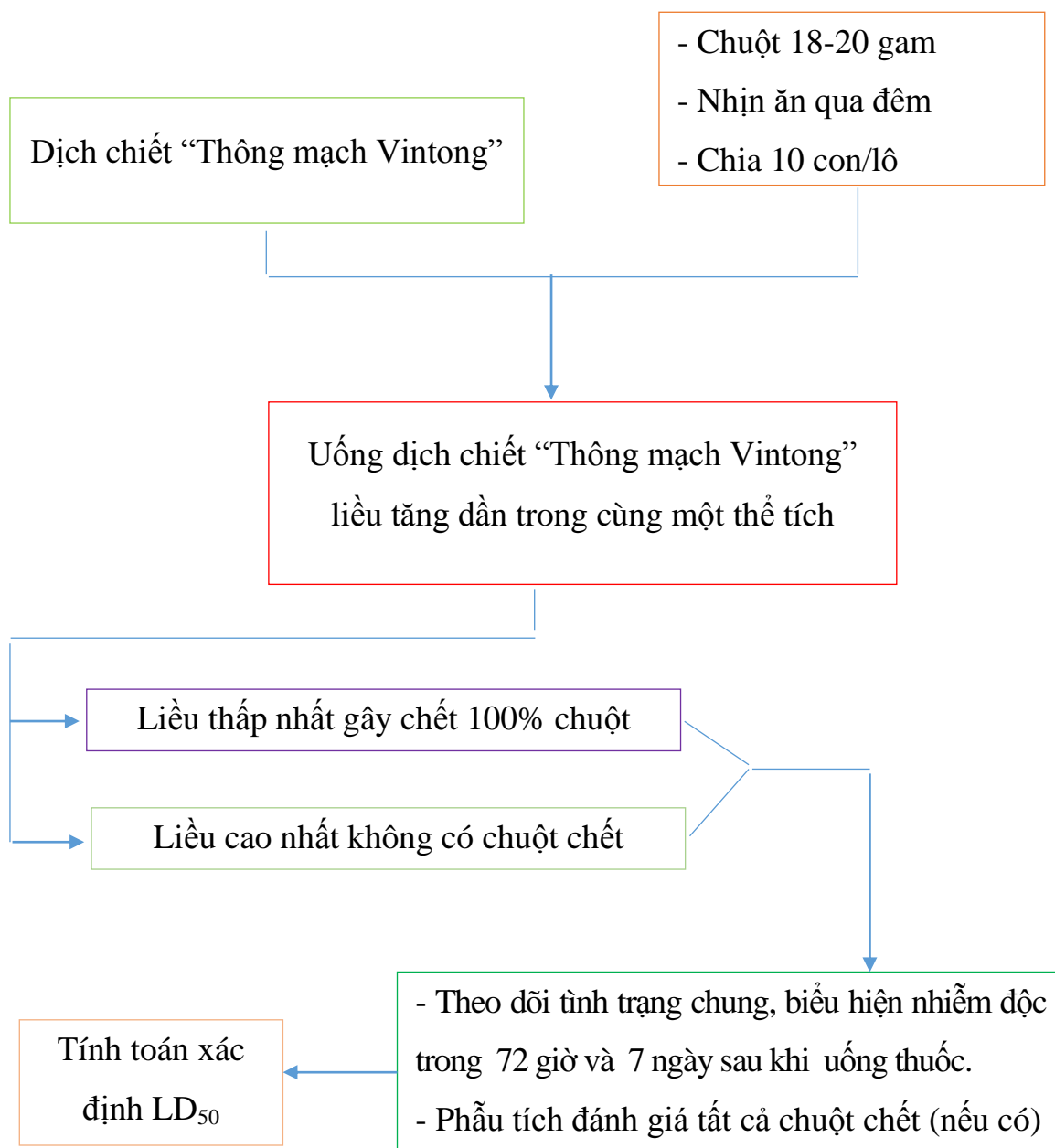
2.4.1.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu độ tính cấp và xác định LD₅₀ của “Thông mạch Vintong” trên chuột nhất trắng theo đường uống theo hướng dẫn của OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development - Tổ chức hợp tác và phát triển kinh tế) [37], [38], [39].

2.4.1.2. Cỡ mẫu

Mẫu nghiên cứu là 60 chuột nhất trắng được chia làm 6 lô, mỗi lô 10 con và được uống dịch chiết “Thông mạch Vintong” với liều tăng dần.

2.4.1.3. Quy trình nghiên cứu



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu độc tính cấp

2.4.1.4. Chỉ tiêu theo dõi

- Số chuột chết/có biểu hiện bất thường trong suốt 7 ngày và tỷ lệ chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc.
- Liều thuốc thử.
- Các chỉ số liên quan đến tình trạng chung của chuột: ăn, ngủ, vận động, bài tiết...
- Các chỉ số liên quan đến dấu hiệu nhiễm độc: nôn, co giật, kích động, bài tiết...

2.4.1.5. Công cụ sử dụng trong nghiên cứu

- Cân điện tử của Nhật, độ chính xác 0,001 gam.
- Kim đầu tù cho chuột uống thuốc.
- Cốc chia vạch, bơm kim tiêm 1ml.

2.4.1.6. Phương pháp tiến hành

Chuẩn bị mẫu thử

Dịch chiết “Thông mạch Vintong” được cô đặc đến tỷ lệ 4,5:1 (100ml tương đương 450g dược liệu), đây là dung dịch đậm đặc nhất có thể cho chuột nhất trắng uống bằng kim chuyên dụng. Dung dịch đậm đặc này được pha loãng đến các nồng độ thích hợp, dùng để nghiên cứu độc tính cấp và xác định LD₅₀ của bài thuốc “Thông mạch Vintong” trên thực nghiệm.

Chuẩn bị chuột nghiên cứu

Trước khi tiến hành thí nghiệm, cho chuột nhịn ăn qua đêm.

Chuột được chia thành các lô khác nhau, mỗi lô 10 con.

Sau 12 giờ nhịn ăn, chuột được uống thuốc cưỡng bức, thuốc thử được đưa thẳng vào dạ dày chuột bằng kim cong đầu tù.

Cho chuột uống thuốc với thể tích 0,25ml/10g thể trọng/lần nhưng với các liều tăng dần, tối đa 3 lần/24 giờ, mỗi lần uống cách nhau ít nhất 3 giờ. Tìm liều cao nhất không gây chết chuột, liều thấp nhất gây chết 100% số chuột và các liều trung gian.

2.4.1.7. Phương pháp đánh giá kết quả

Theo dõi tình trạng chung của chuột, quá trình diễn biến bắt đầu có dấu hiệu nhiễm độc (như nôn, co giật, kích động, bài tiết...) và số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc.

Tất cả chuột chết (nếu có) được mổ để đánh giá tổn thương đại thể và xác định nguyên nhân gây độc. Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD₅₀ của thuốc thử.

Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống dịch chiết “Thông mạch Vintong”.

2.4.2. Độc tính bán trường diễn

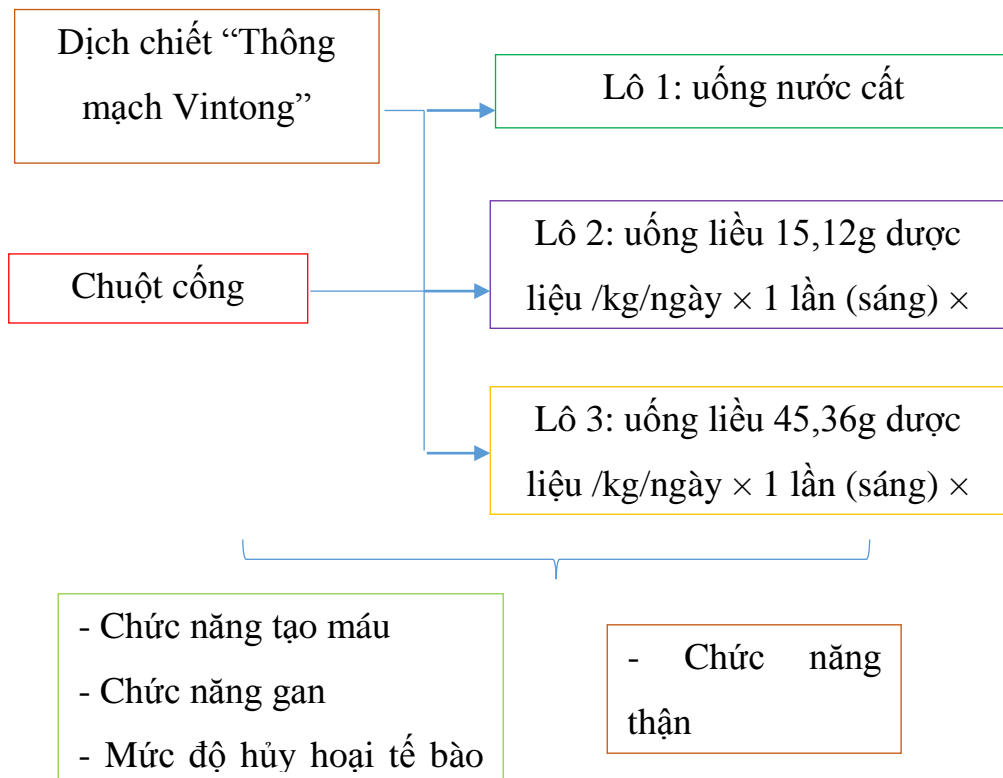
2.4.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng theo đường uống theo hướng dẫn của OECD về thuốc có nguồn gốc dược liệu [38].

2.4.2.2. Chọn mẫu và cỡ mẫu

Chọn 30 chuột cống trắng chia làm 3 lô, mỗi lô 10 con. Chuột được cho uống nước cất và hoặc dịch chiết “Thông mạch Vintong” với liều 15,12g/kg/24h và 45,36g/kg/24h (theo phân lô).

2.4.3. Quy trình nghiên cứu độc tính bán trường diễn



Sơ đồ 2.2. Sơ đồ nghiên cứu độc tính bán trường diễn

2.4.3.1. Chỉ tiêu theo dõi

Các chỉ tiêu nghiên cứu được đánh giá ở thời điểm ngày D_0 ; D_{45} và D_{90} sau uống Thông mạch Vintong với liều khác nhau. Bao gồm:

- Tình trạng chung, thể trọng của chuột.
- Chức năng gan, thận, chức phận tạo máu.

- Mức độ hủy hoại tế bào gan.
- Mô bệnh học gan, lách, thận.

2.4.3.2. Công cụ sử dụng trong nghiên cứu

- Kit định lượng các enzym và chất chuyển hoá trong máu: ALT, AST, bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol toàn phần, creatinin của hãng Erba, định lượng trên máy sinh hóa bán tự động Erba của Ấn Độ.

- Các dung dịch xét nghiệm máu của hãng Horiba ABX, định lượng trên máy Horiba ABX Micros của Pháp.

- Các hoá chất xét nghiệm và làm tiêu bản mô bệnh học.

2.4.3.3. Phương pháp tiến hành

Chuột được chia làm 3 lô, mỗi lô 10 con.

- Lô chứng: uống nước cất 1ml/kg/ngày.

- Lô trị 1: uống viên hoàn “Thông mạch Vintong” liều 15,12g được liều/kg/ngày.

- Lô trị 2: uống viên hoàn “Thông mạch Vintong” liều 45,36g được liều/kg/ngày (gấp 3 lần lô trị 1).

