

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



NGUYỄN THỊ THANH LOAN

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG DƯỢC LÝ
THEO HƯỚNG DỰ PHÒNG VÀ ĐIỀU TRỊ NHỒI
MÁU NÃO CỦA LÁ HỒNG (*DIOSPYROS KAKI* L.F.)
TRÊN THỰC NGHIỆM**

Chuyên ngành : Dược lý - Dược lâm sàng

Mã số : 9720205

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2023

Công trình hoàn thành tại:

- Khoa Dược lý-Sinh hóa, Viện Dược liệu
- Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Lê Thị Xoan
2. PGS. TS. Phạm Thị Vân Anh

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện
tại Viện Dược liệu.

Vào hồi giờ....., ngày tháng năm 2023

Có thể tìm hiểu Luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Viện Dược liệu

A. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của luận án

Nhồi máu não xảy ra khi dòng máu đột ngột không lưu thông đến một khu vực của não làm mất chức năng thần kinh tương ứng. Ngày nay, nhồi máu não là nguyên nhân gây tử vong đứng thứ hai trong các nguyên nhân gây tử vong và là nguyên nhân gây tàn phế hàng đầu. Tuy nhiên, việc điều trị còn nhiều hạn chế. Cho đến nay, thuốc hoạt hóa plasminogen mô tái tổ hợp là thuốc được cấp phép trong điều trị nhồi máu não với khả năng làm tan cục máu đông và phục hồi sự tưới máu đến vùng não bị thiếu máu. Tuy nhiên, thuốc có giới hạn phạm vi tác dụng trong vòng 4,5 giờ tính từ thời điểm bắt đầu bị nhồi máu não và việc sử dụng các thuốc này có nguy cơ gây tử vong do xuất huyết não [1]. Do đó, việc phát triển các liệu pháp mới để dự phòng và điều trị nhồi máu não là rất cần thiết.

Cây hồng (*Diospyros kaki* L.f.) thuộc họ Thị (*Ebenaceae*) là một cây ăn quả lâu năm và được trồng phổ biến tại Việt Nam. Một số nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh được lá hồng có nhiều tác dụng sinh học như kháng khuẩn, chống ung thư, chống oxy hóa,...[2]. Liên quan đến tác dụng trên nhồi máu não, Bei W và cộng sự đã chỉ ra rằng cao chiết giàu flavonoid từ lá hồng có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh trên mô hình gây tắc động mạch não giữa [3]. Tuy nhiên, cơ chế bảo vệ tế bào thần kinh của lá hồng cũng chưa được làm sáng tỏ. Bên cạnh đó, tác dụng của lá hồng lên một số yếu tố nguy cơ liên quan đến nhồi máu não như tác dụng hạ huyết áp và tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu cũng cần được làm rõ.

Vì vậy, đề tài “Nghiên cứu tác dụng dược lý theo hướng dự phòng và điều trị nhồi máu não của lá hồng (*Diospyros kaki* L.f.) trên thực nghiệm” được thực hiện nhằm đánh giá tác dụng và cơ chế tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của DK và một số flavonoid phân lập trên mô hình nhồi máu não thực nghiệm, đồng thời, đánh giá tác dụng của DK lên một số yếu tố nguy cơ liên quan đến nhồi máu não gồm tăng huyết áp và rối loạn lipid máu. Thêm vào đó, đề tài cũng đóng góp vào việc phát triển các sản phẩm phòng và điều trị nhồi máu não từ lá hồng được trồng tại Việt Nam, đồng thời tạo cơ sở cho công tác tiêu chuẩn hóa chất lượng sản phẩm ở các giai đoạn sản xuất sau này và ứng dụng trong chăm sóc sức khỏe cộng đồng với minh chứng khoa học rõ ràng.

2. Mục tiêu của Luận án

Mục tiêu 1: Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của cao định chuẩn lá hồng và flavonoid tiềm năng trên mô hình nhồi máu não thực nghiệm.

Mục tiêu 2: Đánh giá tác dụng của cao định chuẩn lá hồng lên một số yếu tố nguy cơ liên quan đến nhồi máu não trên thực nghiệm.

3. Bố cục của Luận án

Luận án gồm 142 trang, bao gồm: Đặt vấn đề (02 trang); Chương 1. Tổng quan (33 trang); Chương 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu (27 trang); Chương 3. Kết quả nghiên cứu (43 trang); Chương 4. Bàn luận (34 trang); Kết luận (02 trang) và Kiến nghị (01 trang).

Luận án có 193 tài liệu tham khảo trong đó có 11 tài liệu tiếng Việt và 182 tài liệu tiếng Anh. Luận án có 17 bảng, 52 hình và 05 phụ lục kèm theo.

B. NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về nhồi máu não

Nhồi máu não do tắc nghẽn mạch bởi huyết khối hoặc cục tắc ở động mạch não gây thiếu oxy và giảm ATP tế bào dẫn đến tổn thương và huỷ hoại tế bào thần kinh. Cơ chế gây tổn thương thông qua kích thích gây độc tế bào, tạo stress oxy hoá, gây viêm, rối loạn chức năng hàng rào máu não và kích hoạt quá trình chết tế bào theo chương trình. Hiện nay, thuốc tiêu sợi huyết duy nhất được chứng minh có hiệu quả trên những bệnh nhân bị thiếu máu não cấp tính là alteplase. Chỉ định dùng thuốc tiêu sợi huyết khi bệnh nhân đến sớm trước 4,5 giờ kể từ khi khởi phát. Tuy nhiên, tác dụng không mong muốn thường gặp nhất khi sử dụng thuốc này là biến chứng chảy máu [4]. Ngoài ra, thuốc bảo vệ tế bào thần kinh trong dự phòng và điều trị nhồi máu não đang là xu hướng được tập trung nghiên cứu trong nhiều năm gần đây. Thuốc bảo vệ tế bào thần kinh đề cập đến bất cứ tác nhân nào có khả năng làm giảm tổn thương não bằng cách chống lại các phản ứng bất lợi với tế bào thần kinh gây ra bởi thiếu máu não cục bộ thay vì cải thiện lưu lượng máu não [4]. Edaravon là thuốc bảo vệ tế bào thần kinh được sử dụng để điều trị đột quỵ thiếu máu não cục bộ tại Nhật với đặc tính chống oxy hóa mạnh, giảm phản ứng viêm và ngăn gây chết tế bào theo chương trình [5]. Hơn nữa, bên cạnh điều trị, dự phòng nhồi máu não bằng cách kiểm soát các yếu tố nguy cơ gồm tăng huyết áp, rối loạn lipid máu đóng vai trò quan trọng trong điều trị đột quỵ não.

1.2. Mô hình nhồi máu não

Mô hình gây thiếu oxy và glucose (Oxygen and Glucose Deprivation, OGD) trên lát cắt hồi hải mã nuôi cấy

Mô hình nhồi máu não *in vitro* trên lát cắt vùng hải mã nuôi cấy được sử dụng để đánh giá tác dụng bảo vệ thần kinh do đây là vùng dễ bị tổn thương trước tác động của thiếu máu cục bộ. Ưu điểm của mô hình này là lát cắt vùng hải mã nuôi cấy vẫn giữ được cấu trúc không gian ba chiều của các mô thần kinh tương tự như trên *in vivo*. Trên mô hình này tình trạng thiếu máu não được gây ra bởi cách thay thế môi trường cân bằng O₂/CO₂ bằng môi trường chứa N₂/CO₂, không có oxy. Đồng thời, glucose bị loại bỏ trong môi trường nuôi cấy. Mô hình OGD có thể gây chết tế bào thần kinh tương tự như những đặc điểm quan sát thấy trong thiếu máu não cục bộ *in vivo* [6].

Mô hình gây tắc động mạch não giữa (Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO)

Mô hình nhồi máu não được nghiên cứu phát triển tập trung vào động mạch não giữa do đa số các trường hợp nhồi máu não xảy ra tại vùng não được cung cấp bởi động mạch này. Phương pháp gây tắc động mạch não giữa bằng cách đưa một sợi chỉ đơn có đầu bọc silicon từ động mạch cảnh ngoài, đi qua động mạch cảnh chung vào động mạch cảnh trong cho đến khi đầu sợi chỉ bắt gặp đa giác Willis và bít được gốc của động mạch não giữa. Do có thể rút sợi chỉ đơn này ra khỏi mạch máu một cách chủ động nên có thể gây mô hình thiếu máu não tạm thời hoặc vĩnh viễn. Ưu điểm của mô hình này là tạo ra tổn thương lặp lại, tỉ lệ thành công cao, thích hợp cho nghiên cứu dài ngày sau khi gây thiếu máu não, không đòi hỏi phải phẫu thuật xâm lấn sọ não nên ít ảnh hưởng đến áp lực nội sọ và nhiệt độ trong sọ [7].

1.3. Lá hồng (*Diospyros kaki* L.f.)

Lá hồng được ghi nhận trong Y học cổ truyền Trung Quốc bởi Lan Mao từ thời nhà Minh. Từ nhiều năm, lá hồng được dùng như một loại trà phổ biến ở Trung Quốc và Nhật Bản với các tác dụng hạ huyết áp, điều chỉnh rối loạn lipid máu, phòng ngừa sự tích tụ của melamin, chống lão hóa. Đến nay, các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng lá hồng là một dược liệu có nhiều tác dụng sinh học khác nhau. Trong khi đó, flavonoid là hợp chất chính trong lá hồng [2]. Tổng quan về các tác dụng của lá hồng cho thấy cao chiết flavonoid có tiềm năng trong dự phòng nhồi máu não với tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh trên thực nghiệm [3]. Tuy nhiên, tác dụng này của lá hồng chưa được nghiên cứu sâu về cơ chế, cũng như chưa chỉ ra chất phân lập nào trong lá hồng có tiềm năng nhất trong điều trị nhồi máu não. Hơn nữa, tác dụng của cao chiết flavonoid của lá hồng lên một số yếu tố nguy cơ liên quan đến nhồi máu não gồm tác dụng hạ huyết áp và tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu vẫn chưa được làm rõ.



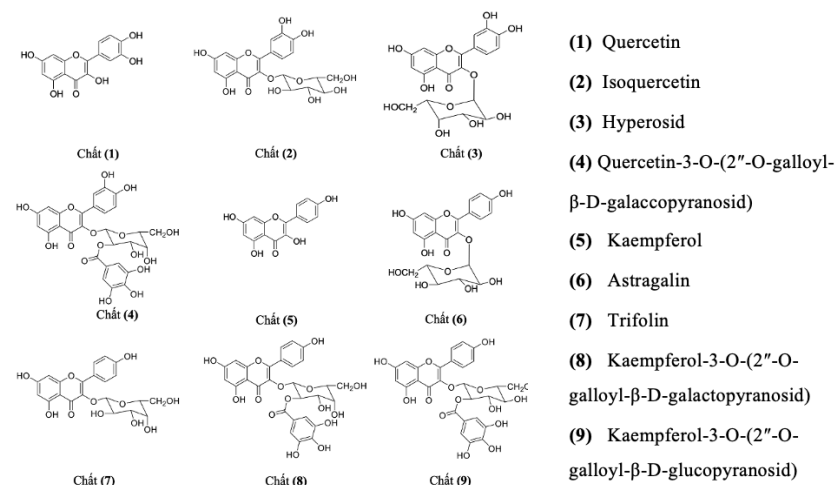
Hình 1.6. Hình ảnh cây hồng (*Diospyros kaki* L.f.) tại Lạng Sơn và hình ảnh lá hồng