Chuột được uống nước cất hoặc thuốc thử trong 90 ngày liên tục, mỗi ngày một lần vào buổi sáng.

2.4.3.4. Phương pháp đánh giá kết quả

- Đánh giá chức phận tạo máu thông qua số lượng hồng cầu, thể tích trung bình hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu.

- Đánh giá chức năng gan thông qua định lượng chất chuyển hoá trong máu: bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol [62].

- Đánh giá mức độ hủy hoại tế bào gan thông qua định lượng hoạt độ enzym trong máu: ALT, AST [62].

- Đánh giá chức năng thận thông qua định lượng nồng độ creatinin huyết thanh [62].

- Các thông số theo dõi được kiểm tra vào trước lúc uống thuốc, sau 45 ngày uống thuốc và sau 90 ngày uống thuốc.

- Mô bệnh học: Sau 90 ngày uống thuốc, toàn bộ chuột được mổ để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan. Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, thận của 30% số chuột ở mỗi lô.

2.4.4. Mô hình đột quy não

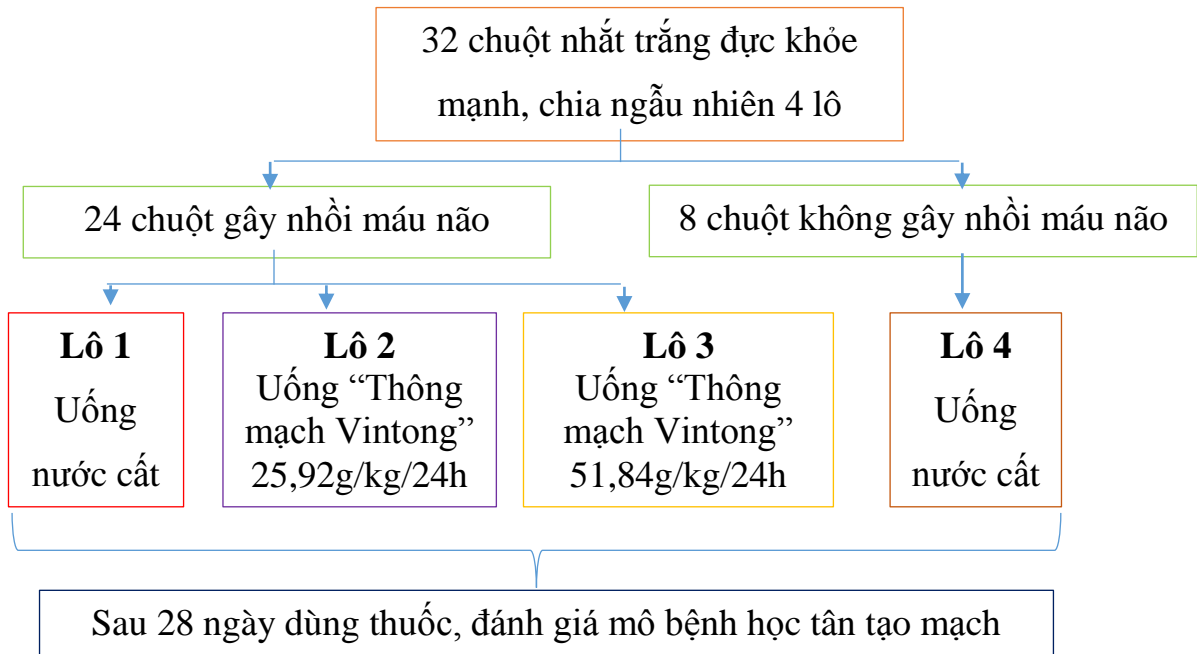
2.4.4.1. Thiết kế nghiên cứu

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) [63], [64].

2.4.4.2. 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 08 chuột phẫu thuật nhưng không gây nhồi máu não, được uống nước cất hoặc thuốc nghiên cứu với mức liều khác nhau.

2.4.4.3. Quy trình nghiên cứu



Sơ đồ 2.3. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng tăng tân tạo mạch máu của “Thông mạch Vintong” trên chuột nhắt trắng đột quy não

2.4.4.4. Chỉ tiêu theo dõi

Đánh giá mô bệnh học tân tạo mạch máu (CD31, VEGF/CD31)

2.4.4.5. Công cụ sử dụng trong nghiên cứu

- Kính hiển vi phẫu thuật;
- Thiết bị chiếu laser.
- Máy cắt bệnh phẩm lạnh
- 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.

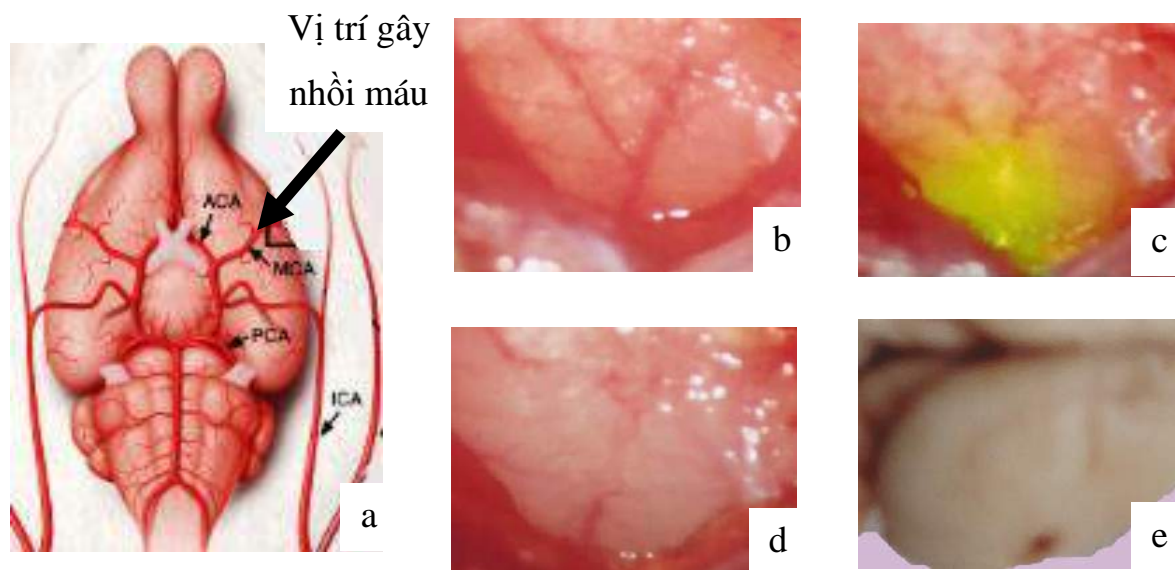
2.4.4.6. Phương pháp tiến hành

Phẫu thuật gây đột quy nhồi máu não trên chuột

Chuột nhất 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, bộc 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 [65].

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 quy một ngày cho đến hết 28 ngày sau gây đột quy.



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

- Hệ thống mạch máu não nhìn từ dưới lên và vị trí gây nhồi máu;
- Động mạch não giữa nhìn qua sọ chuột vùng bộc lộ;
- Chiếu tia laser vào động mạch não giữa qua hộp sọ;
- Sau khi chiếu laser, sự tắc mạch tạo ra một vùng trắng không có mạch máu xung quanh điểm chiếu;
- Hình ảnh nhồi máu não tại động mạch não giữa.

Phẫu thuật không gây đột quỵ 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 thuốc nghiên cứu liều 51,84 g/kg/24h.

2.4.5. Phương pháp đánh giá kết quả

Nhuộm hóa mô miễn dịch đánh giá mô bệnh học tân tạo mạch máu VEGF, CD31. Chuột được cố định bằng cách truyền dịch qua tim với paraformaldehyde 4% sau khi truyền với dung dịch nước muối sinh lý đệm phosphat 0,01 M. Não chuột được lấy ra, ngâm trong sucrose 30% trong 24h ở 4⁰C, và các lát cắt 30 μ m được cắt với máy cắt lạnh. Hai phần vành bao gồm phần nhồi máu và vỏ não ở bán cầu não bên tổn thương được chọn. Mỗi lát cắt chứa hai trường trong vùng ranh giới thiếu máu của phần não quan tâm.

Các lát cắt não nổi tự do được ủ với dung dịch khóa (blocking solution) (donkey serum 10% và Triton X-100 0,3% trong phosphate buffered saline) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó ủ với các kháng thể qua đêm ở 4⁰C. Các kháng thể bao gồm rat anti-cluster of differentiation 31 (CD31) antibody (1:50; BD Biosciences, San Jose, CA, USA Cat# 550274, RRID: AB_393571), rabbit anti-VEGF (1:500; Santa Cruz, Cat# sc-152, RRID:AB_2212984). Đọc và phân tích hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch huỳnh quang trên kính hiển vi đồng tiêu (confocal microscope). Mật độ vi mạch được phân tích bằng phần mềm Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

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. Độ tính cấp của dịch chiết “Thông mạch Vintong”

Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Độ tính cấp đường uống của dịch chiết “Thông mạch Vintong” trên chuột nhắt trắng.

| Lô chuột | Số chuột thí nghiệm | Liều dùng(g/kg thể trọng) | Số chuột sống/chết sau 72 giờ | Số chuột sống/chết sau 7 ngày |
|----------|---------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Lô 1 | 10 | 120 | 10/0 | 10/0 |
| Lô 2 | 10 | 150 | 10/0 | 10/0 |
| Lô 3 | 10 | 180 | 10/0 | 10/0 |
| Lô 4 | 10 | 210 | 10/0 | 10/0 |
| Lô 5 | 10 | 240 | 10/0 | 10/0 |
| Lô 6 | 10 | 270 | 10/0 | 10/0 |

Chuột nhắt trắng được uống dịch chiết “Thông mạch Vintong” với các mức liều khác nhau từ liều thấp nhất là 120 g/kg thể trọng đến liều cao nhất là 270 g/kg thể trọng, 0,2mL/10g/lần x 3 lần/ngày (mỗi lần cách nhau ít nhất 3 tiếng). Chuột đã uống đến liều 270 g/kg thể trọng là liều tối đa có thể dùng được bằng đường uống để đánh giá độ tính cấp của thuốc thử nhưng không có chuột nào chết, không xuất hiện triệu chứng bất thường nào trong 72 giờ sau uống thuốc lần cuối và trong suốt 7 ngày sau uống thuốc. Như vậy, không xác định được LD₅₀ của dịch chiết “Thông mạch Vintong” theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong 24h là 270 g/kg thể trọng không xuất hiện độ tính cấp.

3.2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn.