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

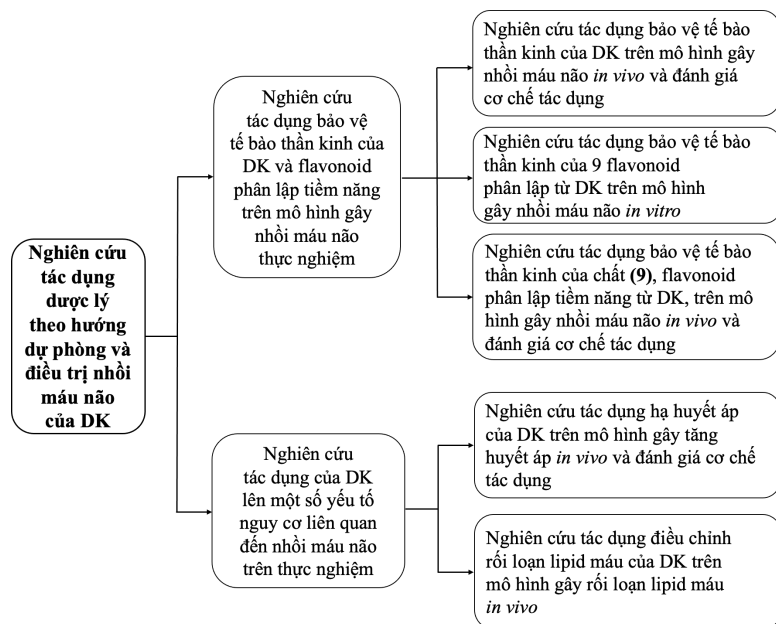
Thuốc thử trong nghiên cứu gồm cao định chuẩn lá hồng có hàm lượng flavonoid đạt 21% và 9 flavonoid phân lập từ cao định chuẩn lá hồng (Hình 2.2) được cung cấp bởi Khoa Hóa thực vật, Viện Dược liệu. Cao định chuẩn lá hồng đạt Tiêu chuẩn cơ sở. Trong nghiên cứu cao định chuẩn lá hồng được viết tắt là DK.



Hình 2.2. Công thức hoá học của 9 flavonoid phân lập từ DK

Động vật thí nghiệm gồm chuột nhắt trắng non (7 ngày tuổi) và chuột trưởng thành (7-8 tuần tuổi, cân nặng 30 - 35 g) chủng *Swiss albino* và chuột cống chủng *Wistar* trưởng thành, khỏe mạnh, cân nặng 200 ± 20 g.

2.2. Nội dung nghiên cứu



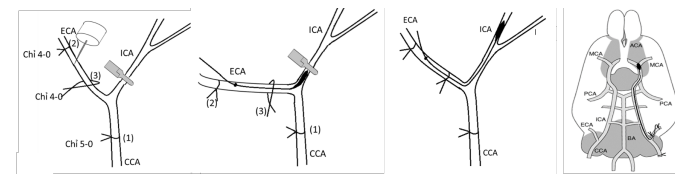
Hình 2.4. Nội dung nghiên cứu của luận án

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của DK và flavonoid tiềm năng trên mô hình nhồi máu não

Mô hình MCAO/tái tưới máu

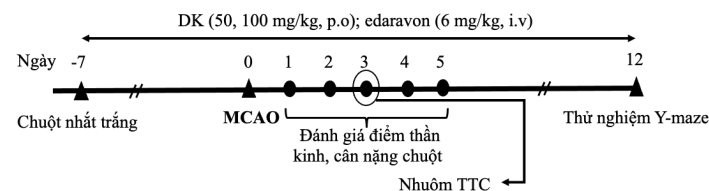
Mô hình gây tắc động mạch não giữa được tiến hành bằng cách đưa một sợi chỉ đơn có đầu bọc silicon từ động mạch cảnh ngoài, đi qua động mạch cảnh chung vào động mạch cảnh trong cho đến khi đầu sợi chỉ bắt gặp đa giác Willis và bít được gốc của động mạch não giữa. Sau 60 phút làm tắc mạch động mạch não giữa, sợi chỉ đơn được rút ra khỏi động mạch chuột để tái tưới máu (Hình 2.6).



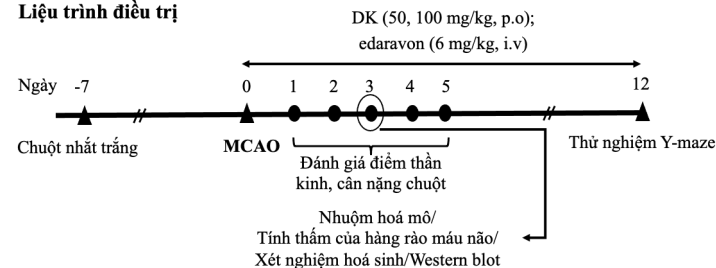
Hình 2.6. Quy trình phẫu thuật gây MCAO/tái tưới máu trên chuột nhắt

Nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của DK trên mô hình gây MCAO/tái tưới máu được thiết kế theo hai hướng gồm liệu trình dự phòng khi chuột được bắt đầu uống DK và tiêm edaravon 7 ngày trước khi gây mô hình MCAO/tái tưới máu và liệu trình điều trị khi chuột được bắt đầu uống DK và tiêm edaravon ngay sau khi tái tưới máu trên chuột MCAO/tái tưới máu. Chúng đương sử dụng trong nghiên cứu là edaravon tiêm tĩnh mạch liều 6 mg/kg/ngày.

Liệu trình dự phòng



Liệu trình điều trị

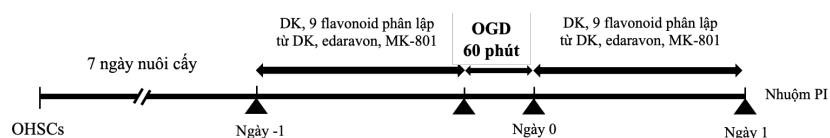


Hình 2.5. Thiết kế nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của DK theo hướng dự phòng và điều trị trên mô hình MCAO/tái tưới máu

Đánh giá cơ chế tác dụng bảo vệ thần kinh của DK

Xác định cơ chế bảo vệ tế bào thần kinh bằng phương pháp nhuộm Nissl để đánh giá số lượng tế bào thần kinh ở vùng vỏ não, thể vân và vùng hồi hải mã (CA1, CA3) trên lát cắt não chuột; số lượng tế bào chết theo chương trình ở vỏ não và thể vân được phát hiện bằng phương pháp nhuộm Tunel; xác định cân nặng não và sự toàn vẹn của hàng rào máu não thông qua sử dụng thuốc nhuộm Evans Blue; xác định tính chống oxy hoá qua định lượng hàm lượng malondialdehyd (MDA) và glutathion (GSH) trong vỏ não; mức độ biểu hiện của yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), Akt, p-Akt, và caspase-3 trong vỏ não chuột được xác định bằng kỹ thuật Western blot.