3.2.1. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng của chuột cống trắng khi dùng dài ngày.

a. Tình trạng chung

Chuột cống trắng được theo dõi hàng ngày về tình trạng chung gồm hoạt động, ăn uống, tình trạng lông, da, niêm mạc, chất tiết. Các chuột ở cả lô chứng và các lô dùng dịch chiết “Thông mạch Vintong” đều hoạt động bình thường. Chuột lông mượt, da niêm mạc bình thường, ăn uống bình thường, phân thành khuôn.

b. Sự thay đổi thể trọng của chuột

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” đối với thể trọng chuột ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$).

| Thời điểm XN | Lô chứng (1) | Lô trị 1 (2) | Lô trị 2 (3) | $p_{\text{giữa các lô}}$ |
|--|------------------------------------|----------------------|----------------------|--|
| Trọng lượng cơ thể | | | | |
| Trước thí nghiệm (a) | 185,60 $\pm 5,19$ | 188,00 $\pm 6,09$ | 186,30 $\pm 4,92$ | |
| Sau 45 ngày (b) | 212,75 $\pm 8,45$ | 211,85 $\pm 6,16$ | 214,20 $\pm 5,26$ | $p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ |
| Sau 90 ngày (c) | 226,10 $\pm 5,55$ | 227,20 $\pm 3,55$ | 228,40 $\pm 6,42$ | |
| $P_{\text{trong cùng lô}}$ | $p_{b,c-a} < 0,01; p_{c-b} < 0,01$ | | | - |

Nhận xét:

- Tại thời điểm ban đầu, thể trọng chuột ở các lô là tương đương ($p > 0,05$).
- So sánh giữa các thời điểm sau so với trước thấy thể trọng chuột của cả ba lô nghiên cứu đều tăng, sự thay đổi có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.
- Tại các thời điểm sau 45 ngày và 90 ngày uống thuốc, thể trọng chuột các lô cho uống “Thông mạch Vintong” không có sự khác biệt so với ở lô chứng sinh lý ($p > 0,05$).

Như vậy dịch chiết “Thông mạch Vintong” với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không ảnh hưởng đến sự phát triển thể trọng của chuột.

3.2.2. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” đối với một số chỉ tiêu huyết học của chuột.

Kết quả được trình bày ở các bảng 3.3, 3.4 và 3.5.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$).

| Thời điểm XN | Lô chứng(1) | Lô trị 1 (2) | Lô trị 2 (3) | $P_{\text{giữa các lô}}$ |
|--|------------------------------------|------------------|------------------|--------------------------|
| Số lượng hồng cầu chuột($\times 10^{12}$g/l) | | | | |
| Trước thí nghiệm (a) | 7,02 \pm 1,01 | 6,90 \pm 0,54 | 6,84 \pm 0,64 | $p_{2-1} > 0,05$ |
| Sau 45 ngày (b) | 7,17 \pm 0,76 | 6,83 \pm 0,38 | 6,95 \pm 0,61 | $p_{3-2} > 0,05$ |
| Sau 90 ngày (c) | 7,11 \pm 1,03 | 6,75 \pm 0,61 | 6,98 \pm 0,69 | $p_{3-1} > 0,05$ |
| $P_{\text{trong cùng lô}}$ | $p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$ | | | - |
| Hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột (g/dL) | | | | |
| Trước thí nghiệm (a) | 12,46 \pm 1,21 | 12,72 \pm 0,84 | 12,66 \pm 1,30 | $p_{2-1} > 0,05$ |
| Sau 45 ngày (b) | 12,80 \pm 1,39 | 12,94 \pm 1,26 | 12,79 \pm 1,40 | $p_{3-2} > 0,05$ |
| Sau 90 ngày (c) | 12,90 \pm 1,13 | 12,79 \pm 1,40 | 12,81 \pm 1,90 | $p_{3-1} > 0,05$ |
| $P_{\text{trong cùng lô}}$ | $p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$ | | | - |

Nhận xét:

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).
- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy dịch chiết “Thông mạch Vintong” với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên các chỉ tiêu về số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột ($n = 10, \bar{x} \pm SD$).

| Thời điểm XN | Lô chứng(1) | Lô trị 1 (2) | Lô trị 2 (3) | $p_{\text{giữa các lô}}$ |
|--|------------------------------------|--------------|--------------|--|
| Hematocrit (%) | | | | |
| Trước thí nghiệm (a) | 32,27 ± 2,50 | 32,44 ± 1,97 | 32,25 ± 3,03 | $p_{2-1} > 0,05$ |
| Sau 45 ngày (b) | 32,65 ± 2,48 | 32,79 ± 2,47 | 32,66 ± 2,48 | $p_{3-2} > 0,05$ |
| Sau 90 ngày (c) | 32,61 ± 2,25 | 32,74 ± 1,60 | 32,39 ± 3,12 | $p_{3-1} > 0,05$ |
| $P_{\text{trong cùng lô}}$ | $p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$ | | | - |
| Thể tích trung bình hồng cầu (fl) | | | | |
| Trước thí nghiệm (a) | 47,65 ± 1,21 | 46,73 ± 2,53 | 46,51 ± 2,96 | $p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$ |
| Sau 45 ngày (b) | 46,63 ± 3,03 | 47,06 ± 2,74 | 46,62 ± 1,98 | |
| Sau 90 ngày (c) | 46,47 ± 2,83 | 47,13 ± 3,02 | 46,95 ± 2,63 | |
| $P_{\text{trong cùng lô}}$ | $p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$ | | | - |

Nhận xét:

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy dịch chiết “Thông mạch Vintong” với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên các chỉ tiêu về hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên số lượng bạch cầu và tiểu cầu trong máu chuột ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$).

| Thời điểm XN | Lô chúng(1) | Lô trị 1 (2) | Lô trị 2 (3) | p giữa các lô |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Số lượng bạch cầu (G/l) | | | | |
| Trước thí nghiệm (a) | 6,56 ± 1,21 | 6,75 ± 1,26 | 6,59 ± 1,63 | $p_{2-1} > 0,05$ |
| Sau 45 ngày (b) | 6,34 ± 1,40 | 6,99 ± 1,25 | 6,90 ± 2,13 | $p_{3-2} > 0,05$ |
| Sau 90 ngày (c) | 6,42 ± 1,51 | 6,90 ± 1,71 | 6,85 ± 2,10 | $p_{3-1} > 0,05$ |
| P trong cùng lô | $p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$ | | | - |
| Số lượng tiểu cầu (G/l) | | | | |
| Trước thí nghiệm (a) | 556,20 ± 138,57 | 527,00 ± 91,87 | 511,10 ± 104,53 | $p_{2-1} > 0,05$ |
| Sau 45 ngày (b) | 552,20 ± 87,13 | 549,80 ± 101,10 | 516,90 ± 83,00 | $p_{3-2} > 0,05$ |
| Sau 90 ngày (c) | 506,40 ± 147,37 | 534,60 ± 96,33 | 547,30 ± 95,64 | $p_{3-1} > 0,05$ |
| P trong cùng lô | $p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$ | | | - |

Nhận xét:

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy dịch chiết “Thông mạch Vintong” với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên các chỉ tiêu về số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu trong máu chuột.

3.2.3. Đánh giá mức độ hủy hoại tế bào gan khi dùng dịch chiết “Thông mạch Vintong” dài ngày.

Kết quả được trình bày ở bảng 3.6.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” đối với hoạt độ AST và ALT ($n = 10, \bar{x} \pm SD$).

| Thời điểm XN | Lô chúng(1) | Lô trị 1 (2) | Lô trị 2 (3) | $p_{\text{giữa các lô}}$ |
|--|-------------------------------------|---------------|---------------|--|
| Hoạt độ AST (UI/L) | | | | |
| Trước thí nghiệm (a) | 95,88 ± 22,82 | 98,39 ± 26,29 | 99,52 ± 13,91 | $p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$ |
| Sau 45 ngày (b) | 95,77 ± 19,34 | 94,11 ± 15,37 | 98,29 ± 16,31 | |
| Sau 90 ngày (c) | 98,24 ± 18,76 | 94,83 ± 22,95 | 90,16 ± 12,67 | |
| $p_{\text{trong cùng lô}}$ | $p_{b, c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$ | | | - |
| Hoạt độ ALT (UI/L) | | | | |
| Trước thí nghiệm (a) | 82,34 ± 12,07 | 83,05 ± 16,84 | 80,24 ± 16,40 | $p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$ |
| Sau 45 ngày (b) | 83,44 ± 15,54 | 80,31 ± 19,94 | 77,94 ± 16,50 | |
| Sau 90 ngày (c) | 79,35 ± 13,59 | 77,30 ± 19,84 | 76,06 ± 16,63 | |
| $p_{\text{trong cùng lô}}$ | $p_{b, c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$ | | | - |

Nhận xét:

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, hoạt độ các enzym AST và ALT trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, hoạt độ các enzym AST và ALT trong máu của chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy dịch chiết “Thông mạch Vintong” với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi hoạt độ các enzym AST và ALT có ý nghĩa thống kê, cho thấy dịch chiết “Thông mạch Vintong” không gây ra hủy hoại tế bào gan trên chuột nghiên cứu.

3.2.4. Đánh giá ảnh hưởng lên chức năng gan khi dùng dịch chiết “Thông mạch Vintong” dài ngày.

Kết quả được trình bày ở bảng 3.7 và bảng 3.8.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên các chỉ số albumin và bilirubin toàn phần trong máu ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)

| Thời điểm XN | Lô chứng(1) | Lô trị 1 (2) | Lô trị 2 (3) | $P_{\text{giữa các lô}}$ |
|---|------------------------------------|---------------|---------------|--|
| Albumin huyết tương (g/l) | | | | |
| Trước thí nghiệm (a) | 21,50 ± 2,67 | 22,30 ± 2,49 | 21,92 ± 2,94 | $p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$ |
| Sau 45 ngày (b) | 22,17 ± 2,02 | 22,69 ± 2,40 | 22,57 ± 2,33 | |
| Sau 90 ngày (c) | 22,10 ± 2,09 | 22,15 ± 2,11 | 22,65 ± 1,95 | |
| $P_{\text{trong cùng lô}}$ | $p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$ | | | - |
| Bilirubin toàn phần ($\mu\text{mol/L}$) | | | | |
| Trước thí nghiệm (a) | 50,01 ± 10,25 | 52,25 ± 15,68 | 54,34 ± 10,55 | $p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$ |
| Sau 45 ngày (b) | 49,27 ± 17,49 | 51,95 ± 15,99 | 52,23 ± 12,75 | |
| Sau 90 ngày (c) | 50,81 ± 10,04 | 47,58 ± 12,03 | 47,12 ± 12,13 | |
| $P_{\text{trong cùng lô}}$ | $p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$ | | | - |

Nhận xét:

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, các chỉ số albumin và bilirubin toàn phần máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, các chỉ số albumin và bilirubin toàn phần máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy dịch chiết “Thông mạch Vintong” với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi các chỉ số albumin và bilirubin toàn phần trong máu chuột nghiên cứu.

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên cholesterol toàn phần trong máu ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)

| Thời điểm XN | Lô chứng(1) | Lô trị 1 (2) | Lô trị 2 (3) | P giữa các lô |
|---------------------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|--------------------------------------|
| Cholesterol toàn phần (mmol/l) | | | | |
| Trước thí nghiệm (a) | 1,97 ± 0,49 | 1,94 ± 0,45 | 2,06 ± 0,51 | $p_{2-1} > 0,05$ |
| Sau 45 ngày (b) | 2,04 ± 0,47 | 1,92 ± 0,36 | 2,01 ± 0,44 | $p_{3-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ |
| Sau 90 ngày (c) | 1,94 ± 0,34 | 1,95 ± 0,38 | 1,98 ± 0,42 | |
| P trong cùng lô | $p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$ | | | - |

Nhận xét:

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, các chỉ số Cholesterol toàn phần máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, các chỉ số Cholesterol toàn phần máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy dịch chiết “Thông mạch Vintong” với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi các chỉ số Cholesterol toàn phần máu chuột nghiên cứu.