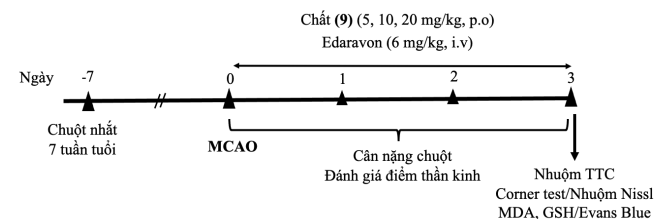
Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của một số flavonoid phân lập từ DK trên mô hình OGD trên lát cắt hồi hải mã nuôi cấy



Hình 2.9. Thiết kế nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của DK và 9 flavonoid phân lập từ lá hồng trên mô hình gây thiếu máu não cục bộ *in vitro*

Lát cắt hồi hải mã được gây thiếu oxy và glucose trong 60 phút. Thuốc thử hoặc chứng dương được bổ sung vào môi trường nuôi cấy 24 giờ trước và 24 giờ sau quá trình OGD. Mức độ tổn thương tế bào trên OHSCs được đánh giá bằng cách xác định mức độ hấp thụ propidium iodid (PI) của lát cắt sau 24 giờ xử lý OGD.

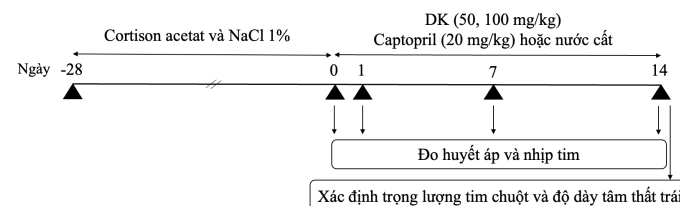
Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của chất (9) trên mô hình MCAO/tái tưới máu trên chuột nhắt trắng



Hình 2.10. Thiết kế nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của chất (9) trên mô hình MCAO/tái tưới máu

2.3.2. Đánh giá tác dụng của DK lên một số yếu tố nguy cơ liên quan đến nhồi máu não trên thực nghiệm

Đánh giá tác dụng hạ huyết áp của DK



Hình 2.12. Thiết kế nghiên cứu tác dụng hạ huyết áp của DK

Cơ chế ức chế enzym chuyển angiotensin của DK được đánh giá trên *in vitro*.

Đánh giá tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu của DK

Tác dụng DK trên mô hình chuột gây rối loạn lipid máu bằng tyloxapol: Chuột được uống DK hoặc fenofibrat 1 tuần trước khi tiêm tyloxapol. Chuột được nhịn đói 16 giờ trước khi tiêm tyloxapol liều 250 mg/kg. Sau 20 giờ tiêm tyloxapol, lấy máu chuột để xác định các chỉ số lipid máu.

Tác dụng của DK trên mô hình chuột gây rối loạn lipid máu bằng hỗn hợp dầu cholesterol: DK và atorvastatin được cho chuột uống sau 2 giờ uống hỗn hợp dầu cholesterol gồm cholesterol, dầu lạc, acid cholic và propylthiouracil. Chỉ số nghiên cứu bao gồm cân nặng chuột, chỉ số lipid máu và hoạt độ AST, ALT trong huyết thanh chuột.

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu thu được được xử lý theo các phương pháp phân tích thống kê sinh học phù hợp trên phần mềm phân tích chuyên dụng Sigma Plot 14.0. Giá trị $p < 0,05$ được coi là đạt ý nghĩa thống kê.

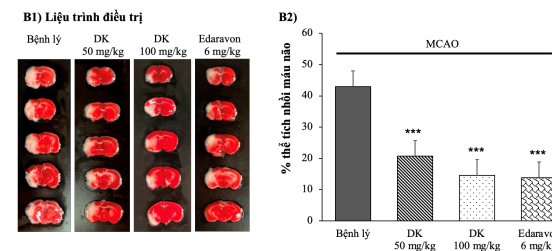
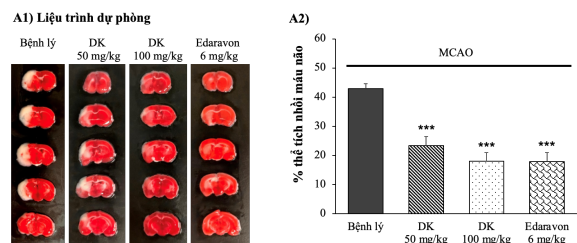
Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của DK và flavonoid tiềm năng trên mô hình nhồi máu não thực nghiệm

3.1.1. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của DK trên mô hình MCAO/tái tưới máu

DK liều 50 và 100 mg/kg và edaravon liều 6 mg/kg thể hiện tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh thông qua cải thiện cân nặng chuột, giảm thể tích nhồi máu não (Hình 3.1) và cải thiện chức năng thần kinh của chuột MCAO/tái tưới máu.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của DK lên thể tích nhồi máu não trên chuột MCAO/tái tưới máu

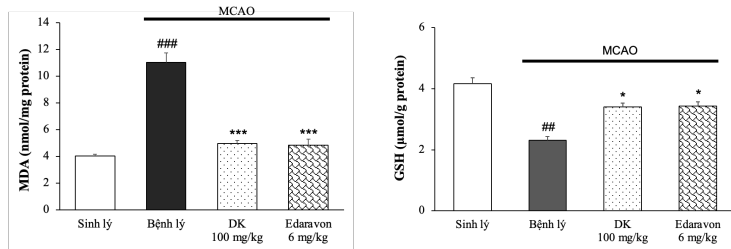
A1-B1) Hình ảnh các lát cắt não được nhuộm TTC. A2-B2) Kết quả phân tích phần trăm thể tích nhồi máu não của chuột sau 72 giờ MCAO/tái tưới máu. Số liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SEM. *** $p < 0,001$ so với lô bệnh lý

Trí nhớ không gian của chuột được đánh giá trên thử nghiệm Y-maze cải tiến. Trong nghiên cứu theo liệu trình dự phòng, DK liều 50 và 100 mg/kg và edaravon liều 6 mg/kg cải thiện sự thiếu hụt về trí nhớ không gian của chuột MCAO. Với liệu trình điều trị, DK liều 100 mg/kg cải thiện sự thiếu hụt về trí nhớ không gian của chuột MCAO.

Cơ chế bảo vệ tế bào thần kinh của DK trên mô hình MCAO/tái tưới máu

DK làm tăng số lượng tế bào thần kinh nguyên vẹn tại vùng vỏ não, thể vân và hồi hải mã (CA1, CA3). Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh liên quan đến các cơ chế sau:

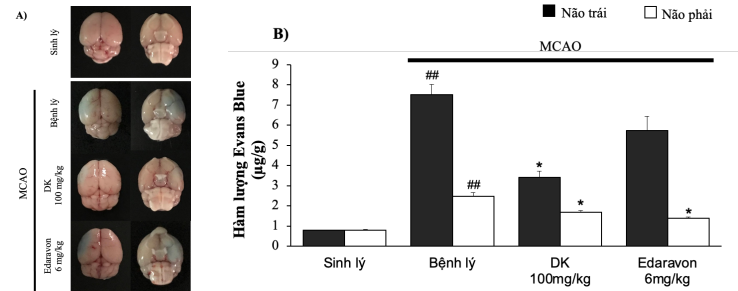
Cơ chế chống oxy hoá: DK liều 100 mg/kg và edaravon liều 6 mg/kg làm giảm hàm lượng MDA và tăng GSH có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý (Hình 3.6).



Hình 3.6. Ảnh hưởng của DK đến hàm lượng GSH và MDA trong vỏ não chuột

Số liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ so sánh với lô bệnh lý, # $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ so sánh với lô sinh lý

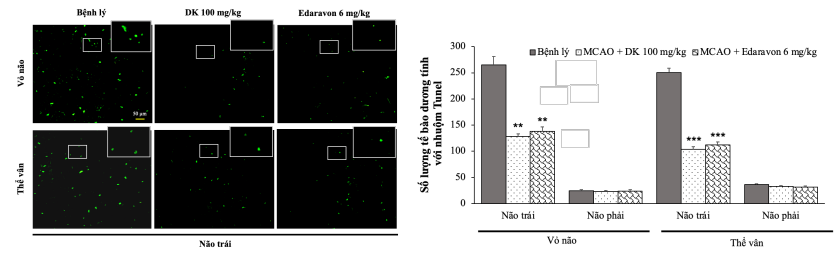
Cơ chế bảo vệ tính toàn vẹn của hàng rào máu não: Điều trị bằng DK liều 100 mg/kg có tác dụng làm giảm hàm lượng Evans Blue trong não trái và não phải của chuột so với lô bệnh lý (Hình 3.7).



Hình 3.7. Ảnh hưởng của DK đến sự toàn vẹn của hàng rào máu não.

A) Hình ảnh lát cắt não của chuột MCAO tiêm dung dịch Evans Blue sau 72 giờ gây MCAO/tái tưới máu. B) Kết quả hàm lượng Evans Blue trong não của chuột. Số liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ so với lô bệnh lý, # $p < 0,01$ so với lô sinh lý

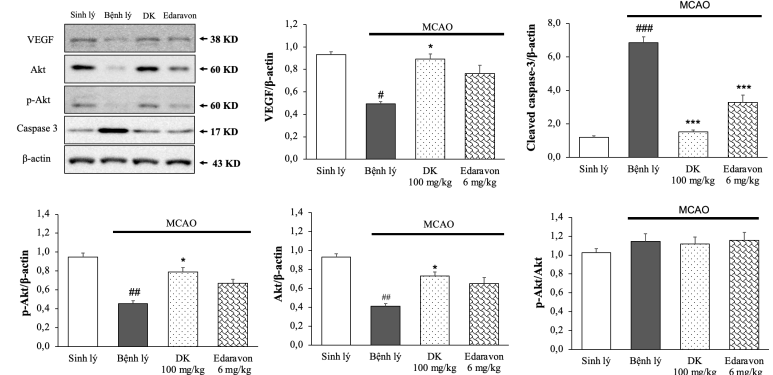
Cơ chế chống chết tế bào theo chương trình: DK liều 100 mg/kg và edaravon liều 6 mg/kg làm giảm số lượng tế bào dương tính với nhuộm Tunel so với lô bệnh lý trên vùng vỏ não và thể vân (Hình 3.9).



Hình 3.9. Ảnh hưởng của DK đến số lượng tế bào thần kinh chết theo chương trình trên lát cắt não nhuộm Tunel

Số liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SEM. * $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ so sánh với lô bệnh lý. Độ phóng đại 200 lần

DK làm tăng mức độ biểu hiện của VEGF, Akt, p-Akt và giảm mức độ biểu hiện của caspase-3 trong vỏ não chuột (Hình 3.10).