3.2.5. Đánh giá ảnh hưởng lên chức năng thận khi dùng dịch chiết “Thông mạch Vintong” dài ngày.

Kết quả được trình bày ở bảng 3.9.

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của dịch chiết “Thông mạch Vintong” lên hàm lượng creatinin máu chuột ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$)

| Thời điểm XN | Lô chứng (1) | Lô trị 1 (2) | Lô trị 2 (3) | P giữa các lô |
|---|------------------------------------|----------------------|----------------------|--|
| Creatinin ($\mu\text{mol/l}$) | | | | |
| Trước thí nghiệm (a) | 84,27 $\pm 13,44$ | 79,93 $\pm 10,56$ | 83,06 $\pm 13,48$ | $p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$ |
| Sau 45 ngày (b) | 85,85 $\pm 12,37$ | 86,61 $\pm 14,52$ | 82,05 $\pm 11,51$ | |
| Sau 90 ngày (c) | 82,40 $\pm 12,23$ | 84,89 $\pm 12,91$ | 80,10 $\pm 15,52$ | |
| P trong cùng lô | $p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$ | | | - |

Nhận xét:

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, hàm lượng creatinin máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, hàm lượng creatinin máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy dịch chiết “Thông mạch Vintong” với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi hàm lượng creatinin trong máu chuột nghiên cứu.

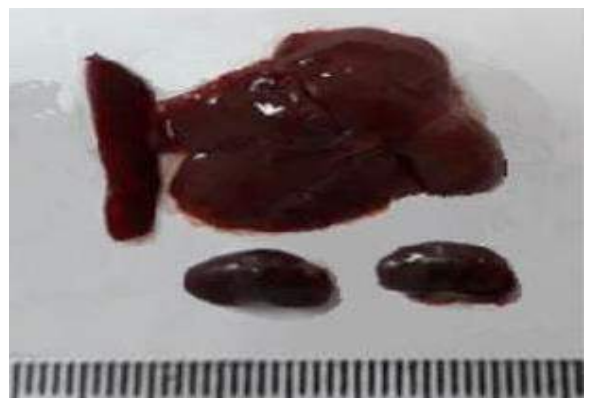
3.2.6. Kết quả mô bệnh học tạng của chuột thí nghiệm

Quan sát đại thể bằng mắt thường và dưới kính lúp có độ phóng đại 25 lần thấy: màu sắc, hình thái của gan, lách và thận ở hai lô dùng dịch chiết Thông mạch Vintong không khác so với chúng.

Ảnh 1: Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô chúng (chuột 06, lô chúng)



Ảnh 2: Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô trị 1 (chuột 12, lô trị 1)

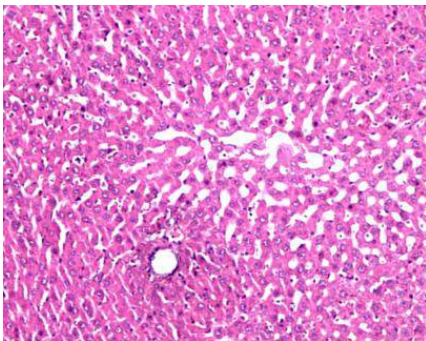


Ảnh 3: Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô trị 2 (chuột 24, lô trị 2)

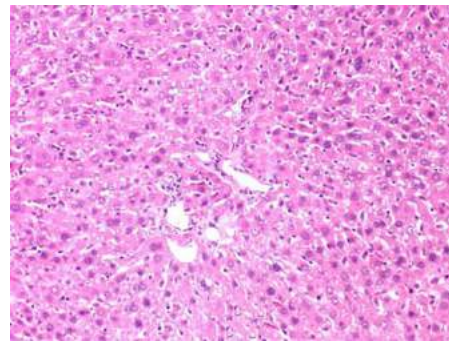
Nhận xét ảnh: Hình ảnh đại thể các tạng gan, lách, thận của chuột ở các lô trị 1 (ảnh 2), lô trị 2 (ảnh 3), là các lô cho uống siro “Thông mạch Vintong” , có màu nâu đỏ thẫm đồng đều, bề mặt nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết, có đàn hồi khi ấn xuống, không khác biệt so với hình ảnh gan, lách, thận của chuột ở lô chứng (ảnh 1).

Các tiêu bản mô bệnh học đọc tại Bộ môn khoa Giải phẫu bệnh – Pháp y, bệnh viện Quân y 103. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học gan, lách, thận chuột cho thấy dịch chiết “Thông mạch Vintong” dùng đường uống với liều 15,12 g/kg/24h và liều 45,36 g/kg/24h liên tục trong 90 ngày, không gây tổn thương trên gan, thận, lách của chuột.

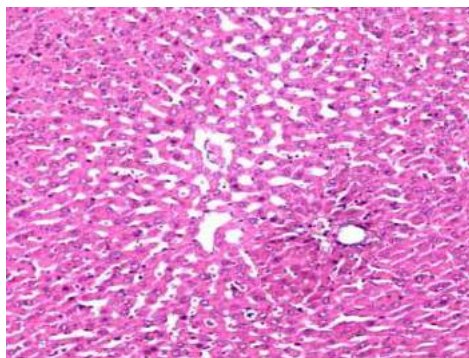
Hình ảnh mô bệnh học gan chuột sau 90 ngày uống thuốc



Ảnh 4: Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng (chuột 8, lô chứng). HE, x 400



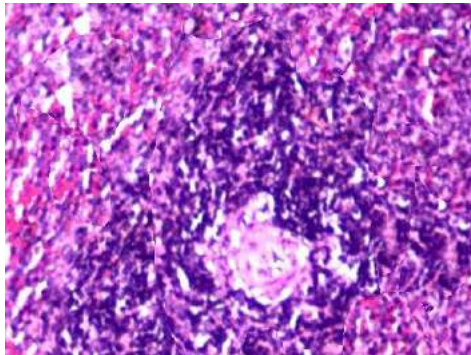
Ảnh 5: Hình ảnh vi thể gan chuột lô trị 1 (chuột 16, lô trị 1). HE, x 400



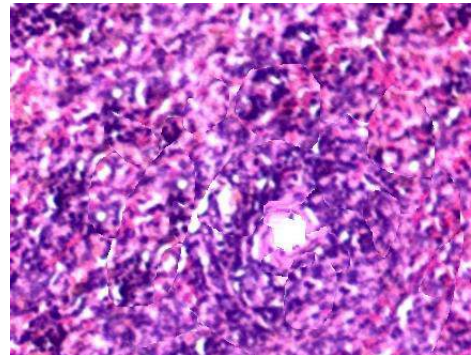
Ảnh 6: Hình ảnh vi thể gan chuột lô trị 2 (chuột 22, lô trị 2). HE, x 400

Nhận xét ảnh: Hình ảnh vi thể gan dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở lô trị 1 (ảnh 5) và lô trị 2 (ảnh 6), là các lô cho uống siro Thông mạch Vintong, không khác biệt so với hình ảnh vi thể gan chuột ở lô chứng (ảnh 4). Trên hình ảnh không thấy ổ xuất huyết hoặc ổ hoại tử, thoái hóa tế bào gan.

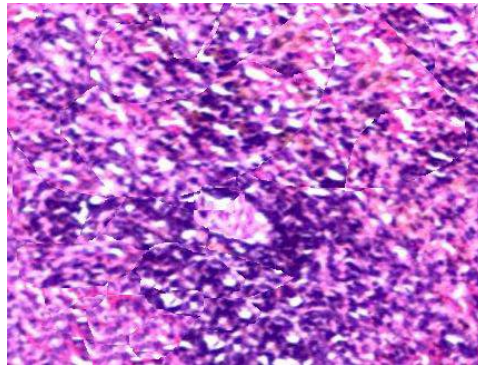
Hình ảnh mô bệnh học lách chuột sau 90 ngày uống thuốc



Ảnh 7: Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng (chuột 9, lô chứng). HE, x 400



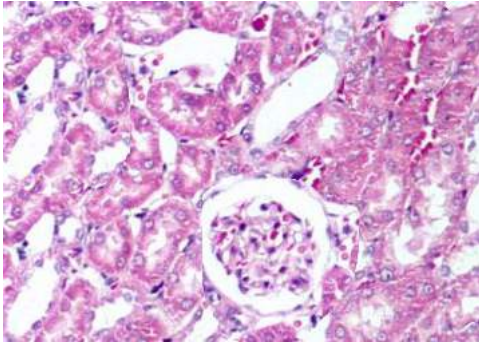
Ảnh 8: Hình ảnh vi thể lách chuột lô trị 1 (chuột 18, lô trị 1). HE, x 400



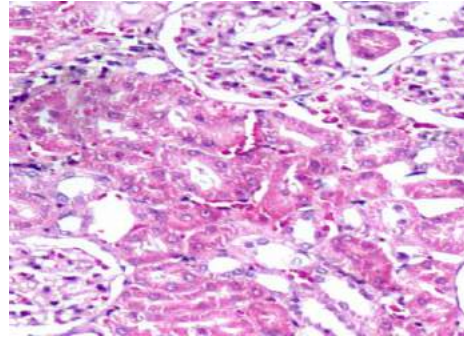
Ảnh 9: Hình ảnh vi thể lách chuột lô trị 2 (chuột 27, lô trị 2). HE, x 400

Nhận xét ảnh: Hình ảnh vi thể lách dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở lô trị 1 (Ảnh 8) và lô trị 2 (Ảnh 9), là các lô cho uống siro “Thông mạch Vintong”, không khác biệt so với hình ảnh vi thể lách chuột ở lô chứng (Ảnh 7). Trên hình ảnh thấy vùng tủy trắng bắt màu xanh thẫm, tập trung các nang lympho lớn. Vùng tủy đỏ có màu xanh đỏ, với các xoang nang chứa nhiều hồng cầu và một số đại thực bào. Không thấy ổ xuất huyết hoặc hoại tử.

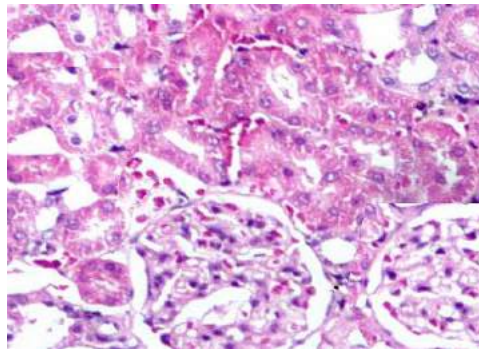
Hình ảnh mô bệnh học thận chuột sau 90 ngày uống thuốc



Ảnh 10: Hình ảnh vi thể thận chuột lô chúng (chuột 3, lô chúng). HE, x 400



Ảnh 11: Hình ảnh vi thể thận chuột lô trị 1 (chuột 14, lô trị 1). HE, x 400

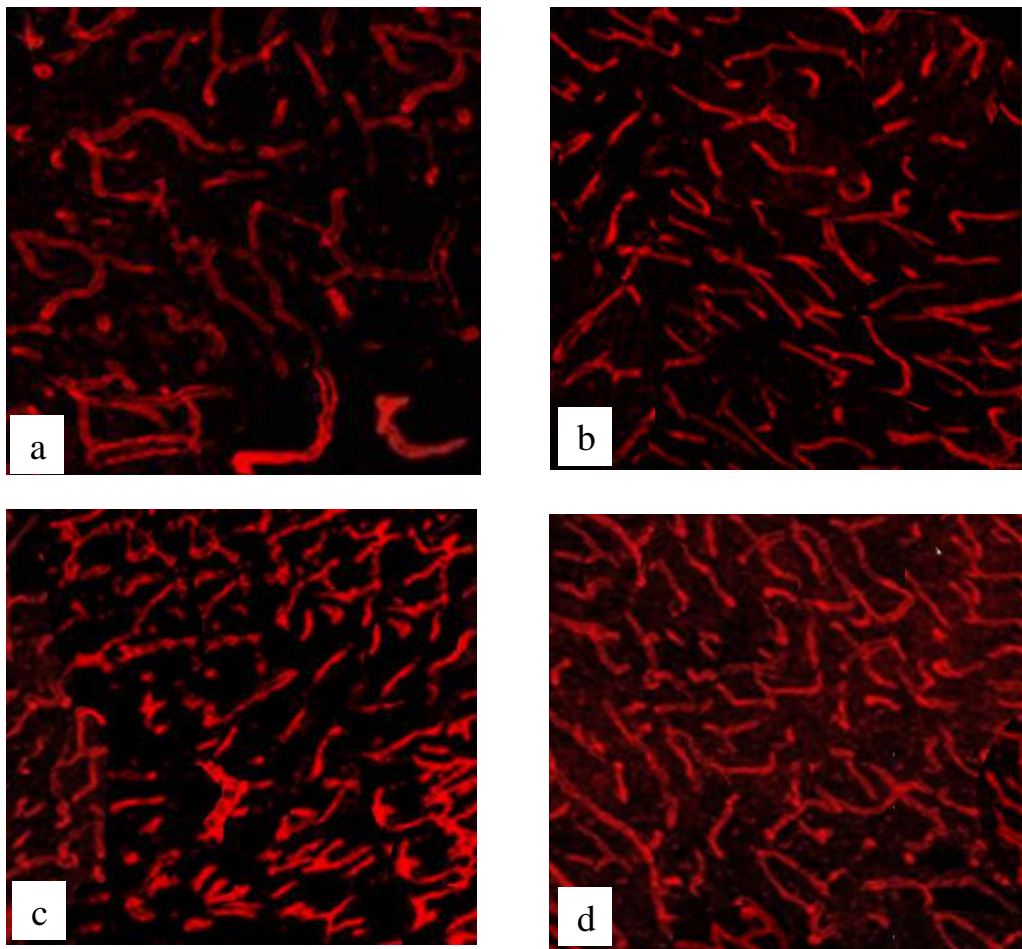


Ảnh 12: Hình ảnh vi thể thận chuột lô trị 2 (chuột 26, lô trị 2). HE, x 400

Nhận xét ảnh: Hình ảnh vi thể thận dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở lô trị 1 (Ảnh 11) và lô trị 2 (Ảnh 12), là các lô cho uống “Thông mạch Vintong” không khác biệt so với hình ảnh vi thể thận chuột ở lô chúng (Ảnh 10). Cấu trúc các vùng chức năng thận bình thường.

3.3. Đánh giá tác dụng tân tạo mạch máu não sau đột quỵ của dịch chiết “Thông mạch Vintong” trên động vật thực nghiệm.

Trên tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch nhuộm CD31 (Cluster of differentiation 31 – dấu ấn 31), là protein thường tìm thấy trên các tế bào nội mô, cho phép đánh giá mức độ tân tạo mạch. Hình ảnh nhuộm CD31 với ảnh chụp hiện màu đỏ của dấu ấn này được trình bày ở ảnh 13.



Ảnh 13: Hình ảnh hóa mô miễn dịch huỳnh quang (độ phóng đại x 100) nhuộm CD31 đánh giá tân tạo mạch máu não sau đột quỵ .

(a – lô chứng phẫu thuật, b-lô chứng nhồi máu, c-lô trị 1, d-lô trị 2)

Nhận xét:

- Ở lô chứng phẫu thuật (Ảnh a), hình ảnh hóa mô miễn dịch nhuộm CD31 sắp xếp thành các dải to, đều, tuy nhiên mật độ thưa hơn so với các lô khác.

- Ở lô chứng nhồi máu (Ảnh b), hình ảnh hóa mô miễn dịch nhuộm CD31 sắp xếp thành các dải mảnh, ngắn hơn nhưng có mật độ dày hơn so với ở lô chứng phẫu thuật.

- Ở lô trị 1 và lô trị 2, hình ảnh hóa mô miễn dịch nhuộm CD31 sắp xếp thành các dải mảnh, ngắn tương tự lô chứng nhồi máu nhưng có mật độ dày hơn so với ở lô chứng nhồi máu. Lô dùng liều cao có xu thế mật độ dày hơn so với lô dùng liều thấp.

Mật độ vi mạch được phân tích bằng phần mềm Image J. Kết quả được trình bày ở bảng 3.10.

Bảng 3.10. Mật độ vi mạch ở các lô chuột nghiên cứu ($n = 08$, $\bar{x} \pm SD$)

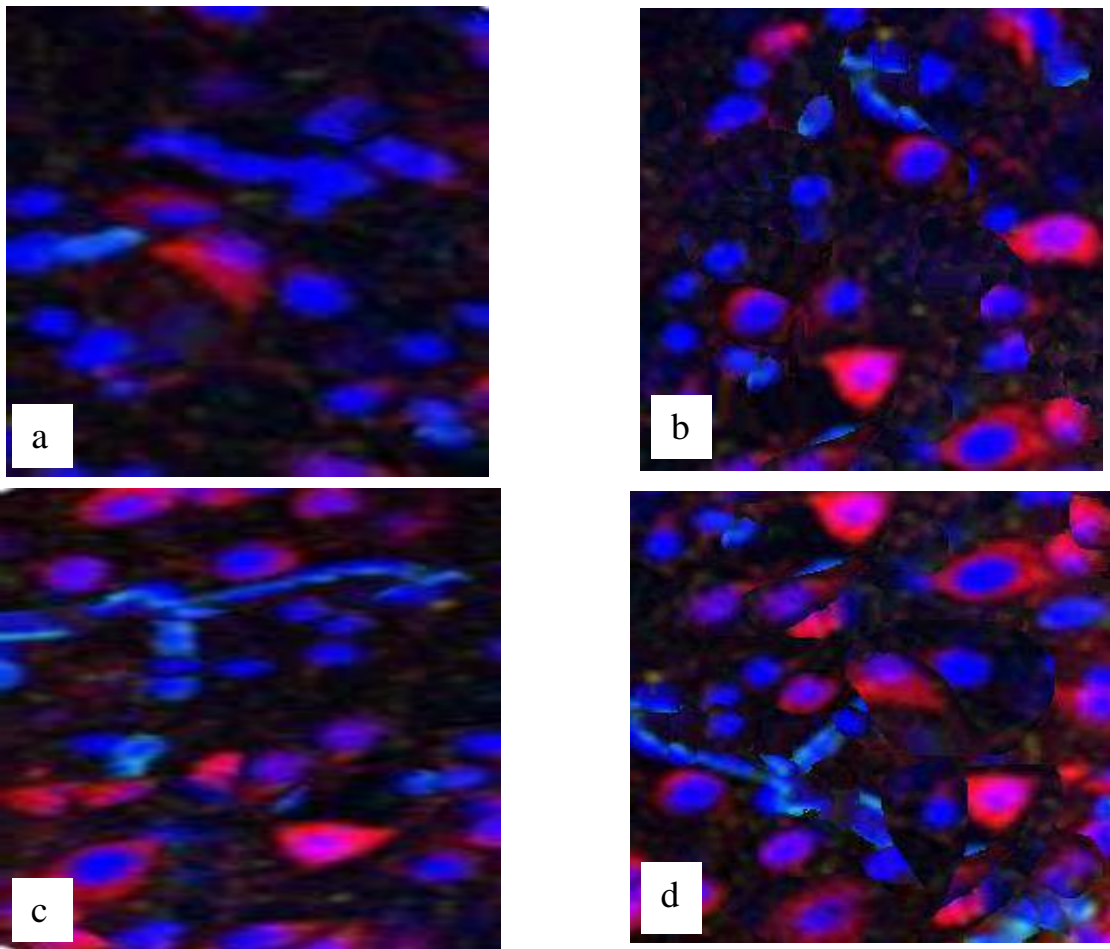
| Lô nghiên cứu | Mật độ vi mạch (%) | Giá trị p |
|-------------------------|--------------------|--|
| Lô chứng phẫu thuật (1) | $8,26 \pm 1,61$ | $p_{2-1} > 0,05$ $p_{3,4-2} < 0,01$ $p_{3-4} > 0,05$ |
| Lô chứng nhồi máu (2) | $10,10 \pm 2,02$ | |
| Lô trị 1 (3) | $14,58 \pm 2,88$ | |
| Lô trị 2 (4) | $15,32 \pm 3,08$ | |

Nhận xét:

- So với lô chứng phẫu thuật, mật độ vi mạch ở lô chứng nhồi máu cao hơn nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So với lô chứng nhồi máu, mật độ vi mạch ở các lô trị 1 và lô trị 2 đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$).

- So sánh giữa 2 lô trị 1 và trị 2, mật độ vi mạch ở lô trị 2 là lô dùng thông mạch vintong liều cao có xu hướng tăng so với ở lô trị 1 là lô dùng thông mạch vintong liều thấp, tuy nhiên chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.



Ảnh 14: Hình ảnh hóa mô miễn dịch huỳnh quang nhãn kép (độ phóng đại x 400) nhuộm CD31 (màu xanh) và VEGF (màu đỏ) đánh giá tân tạo mạch máu não sau đột quỵ .

(a – lô chứng phẫu thuật, b-lô chứng nhồi máu, c-lô trị 1, d-lô trị 2)

Nhận xét:

- Ở lô chứng phẫu thuật (Ảnh a), hình ảnh VEGF có mật độ thưa.
- Ở lô chứng nhồi máu (Ảnh b), hình ảnh VEGF có mật độ dày hơn so với ở lô chứng phẫu thuật.
- Ở lô trị 1 và lô trị 2, hình ảnh VEGF có mật độ dày hơn so với ở lô chứng nhồi máu. Lô dùng liều cao có xu thế mật độ dày hơn so với lô dùng liều thấp.

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Bàn luận về độc tính cấp của bài thuốc “Thông mạch Vintong” trên động vật thực nghiệm

Theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới, ngoại trừ các bài thuốc cổ phương được chiết xuất theo phương pháp truyền thống, tất cả các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu đều phải đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn trên động vật thực nghiệm trước khi đưa vào thử nghiệm trên người. Bài thuốc “Thông mạch Vintong” là bài thuốc nghiệm phương, do đó là đối tượng cần được đánh giá về độc tính cấp và bán trường diễn [61].