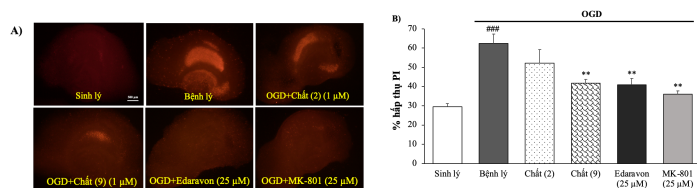
Hình 3.10. Ảnh hưởng của DK lên mức độ biểu hiện của VEGF, Akt, p-Akt và caspase-3 trong vỏ não chuột

Số liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ so sánh với lô bệnh lý, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ so sánh với lô sinh lý

3.1.2. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của DK và flavonoid tiềm năng trên mô hình thiếu máu não trên lát cắt hồi hải mã nuôi cấy

Mô hình OGD lên lát cắt hồi hải mã nuôi cấy được sử dụng để đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của 9 flavonoid phân lập (chất (1)-

(9) từ đó nhằm tìm ra flavonoid tiềm năng nhất trong tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của DK. Kết quả cho thấy chất (9) là flavonoid có tiềm năng nhất về tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh trên mô hình gây thiếu oxy và glucose não *in vitro* khi thể hiện tác dụng ở nồng độ 1 - 25 μM . Vì vậy, chất (9) tiếp tục tiến hành nghiên cứu tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh trên động vật thực nghiệm.



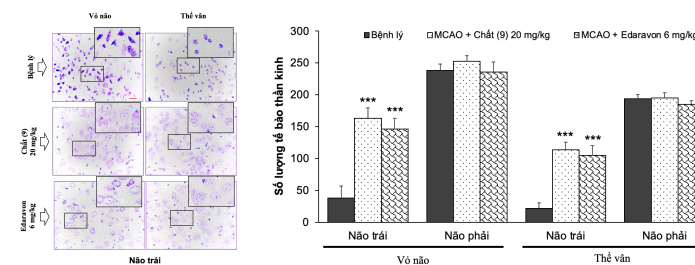
Hình 3.15. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của quercetin, kaempferol và các dẫn xuất ở mức liều 1 μM trên mô hình OGD trên lát cắt hồi hải mã nuôi cấy

A) Hình ảnh đặc trưng lát cắt hồi hải mã sau 24 giờ gây OGD. B) % hấp thụ PI. Kết quả được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình \pm SEM. $###p < 0,001$ so sánh với OHSCs bình thường. $*p < 0,01$ so sánh với OHSCs bệnh lý. Độ phóng đại 40 lần

3.1.3. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của chất (9) trên mô hình MCAO/tái tưới máu

Chất (9) liều 10 và 20 mg/kg và edaravon liều 6 mg/kg thể hiện tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh thông qua cải thiện cân nặng chuột, giảm thể tích nhồi máu não và cải thiện chức năng thần kinh của chuột MCAO/tái tưới máu. Ngoài ra, chất (9) cải thiện hành vi của chuột trong thử nghiệm quay góc.

Chất (9) liều 20 mg/kg làm tăng số lượng tế bào thần kinh nguyên vẹn tại vùng vỏ não và thể vân (Hình 3.18).

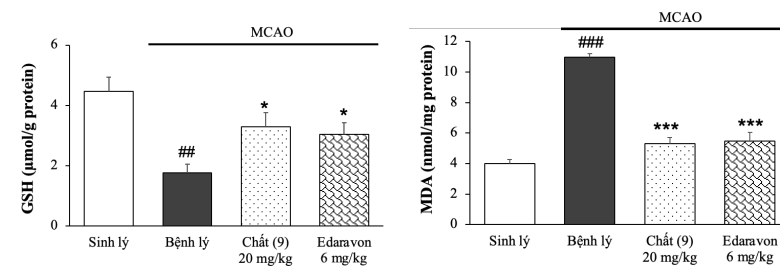


Hình 3.18. Ảnh hưởng của chất (9) đến mức độ tổn thương tế bào thần kinh ở vỏ não và thể vân bằng phương pháp nhuộm Nissl. Số lượng tế bào thần kinh trên lát cắt não tại vị trí Bregma từ 0,02 mm đến -0,01 mm ở vật kính $\times 40$ trên vi trường $500 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$. Thanh tỉ lệ màu đỏ chỉ $50 \mu\text{m}$. Số liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SEM ($n=6$). $***p < 0,001$ so với lô bệnh lý

Cơ chế tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của chất (9):

Cơ chế bảo vệ tính toàn vẹn của hàng rào máu não: Kết quả nghiên cứu cho thấy chất (9) liều 20 mg/kg làm giảm đáng kể hàm lượng Evans Blue trong não chuột so với lô bệnh lý.

Cơ chế chống oxy hoá: chất (9) liều 20 mg/kg làm giảm rõ rệt hàm lượng MDA và tăng hàm lượng GSH trong vỏ não chuột so với lô bệnh lý (Hình 3.21).



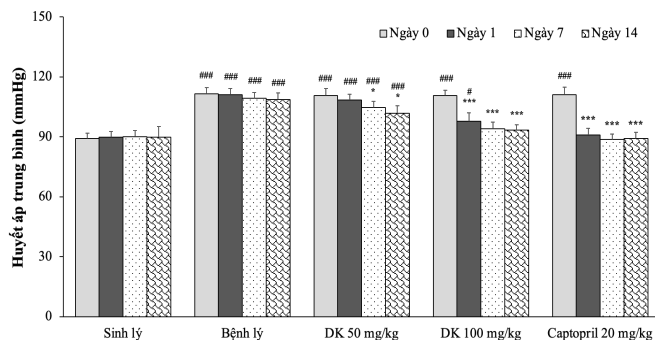
Hình 3.21. Ảnh hưởng của chất (9) đến hàm lượng MDA và GSH trong vỏ não chuột

Số liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SEM. $*p < 0,05$, $***p < 0,001$ so với lô bệnh lý, $##p < 0,01$, $###p < 0,001$ so với lô sinh lý

3.2. Tác dụng của DK lên một số yếu tố nguy cơ liên quan đến nhồi máu não trên thực nghiệm

3.2.1. Tác dụng hạ huyết áp của DK

DK hạ huyết áp tâm thu, huyết áp tâm trương, huyết áp trung bình và không ảnh hưởng đến nhịp tim trên chuột cống gây tăng huyết áp bằng cortison acetat và NaCl (Hình 3.23).