4.1.1. Về độc tính cấp của bài thuốc “Thông mạch Vintong”

Độc tính cấp là những tác dụng không mong muốn xảy ra sau khi dùng một chất trong vòng 24 giờ [60]. Động vật (thường dùng chuột) được dùng thuốc trong 24 giờ và được quan sát trong 1 tuần để xác định các triệu chứng độc (nếu có) [60], [61]. Chuột nghiên cứu được lựa chọn bao gồm cả chuột đực và chuột cái, kết quả nghiên cứu vì thế bao hàm cho cả 2 giống. Đường đưa thuốc sử dụng là đường uống, theo đúng như đường dự kiến sử dụng trên người. Khi sử dụng đường uống, để bảo đảm cho chuột dùng được một lượng thuốc lớn với độ chính xác cao, việc đưa thuốc cưỡng bức vào dạ dày chuột qua kim cong đầu tù chuyên dụng được thực hiện. Thao tác này có thể gây tổn hại đường thực quản dạ dày gây xuất huyết hoặc thủng dạ dày, hoặc có thể đưa nhầm thuốc vào đường hô hấp gây sặc thuốc, suy hô hấp làm chuột chết. Ngoài ra thao tác bắt chuột nếu thực hiện không tốt sẽ gây tổn thương chuột, thậm chí có thể làm chết chuột. Chính vì vậy thao tác này được tiến hành bởi một kỹ thuật viên có kinh nghiệm, bảo đảm việc đưa thuốc vào dạ dày ruột với một lượng chính xác mà không gây tổn thương cho chuột [11].

Việc theo dõi đánh giá tình trạng chung của chuột, cũng như số chuột chết ở mỗi lô đòi hỏi các nghiên cứu viên có kinh nghiệm và phải theo dõi thường xuyên liên tục, tránh việc để sót các dấu hiệu bị độc. Khi tiến hành công việc

theo dõi này, chúng tôi luôn phân thành ca với mỗi ca ít nhất có 2 nghiên cứu viên có kinh nghiệm, và việc theo dõi được tiến hành liên tục. Việc phẫu tích chuột được chuẩn bị sẵn sàng để nếu có chuột chết cần phải tiến hành phẫu tích ngay nhằm đánh giá nguyên nhân gây chết chuột. Các nguyên nhân gây chết chuột có thể là do độc tính của thuốc như gây kích thích thần kinh làm chuột co giật, suy hô hấp và chết; hoặc gây suy gan, suy thận; nhưng cũng có thể do đi lỏng nhiều gây rối loạn điện giải mà chết; do tắc ruột; do tổn thương gây chảy máu trong... Trong nghiên cứu về độc tính cấp của bài thuốc “Thông mạch Vintong”, không có chuột nào bị chết nên không có bất kỳ các nguyên nhân nào kể trên.

Nghiên cứu độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt trắng, chuột được cho uống bài thuốc “Thông mạch Vintong” liều tăng dần từ 120g dược liệu/kg thể trọng đến liều cao nhất là 270g dược liệu/kg thể trọng. Mức liều 270g dược liệu/kg thể trọng là liều lớn nhất có thể cho chuột nhắt trắng uống được trong 24 giờ, nhưng không có chuột nào chết và không thấy biểu hiện bất thường nào ở chuột. Liều dự kiến có hiệu quả khi dùng trên chuột nhắt trắng là 25,92g/kg/24h. Mức liều 270g dược liệu/kg thể trọng gấp 10,4 lần mức liều 25,92g/kg/24h. Như vậy chuột đã được cho uống mức liều gấp 10,4 lần mức liều dự kiến có hiệu quả, các chuột vẫn khỏe mạnh, lông mượt, mắt trong, ăn uống và hoạt động bình thường, không có chuột nào chết.

Việc chưa tìm thấy LD50 của bài thuốc “Thông mạch Vintong” theo đường uống trên chuột nhắt trắng với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong 24h (gấp 10,4 lần mức liều dự kiến có hiệu quả), cùng với việc không phát hiện thấy các biểu hiện bất thường của tình trạng bị độc khi dùng thuốc liều cao, chứng tỏ bài thuốc “Thông mạch Vintong” có tính an toàn cao, khoảng an toàn điều trị rộng.

4.1.2. Về độc tính bán trường diễn của bài thuốc “Thông mạch Vintong”

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn được thực hiện bằng cách cho động vật thí nghiệm uống thuốc thử hàng ngày liên tục trong một khoảng thời gian

nhất định. Thời gian dùng thuốc thử phụ thuộc vào thời gian dùng trên lâm sàng [7]. Theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới [61] và quy định của Bộ y tế Việt Nam [7], thời gian nghiên cứu bán trường diễn trên động vật thường gấp 4 lần thời gian dự kiến dùng trên người. Tuy nhiên, nếu nghiên cứu trên động vật trong thời gian quá dài, đặc biệt khi cho động vật dùng thuốc cường bức (qua kim công đầu tù), một số yếu tố nhiễu có thể ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu. Vì vậy, nếu thời gian dự định sử dụng trên người là dùng hàng ngày trên 30 ngày thì thời gian nghiên cứu bán trường diễn trên động vật là 3 tháng [39]. Nghiên cứu bán trường diễn của bài thuốc “Thông mạch Vintong” được thực hiện trong thời gian 3 tháng (90 ngày), với mục tiêu nhằm bảo đảm việc đánh giá được tính an toàn của chế phẩm khi dự kiến sử dụng trên người hàng ngày trên 30 ngày.

Độc tính bán trường diễn của bài thuốc “Thông mạch Vintong” được thực hiện trên chuột cống trắng, số lượng chuột mỗi lô là 10, và gồm 3 lô: một lô chứng sinh lý; một lô dùng thuốc với mức liều tương đương mức liều dự kiến điều trị (quy đổi theo hệ số liều ở chuột cống trắng gấp 7 lần liều ở người khi tính theo thể trọng); và một lô dùng liều gấp 3 lần liều 1. Việc thiết kế các mức liều và số lượng như vậy nhằm đảm bảo độ tin cậy của nghiên cứu và tuân theo qui định của Bộ Y tế trong đánh giá tính an toàn của thuốc [7].

Các chỉ tiêu để đánh giá độc tính bán trường diễn bao gồm: tình trạng chung và thay đổi thể trọng, các chỉ số huyết học, các chỉ số sinh hoá đánh giá chức năng gan, thận và đặc điểm giải phẫu bệnh của gan, lách, thận. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn sau 90 ngày trên chuột cống trắng cho thấy:

** Tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng*

Tình trạng chung và cân nặng của động vật thực nghiệm là các chỉ số nghiên cứu bắt buộc theo dõi trước khi dùng thuốc và định kỳ trong thời gian dùng thuốc [39]. Trong suốt thời gian nghiên cứu, chuột ở cả ba lô đều hoạt động bình thường, lông mượt, da niêm mạc bình thường, ăn uống bình thường, phân thành khuôn. Sự phát triển cân nặng của chuột ở các lô bình thường.

**Ảnh hưởng của bài thuốc “Thông mạch Vintong” đến chức năng tạo máu*

Các chỉ số trong xét nghiệm tế bào máu ngoại vi có giá trị lớn trong việc đánh giá chức năng tạo máu [60]. Vì vậy, chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của bài thuốc “Thông mạch Vintong” đến chức phận tạo máu thông qua các chỉ số huyết học gồm: số lượng hồng cầu, thể tích trung bình hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu. Ngoài ra, hình ảnh đại thể và vi thể lách, một cơ quan quan trọng phản ánh chức năng tạo máu và đời sống của các tế bào máu [39] cũng được đánh giá.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, xét nghiệm máu về các chỉ số huyết học tại các thời điểm sau uống bài thuốc “Thông mạch Vintong” trong 45 và 90 ngày không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so với trước khi dùng thuốc ở tất cả các chỉ số nghiên cứu ($p > 0,05$). Hình ảnh vi thể và đại thể lách chuột bình thường.

Các kết quả này phản ánh bài thuốc “Thông mạch Vintong” ở cả hai mức liều đã dùng, không gây ảnh hưởng xấu lên chức năng tạo máu và đời sống hồng cầu của chuột sau 90 ngày uống thuốc thử.

**Ảnh hưởng của bài thuốc “Thông mạch Vintong” đến gan*

Gan là một tạng lớn nhất của cơ thể, vừa có chức năng ngoại tiết, vừa có chức năng nội tiết, vừa là kho dự trữ của nhiều chất, vừa là trung tâm chuyển hóa quan trọng của cơ thể và có tính chất sinh mạng [38]. Vì vậy, nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc đến gan là rất cần thiết khi đánh giá độc tính của thuốc [39].

Khi đưa thuốc vào cơ thể, thuốc có thể gây độc với gan, làm tổn thương gan. Sự tổn thương tế bào gan làm tăng hoạt độ của một số enzym có nguồn gốc gan trong huyết thanh, quan trọng nhất là 2 enzym ALT (Alanin transaminase) và AST (Aspartat transaminase). ALT là enzym có nhiều nhất ở gan, khu trú trong bào tương của tế bào nhu mô gan. Khi tổn thương hủy hoại tế bào gan, thậm chí chỉ cần thay đổi tính thấm của màng tế bào gan, hoạt độ ALT trong máu đã tăng cao. Khác với ALT, 2/3 AST khu trú trong ty

thể (mitochondria) và chỉ ít hơn 1/3 lượng AST khu trú ở bào tương của tế bào. Khi tổn thương tế bào gan ở mức độ dưới tế bào, AST trong ty thể được giải phóng ra. Do đó, khi tổn thương gan, AST và ALT đều tăng rất cao so với bình thường, nhưng mức độ tăng của ALT cao hơn so với AST, tăng sớm trước khi có vàng da, ở tuần đầu vàng da [38], [39]. Trong nghiên cứu này, hoạt độ ALT và AST trong máu chuột ở hai lô uống bài thuốc Thông mạch Vintong không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và khi so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử 45 và 90 ngày, chứng tỏ cả 2 liều bài thuốc Thông mạch Vintong đã dùng đều không gây tổn thương hủy hoại các tế bào gan. Kết quả mô bệnh học cũng phù hợp với kết quả xét nghiệm hóa sinh máu. Hình ảnh đại thể và vi thể gan ở cả hai lô uống bài thuốc "Thông mạch Vintong" đều có cấu trúc tế bào gan bình thường, khoảng cửa và mạch máu bình thường giống như lô chứng, không thấy hình ảnh tổn thương vi thể gan.

Bilirubin là sản phẩm thoái hóa của hemoglobin ở lưới nội mạc võng mô như gan, lách, tuỷ xương. Trong nghiên cứu này, chỉ số bilirubin toàn phần trong máu được đánh giá trước hết nhằm đánh giá xem thuốc có độc tính với gan không (như gây hủy hoại tế bào gan, gây tắc mật, làm suy giảm chức năng liên hợp của gan... sẽ làm tăng bilirubin trong máu). Đồng thời, chỉ số này cũng cho phép đánh giá thuốc có gây ảnh hưởng đến đời sống hồng cầu không (như gây độc làm tan máu cũng dẫn đến tăng bilirubin). Kết quả nghiên cứu cho thấy chỉ số Billirubin trong máu bình thường, được xem là một tiêu chí nói lên chế phẩm không gây độc với gan, cũng như không ảnh hưởng đến đời sống hồng cầu.

Albumin là loại protein quan trọng nhất của huyết thanh. Albumin tham gia vào hai chức năng chính là duy trì từ 70 đến 80% áp lực thẩm thấu trong huyết tương, đồng thời liên kết vận chuyển các chất có dạng phân tử nhỏ như bilirubin, các acid béo hoặc thuốc có bên trong máu. Gan là nơi tổng hợp protein chính cho nên khi nội tạng này bị tổn thương thì sẽ kéo theo chức

năng gan bị suy giảm. Điều này dẫn đến việc hấp thụ các chất dinh dưỡng protein không tốt hoặc bị đình trệ dẫn tới sự tổng hợp Albumin kém, do đó việc xét nghiệm chỉ số nồng độ Albumin có trong máu có giá trị trong đánh giá tổn thương chức năng gan. Kết quả nghiên cứu cho thấy bài thuốc “Thông mạch Vintong” dùng ở cả 2 mức liều dùng, trong 90 ngày không gây ảnh hưởng lên chỉ số Albumin máu chuột, là một chỉ tiêu chứng tỏ chế phẩm không gây độc đối với gan (không làm ảnh hưởng chức năng tổng hợp Albumin của gan).