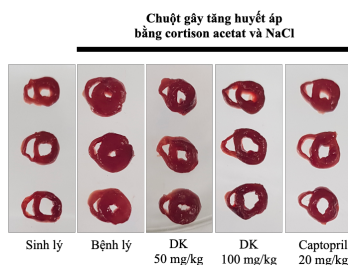


Hình 3.23. Ảnh hưởng của DK lên huyết áp trung bình của chuột

Kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm SEM. $^{###}p < 0,01$,

$^{####}p < 0,001$ so với lô sinh lý; $^{*}p < 0,05$, $^{***}p < 0,001$ so với lô bệnh lý

DK làm giảm cân nặng tim và độ dày tâm thất của chuột cống tăng huyết áp (Hình 3.25).



Hình 3.25. Hình ảnh lát cắt tâm thất trái của chuột

Độ dày tâm thất trái (lấy giá trị trung bình của 9 vị trí đo) được xác định bằng phần mềm Image-J

DK ức chế enzym chuyển angiotensin in vitro

DK có tác dụng ức chế ACE phụ thuộc liều, ức chế hoàn toàn ở nồng độ 25 $\mu\text{g/ml}$. Captopril có tác dụng ức chế ACE hoàn toàn ở nồng độ 100 nM. IC_{50} của DK và captopril lần lượt là $4,71 \pm 0,53 \mu\text{g/ml}$ và $17,95 \pm 1,99 \text{ nM}$.

3.2.2. Tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu của DK

Tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu của DK trên mô hình gây rối loạn lipid máu bằng tyloxapol

DK liều 100 mg/kg và 300 mg/kg có tác dụng làm giảm nồng độ triglycerid so với lô bệnh lý. DK liều 50, 100 và 300 mg/kg có xu hướng làm giảm nồng độ cholesterol so với lô bệnh lý nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

DK liều 50 và 100 mg/kg có tác dụng làm tăng HDL-C có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý. DK liều 100 mg/kg có tác dụng hạ LDL-C và non-HDL-C có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý.

Tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu của DK trên mô hình gây rối loạn lipid máu bằng hỗn hợp dầu cholesterol

Ảnh hưởng của DK đến cân nặng của chuột: Tại thời điểm sau 4 tuần, cân nặng của chuột lô uống DK liều 50 và 100 mg/kg tăng có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý.

Ảnh hưởng của DK đến chỉ số lipid máu: Tại thời điểm sau 2 tuần uống thuốc thử, DK liều 100 mg/kg giảm có ý nghĩa thống kê nồng độ cholesterol toàn phần so với lô bệnh lý. Tại thời điểm kết thúc nghiên cứu, DK liều 50 và 100 mg/kg làm giảm nồng độ triglycerid và cholesterol toàn phần so với lô bệnh lý. Không có sự khác biệt về nồng

độ HDL-C giữa các lô nghiên cứu. DK liều 100 mg/kg làm giảm nồng độ non-HDL-C, LDL-C so với lô bệnh lý tại thời điểm sau 4 tuần.

Ảnh hưởng của DK đến mức độ huỷ hoại tế bào gan: Kết quả nghiên cứu cho thấy tại thời điểm sau 4 tuần, DK làm giảm hoạt độ AST và ALT có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Đóng góp mới của luận án

4.1.1. Mô hình thực nghiệm

Nghiên cứu là một trong số ít công trình đã triển khai thành công các mô hình nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* để đánh giá tác dụng dược lý theo hướng dự phòng và điều trị nhồi máu não:

- Nghiên cứu triển khai thành công mô hình MCAO/tái tưới máu trên chuột nhắt trắng và mô hình gây thiếu oxy và glucose trên lát cắt hồi hải mã nuôi cấy áp dụng tại Việt Nam. Đây là mô hình nhồi máu não *in vivo* và *in vitro* để đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của thuốc thử. Trong nghiên cứu này, chuột nhắt được gây thành công mô hình MCAO/tái tưới máu với thể tích nhồi máu não được xác định bằng nhuộm TTC khoảng 40%, có tổn thương chức năng thần kinh rõ rệt với điểm thần kinh cao được đánh giá theo thang điểm của Menzies và cộng sự, đồng thời chuột thể hiện sự thiếu hụt về trí nhớ không gian ngắn hạn được chứng minh trên thử nghiệm Y-maze cải tiến. Với mô hình nhồi máu não *in vitro*, gây OGD trên lát cắt hồi hải mã nuôi cấy với thời gian 60 phút cho thấy kết quả về tỉ lệ tổn thương tế bào thần kinh 60% là phù hợp để đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của thuốc thử. Ưu điểm nổi bật nhất của mô hình này là giữ được cấu trúc cấu trúc không gian ba chiều của các mô thần kinh tương tự như trên mô não *in vivo*.

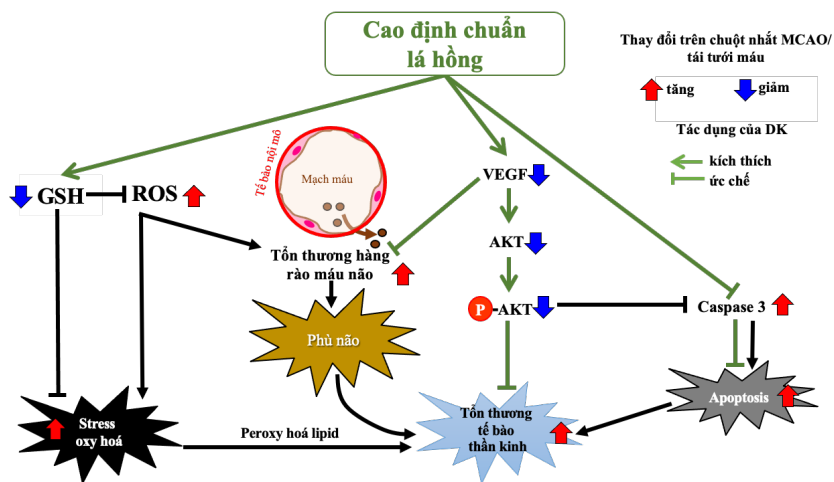
- Ngoài ra, nghiên cứu đã đề xuất thêm công cụ hữu ích nhằm xác định một số chỉ số đánh giá trên mô hình nhồi máu não bao gồm quy trình đánh giá tính toàn vẹn của hàng rào máu não bằng phương pháp tiêm dung dịch Evans Blue, quy trình nhuộm Nissl để xác định số lượng tế bào thần kinh tại một số vùng của não.