Cholesterol là một thành phần của lipid máu, đồng thời đóng vai trò quan trọng trong hầu hết các hoạt động của cơ thể. Cholesterol là một yếu tố không thể thiếu trong quá trình hoạt động của tế bào sợi thần kinh, cũng như trong việc sản xuất một số loại hormone, giúp cơ thể hoạt động bình thường và khỏe mạnh. Cholesterol toàn phần được tổng hợp ở nhiều mô khác nhau nhưng chủ yếu là ở gan (75%) và tế bào thành ruột. Nó được sử dụng để phát hiện nguy cơ vữa xơ động mạch và để chẩn đoán và theo dõi điều trị các bệnh có liên quan đến nồng độ cholesterol cũng như các rối loạn chuyển hóa lipid hay lipoprotein.

Kết quả nghiên cứu cho thấy dịch chiết “Thông mạch Vintong” với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi các chỉ số Cholesterol toàn phần máu chuột nghiên cứu.

** Ảnh hưởng của bài thuốc “Thông mạch Vintong” đến thận*

Trong đánh giá độc tính của thuốc, ảnh hưởng của chế phẩm tới gan và thận là yêu cầu bắt buộc phải đánh giá [39]. Thứ nhất, đây là 2 cơ quan rất quan trọng trong quá trình chuyển hóa và thải trừ thuốc. Thứ hai, đây là hai cơ quan dễ bị tổn thương nhất khi dùng thuốc. Thận dễ bị tổn thương khi dùng thuốc do đặc điểm của nó là cơ quan thải trừ, đào thải các chất ra ngoài cơ thể qua nước tiểu. Để tạo thành nước tiểu, quá trình lọc ở thận các mô thận sẽ có nhiều máu qua nhất, thời gian và lượng các chất chuyển hoá mà mô thận tiếp xúc thường là nhiều [38]. Các thuốc và sản phẩm chuyển hóa của thuốc

thường là những chất lạ đối với cơ thể, khi qua thận có thể gây độc và làm tổn thương thận, từ đó ảnh hưởng đến chức năng thận.

Hiện nay, creatinin là chỉ số thường được dùng để đánh giá và theo dõi chức năng thận [7], [39]. Nguyên nhân là do Creatinin là thành phần đậm trong máu ổn định nhất, gần như không phụ thuộc vào chế độ ăn hoặc những thay đổi sinh lý mà chỉ phụ thuộc vào khả năng đào thải của thận. Khi cầu thận bị tổn thương, nồng độ creatinin máu tăng sớm và tin cậy. Trong thí nghiệm này, kết quả định lượng creatinin trong máu chuột ở cả 2 lô uống bài thuốc Thông mạch Vintong ở cả 2 mức liều dùng, lượng creatinin sau 45 và 90 ngày uống thuốc thử không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng cũng như so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

Ngoài chỉ số creatinin, chỉ số Albumin máu cũng được dùng để đánh giá xem có tổn thương ở thận hay không. Mức nồng độ Albumin thấp cũng có thể phản ánh tình trạng tổn thương hoặc hư hại của thận do không thể ngăn chặn Albumin rò rỉ từ máu vào nước tiểu và mất đi nhanh chóng [39]. Trong trường hợp này, xét nghiệm nồng độ Albumin bên trong nước tiểu để có thể xác định chính xác hơn. Trong nghiên cứu này, việc dùng bài thuốc “Thông mạch Vintong” trong thời gian dài không bị ảnh hưởng lên nồng độ Albumin máu, và cũng là một bằng chứng chứng tỏ không gây tổn thương thận.

Các kết quả ở trên cũng hoàn toàn phù hợp với kết quả về mô bệnh học thận. Quan sát đại thể thận của tất cả các chuột nghiên cứu, cấu trúc vi thể thận của 30% số chuột thực nghiệm ở mỗi lô cho thấy: ở hai lô uống bài thuốc “Thông mạch Vintong”, hình ảnh cấu trúc vi thể các vùng chức năng của thận bình thường như chuột lô chứng.

Theo y học cổ truyền các dược liệu trong bài thuốc đều là những vị dược liệu được sử dụng lâu năm trong y học cổ truyền. Trong số các vị thuốc này, Thủy điệt là vị thuốc cần quan tâm vì có thể gây độc tính nhẹ,

đặc biệt tác dụng gây chảy máu khi dùng quá liều. Liều dùng trong dân gian khi dùng ở dạng thuốc sắc đối với dược liệu này là 3-6g/người/ngày. Trong bài thuốc “Thông mạch Vintong”, Thủy điệt được dùng với liều 5g là mức liều trung bình. Để giảm độc tính của dược liệu, phương pháp thường dùng là bào chế giảm độc tính hoặc kết hợp dược liệu để giảm độc tính. “Thông mạch Vintong” là bài thuốc gồm 13 vị thuốc: Đinh lăng, Nguưu tất, Hà thủ ô, Sơn tra, Tam thất, Địa long, Thủy điệt, Đông trùng hạ thảo, Xuyên khung, Xích thực, Chỉ xác, Cúc hoa, Bạch quả. Trong bài Đinh lăng, Nguưu tất, Tam thất, Xích thực 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 ứ; 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 ứ trệ, tan huyết khối. Các vị thuốc trong bài phối hợp có tác dụng chính hoạt huyết, khứ ứ, hành khí. Các vị thuốc được phối kết hợp theo đúng nguyên lý y học cổ truyền giúp giảm độc tính, tăng tác dụng điều trị. Kết quả thực nghiệm cho thấy với các mức liều và thời gian điều trị, bài thuốc “Thông mạch Vintong” an toàn. Kết quả này bước đầu cho thấy sự hợp lý trong phối hợp các vị thuốc trong bài thuốc.

4.2. Bàn luận về tác dụng tân tạo mạch máu não sau đột quy của bài thuốc “Thông mạch Vintong” trên động vật thực nghiệm.

Sau khi bị nhồi máu não, vùng não tổn thương thiếu máu, đòi hỏi những đáp ứng của cơ thể đối với tình trạng thiếu máu đó. Một trong những cơ chế đáp ứng của cơ thể đó là sự tăng tân tạo mạch, đặc biệt ở vùng giáp ranh tổn thương, nhằm tăng khả năng cung cấp máu đến vùng tổn thương. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy rõ hình ảnh tăng tân tạo mạch ở lô gây nhồi

máu so với lô chứng phẫu thuật (ảnh 13). 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 sự tân tạo mạch ở 2 lô chuột uống “Thông mạch Vintong” tăng cao hơn so với lô chứng nhồi máu (ảnh 13). Chỉ tiêu đánh giá quá trình tân tạo mạch được đánh giá thông qua hình ảnh nhuộm hoá mô miễn dịch cho biểu hiện CD31 và VEGF. CD31 (Cluster of differentiation 31 – dấu ấn 31) là protein thường tìm thấy trên các tế bào nội mô. Trong hình ảnh nhuộm CD31 ở não, các tế bào nội mô chủ yếu nằm ở lòng mạch máu, nên sự biểu hiện của hình ảnh này gián tiếp thể hiện hình ảnh của các vi mạch máu ở não. Vì thế, chỉ số mật độ vi mạch được đo bởi phần mềm Image J trên cơ sở hình ảnh nhuộm CD31 của não được dùng để đánh giá định lượng đối với khả năng tân tạo mạch. Kết quả đánh giá cũng cho thấy rõ sự tăng mật độ vi mạch ở các lô chuột uống “Thông mạch Vintong” (bảng 3.10). VEGF (Vascular endothelial growth factor - Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu), là một protein tín hiệu được sản xuất bởi các tế bào kích thích sự hình thành mạch máu. Việc tăng biểu hiện VEGF ở tiêu bản não chuột uống “Thông mạch Vintong” là một bằng chứng khách quan quan trọng khẳng định tác dụng kích thích tân tạo mạch của bài thuốc. Việc định lượng VEGF cần được tiến hành bằng kỹ thuật western blot, là một kỹ thuật hiện đại và cũng khá phức tạp. Trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ đánh giá VEGF thông qua hình ảnh nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép, kết quả thu được cũng khá rõ ràng. Tuy nhiên, việc đánh giá định lượng yếu tố này, cũng như đánh giá sâu hơn về các con đường, cơ chế tác dụng của bài thuốc “Thông mạch Vintong” trên mô hình gây nhồi máu não cũng cần được tiến hành thêm ở các nghiên cứu tiếp theo.

Theo y học hiện đại tác dụng dược lý của bài thuốc có thể được lý giải do bản thân các dược liệu thành phần có hiệu quả tốt đối với tái tạo thần kinh, mạch máu não, khi phối hợp hợp lý với nhau tạo nên được tác dụng hiệp

đồng. *Achyranthes bidentata* (Ngưu tất), có tác dụng tăng tốc độ tái tạo dây thần kinh ngoại vi của thỏ, giảm quá trình chết tế bào do glutamate gây ra ở các tế bào thần kinh hải mã [66], [45], [46]. *Polygonum multiflorum* Thunb. (Hà thủ ô), 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 [69]. Tam thất: (*Notoginsenosides*) 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... 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 [70]. 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 [70], do đó được nghiên cứu làm tan huyết khối đường uống [71]. 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 [72], [73], [74], [75].

KẾT LUẬN

1. Về độc tính cấp và bán trường diễn của bài thuốc “Thông mạch Vintong” trên động vật thực nghiệm.

1.1. Độc tính cấp theo đường uống trên chuột nhắt trắng

Chưa tìm thấy LD50 của bài thuốc “Thông mạch Vintong” theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống là 270g dược liệu/kg cân nặng chuột, mà không gây chết chuột nhắt trắng thực nghiệm chứng tỏ bài thuốc “Thông mạch Vintong” có khoảng an toàn điều trị rộng.

1.2. Độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng

Trên các lô chuột cống trắng uống bài thuốc “Thông mạch Vintong” liều 15,12g dược liệu/kg/ngày và liều 45,36g dược liệu/kg/ngày, liên tục trong 90 ngày cho thấy:

- Tình trạng chung gồm hoạt động, ăn uống, tình trạng lông, da, niêm mạc, chất tiết của chuột bình thường.
- Không gây ảnh hưởng đến sự phát triển cân nặng của chuột.
- Không làm thay đổi các chỉ số huyết học (số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, nồng độ huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu).
- Không làm thay đổi các chỉ tiêu sinh hóa máu bao gồm hoạt độ các enzym AST, ALT, Albumin, Creatinin và Cholesterol toàn phần.
- Không gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận.

Như vậy bài thuốc “Thông mạch Vintong” an toàn ở các mức liều dùng và thời gian sử dụng trong nghiên cứu thực nghiệm trên chuột cống trắng.

2. Kết luận về tác dụng tân tạo mạch máu não chuột sau đột quỵ 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, thể hiện:

- Làm tăng biểu hiện CD31 (Cluster of differentiation 31 – dấu ấn 31) trên tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch. CD31 là protein thường tìm thấy trên các tế bào nội mô. Trong hình ảnh nhuộm CD31 ở não, các tế bào nội mô chủ

yếu nằm ở lòng mạch máu, nên sự biểu hiện của hình ảnh này gián tiếp thể hiện hình ảnh của các vi mạch máu ở não.

- Làm tăng chỉ số mật độ vi mạch được đo bởi phần mềm Image J trên cơ sở hình ảnh nhuộm CD31 của não ($p < 0,01$ so với lô chứng gây nhồi máu).

- Làm tăng biểu hiện VEGF (Vascular endothelial growth factor

- Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu), là một protein tín hiệu được sản xuất bởi các tế bào kích thích sự hình thành mạch máu.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về tác dụng và cơ chế tác dụng của bài thuốc “Thông mạch Vintong” trên thực nghiệm.
- Đánh giá tính an toàn và tác dụng dự phòng, điều trị nhồi máu não của bài thuốc trên lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **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.
2. **Nguyễn Văn Đăng** (2001), Đột quy 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.
3. **Lê Đức Hình** (2009). “Tai biến mạch máu não”, Thần kinh học trong thực hành đa khoa, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
4. **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.
5. **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.
6. **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.
7. **Bộ Y tế** (2018). Thông tư 29/2018/TT-BYT, Thông tư quy định về thử thuốc trên lâm sàng.
8. **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.
9. **Bộ Y tế** (2012). Thông tư 03/2012/TT-BYT, Thông tư hướng dẫn về thử thuốc trên lâm sàng.
10. **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.
11. **Đỗ Trung Đàm** (1996). Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

12. **AHFS** (2019), Clinical drug information, Elsevier.
13. **Sun M.** (1983). Lots of talk about LD50, Science,222(4628), pg 1106.
14. **Viện dược liệu** (2006). Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật.
15. **Adams R.H.** (2016). The acute lethal dose 50 (LD50) of caffeine in albino rats, Regul Toxicol Pharmacol,80, pg 274-276.
16. Viện kiểm nghiệm (2005). Dự thảo hướng dẫn thử độc tính của thuốc.
17. **Tattersall M.L.** (1982). Statistics and the LD50 study, Arch Toxicol Suppl,5,pg 267-70.
18. **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.
19. **Arun Kumar Sharman** (1972). Chromosome techniques, Theory and practice, 2nd ed, Elsevier.
20. **B.H. Ch. Stricker** (1992). Drug induced hepatic injury, Drug – induced disorder Vol.5, Elsevier.
21. **Eward S.C., Walker R.** (1999). Clinical pharmacy and therapeutics, Churchill and Livingstone, 2nd ed.
22. **Nguyễn Văn Đăng** (2000). Tai biến mạch máu não – Chẩn đoán và điều trị, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
23. **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.
24. **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.
25. **Nguyễn Văn Đăng** (2006). Tai biến mạch máu não, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

26. **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.
27. **Dirnag Ulrich, Hermann Dirk M.** (2016). Rodent models of stroke, *Plos One*, pg 219-220.
28. **Chiang T., Messing R.O. et al** (2011). Mouse model of middle cerebral artery occlusion, *J Vis Exp*, 1-3(48), pg e2761.
29. **Lê Đức Hình, Đàm Duy Thiên** (2009). Một số thang điểm lượng giá chức năng thần kinh, trong “Tai biến mạch máu não, hướng dẫn chẩn đoán và xử trí”, Nhà xuất bản Y học, 662-676.
30. **Nguyễn Trung Hòa** (2012). Kinh văn 37, 38 trong Đông y toàn tập, Nhà xuất bản Thuận Hóa – Thừa Thiên Huế, 9-39; 336-338.
31. **An Nhân, Nguyễn Tử Siêu** (2002). Y học từng thư, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, 612-617; 622-637.
32. **Tuệ Tĩnh** (1996). Nam dược thần hiệu. Hiệu đính và khảo cứu: Lê Trần Đức (tái bản lần thứ tư), Nhà xuất bản Y học, 50-53.
33. **Nguyễn Văn Toại** (2011). Nguyên nhân gây bệnh, trong “Lý luận Y học cổ truyền”, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, 88-96.
34. **Hoàng Bảo Châu** (2006). Nội khoa Y học cổ truyền. Nhà xuất bản Y học, 18-35.
35. **Trần Thúy, Vũ Nam, Nguyễn Văn Toại** (2002). Lý luận Y học cổ truyền, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, 70-76.
36. **Đào Trọng Cường, Nguyễn Thiên Quyên** (2003). Chuẩn đoán phân biệt chứng trạng Đông y. Nhà xuất bản Cà Mau, 130-170.
37. **Vương Lâm Bằng** (2006). Chuyên đề ứng dụng Hoa đà tái tạo hoàn điều trị tai biến mạch não, 1-35.

38. **Đặng Tính** (2007). Nghiên cứu và phân tích lý luận, nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của chứng trúng phong, Tạp san Dược học Trung y Trung Hoa (05), 124-126.
39. **Trần Quốc Bảo** (2013). Kết hợp Y học cổ truyền trong điều trị đột quy não, trong “Đột quy não”, Nhà xuất bản Y học, 429-440.
40. **Nguyễn Nhượng Kim** (2011). Hội chứng bệnh Vệ khí dinh huyết, trong “Lý luận Y học cổ truyền”. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, 150-157.
41. **Triệu Ký, Trương Kiến Vinh** (2008). Phân tích cơ chế bệnh sinh và điều trị chứng trúng phong giai đoạn phục hồi. Tạp chí Bệnh viện Trung Y Sơn Tây (5), 59-60.
42. **Trương Văn Cao, Sử Đại Trác và cộng sự** (2008). Đặc thù trong điều trị chứng trúng phong bằng Y học cổ truyền. Nhà xuất bản Quân y Nhân dân Trung Quốc, 44-51.
43. **Nguyễn Văn Vụ** (2006). Nghiên cứu tác dụng điều trị nhồi máu não sau giai đoạn cấp của bài thuốc “Ký cục địa hoàng và Tứ vật đào hồng”, Luận án tiến sĩ Y học, Học viện Quân Y.
44. **Nguyễn Văn Trịnh** (2011). Đánh giá tác dụng điện châm kết hợp Tiểu tục mệnh thang so với điện châm kết hợp Hoa đà tái tạo hoàn ở bệnh nhân nhồi máu não, Luận văn Bác sĩ chuyên khoa cấp II, Trường Đại học Y Hà Nội.
45. **Hình Phong Lệ, Lý Thanh và cộng sự** (2005). Quan sát hiệu quả lâm sàng của An cung ngư hoàng hoàn trong điều trị 34 bệnh nhân trúng phong. Trung y Hà Bắc, 13-14.
46. **Vương Kim Hoa, Diệp Tổ Quang** (2003). So sánh hiệu quả của an cung ngư hoàng hoàn và giản phương. Tạp chí thuốc Trung Quốc (28), 636.
47. **Vương Thị Kim Chi** (2009). Nghiên cứu phương pháp xoa bóp – vận động kết hợp điện châm góp phần phục hồi chức năng vận động cho bệnh nhân nhồi máu não, Luận án Tiến sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.

48. **Hồ Hữu Lương** (2009). Châm cứu điều trị Tai biến mạch máu não, trong “Tai biến mạch máu não, hướng dẫn chẩn đoán và xử trí”. Nhà xuất bản Y học, 617-624.
49. **Nguyễn Tài Thu** (2009). Điều trị chứng liệt nửa người do tai biến mạch não bằng tân châm, trong “Tai biến mạch máu não, hướng dẫn chẩn đoán và xử trí”. Nhà xuất bản Y học, 607-616.
50. **Kim Đông** (2009). Thảo luận nghiên cứu chứng Trúng phong (nội kinh). Tạp chí Thế giới Đông Tây Y kết hợp (10), 18-20.
51. **Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự** (2006). Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tậpII, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
52. **Hoàng Duy Tân, Hoàng Anh Tuấn** (2016). Phương tế học, Nhà xuất bản Thuận Hóa.
53. **Trần Văn Kỳ** (2014). Dược học cổ truyền. Nhà xuất bản Đồng Nai.
54. **Đỗ Tất Lợi** (2015). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
55. **Bộ Y tế** (2018). Dược điển Việt Nam, lần xuất bản thứ năm, tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
56. **Uông Ngang, Trần Văn Quảng dịch** (2015). Thang đầu ca quyết, Nhà xuất bản Phương Đông.
57. **Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự** (2006). Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tậpIII, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
58. **Nguyễn Nhược Kim chủ biên** (2015). Phương tế học, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
59. **Gerhard Vogel Hans** (2012). Drug discovery and evaluation Pharmacological assays, Springer.

60. **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.
61. **World Health Organization** (2013). Working group on the safety and efficacy of herbal medicine, Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization.
62. **Đào Xuân Vinh** (2008). Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hóa, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
63. **Hiroshi Sugimoriab, Heather Speller, Seth PFinklestein** (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.
64. **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.
65. **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.
66. **Shen, H., Yuan, Y., Ding, F., Liu, J., and Gu, X.** (2008). The protective effects of *Achyranthes bidentata* polypeptides against NMDA-induced cell apoptosis in cultured hippocampal neurons through differential modulation of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors. *Brain Res. Bull.*
67. **Yu, S., Wang, C., Cheng, Q., Xu, H., Zhang, S., Li, L., et al.** (2014). An active component of *Achyranthes bidentata* polypeptides provides

- neuroprotection through inhibition of mitochondrial-dependent apoptotic pathway in cultured neurons and in animal models of cerebral ischemia.
68. **Wang, Y., Shen, W., Yang, L., Zhao, H., Gu, W., and Yuan, Y.** (2013). The protective effects of *Achyranthes bidentata* polypeptides on rat sciatic nerve crush injury causes modulation of neurotrophic factors. *Neurochem.*
69. **Zhang and Jianzong** ,(2018), Biological Effects of Tetrahydroxystilbene Glucoside: An Active Component of a Rhizome Extracted from *Polygonum multiflorum*. *Oxid Med Cell Longev.*
70. **H Mihara 1, H Sumi, T Yoneta, H Mizumoto, R Ikeda, M Seiki, M Maruyama** (1991) A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*, *Jpn J Physiol.*
71. **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.
72. **Zhou X, Qi Y, Chen T** (2017). Long-term pre-treatment of antioxidant Ginkgo biloba extract EGb-761 attenuates cerebral-ischemia-induced neuronal damage in aged mice. *Biomed Pharmacother*, 85:256-263.
73. **Abdel-Wahab BA, Abd El-Aziz SM** (2012). Ginkgo biloba protects against intermittent hypoxia-induced memory deficits and hippocampal DNA damage in rats. *Phytomedicine*, 19: 444-450.
74. **Zhao Y, Pan R, Li S, Luo Y, Yan F, Yin J, et al.** (2014). Chelating intracellularly accumulated zinc decreased ischemic brain injury through reducing neuronal apoptotic death.
75. **Kwon KJ, Lee EJ, Cho KS, Cho DH, Shin CY, Han SH** (2015). Ginkgo biloba extract (Egb761) attenuates zinc-induced tau phosphorylation at Ser262 by regulating GSK3beta activity in rat primary cortical neurons. *Food Funct*, 6: 2058-2067.