4.1.2. Tác dụng và cơ chế tác dụng của DK theo hướng dự phòng và điều trị nhồi máu não trên thực nghiệm

Trong luận án này, lần đầu tiên tác dụng dự phòng và điều trị nhồi máu não cũng như cơ chế tác dụng của DK được nghiên cứu một cách có hệ thống, cung cấp bằng chứng khoa học cho sử dụng DK trong nhồi máu não:

- Kết quả nghiên cứu đã chứng minh được tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh trong điều trị nhồi máu não và cơ chế tác dụng của DK trên mô hình gây tắc động mạch não giữa (MCAO)/tái tưới máu. Trong đó nghiên cứu cơ chế tác dụng của DK là điểm nổi bật trong luận án. Cơ chế tác dụng của DK liên quan đến chống oxy hoá, chống chết tế bào theo chương trình và duy trì tính toàn vẹn của hàng rào máu não thông qua con đường truyền tín hiệu VEGF/Akt. Kết quả này cung cấp bằng chứng khoa học có ý nghĩa cho nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng trong tương lai về tác dụng bảo vệ thần kinh của DK trong nhồi máu não.

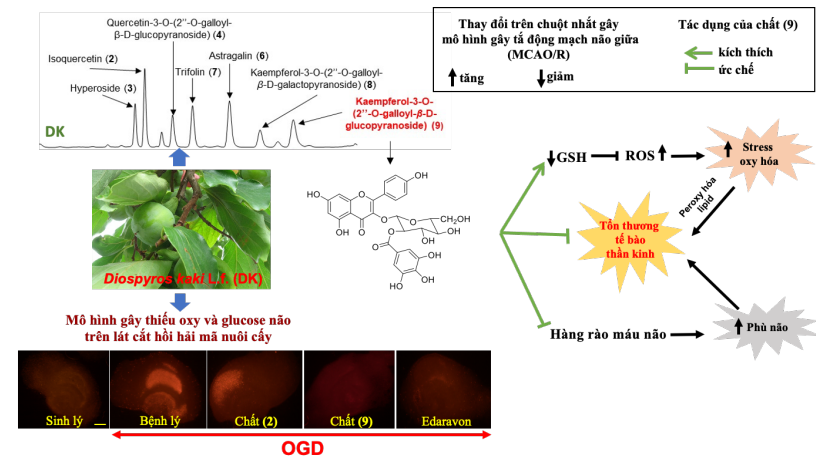
- Đồng thời, nghiên cứu đã chứng minh được tác dụng của DK lên một số yếu tố nguy cơ liên quan đến nhồi máu não gồm hạ huyết áp và điều chỉnh rối loạn lipid máu. Với tác dụng hạ huyết áp thông qua cơ chế ức chế enzym chuyển angiotensin và lợi ích trên tim mạch, DK cho thấy tiềm năng trong điều trị tăng huyết áp, một yếu tố nguy cơ quan trọng của nhồi máu não. Ngoài ra, tác dụng điều trị rối loạn lipid máu theo cả hai cơ chế nội sinh và ngoại sinh của DK cũng góp phần vào dự phòng nhồi máu não.



Hình 4.1. Cơ chế bảo vệ tế bào thần kinh của DK

4.1.3. Tác dụng và cơ chế tác dụng của flavonoid tiềm năng của DK trong điều trị nhồi máu não trên thực nghiệm

Nghiên cứu đã xác định flavonoid tiềm năng nhất đóng vai trò quan trọng đối với tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của DK là chất (9) kaempferol-3-O-(2''-O-galloyl-β-D-glucopyranosid). Chất (9) liều 10 và 20 mg/kg thể hiện tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh thông qua cơ chế chống oxy hóa và duy trì tính toàn vẹn của hàng rào máu não. Đây là khám phá mới và quan trọng của trong luận án này. Kết quả của nghiên cứu là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của chất (9). Hơn nữa, chất (9) có thể được xác định là biomarker trong cao định chuẩn lá hồng nhằm mục đích tiêu chuẩn hoá cao dược liệu.



Hình 4.2. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của chất (9)

4.2. Ý nghĩa của luận án

Trong luận án này, lần đầu tiên lá hồng, một dược liệu sẵn có, đã được trồng rộng rãi tại Việt Nam, được tiếp cận theo hướng dược lý thực nghiệm một cách có hệ thống và toàn diện, từ đó thu được nhiều kết quả ý nghĩa đóng góp cho khoa học cũng như có tính ứng dụng cao trong thực tiễn.

Các kết quả trong luận án đã chỉ ra những bằng chứng khoa học về tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của lá hồng và flavonoid tiềm năng. Đây là phát hiện rất có giá trị về tiềm năng lớn của lá hồng trong điều trị lâm sàng khi thuốc điều trị nhồi máu não còn rất hạn chế. Đồng thời, bằng chứng khoa học về thành phần hợp chất đóng vai trò quan trọng trong tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của lá hồng trong nghiên cứu này đã tạo cơ sở tin cậy cho công tác tiêu chuẩn hoá lá hồng. Hơn nữa, đây là lần đầu tiên tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của chất (9) được đề cập đến trên thế giới. Bên cạnh đó, luận án cung cấp phương pháp tiếp cận khoa học tương đối đầy đủ và chặt chẽ, áp dụng vào nghiên cứu dược lý thực nghiệm một dược liệu theo hướng dự phòng và điều trị nhồi máu não.

KẾT LUẬN

1. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của DK và flavonoid tiềm năng trên mô hình nhồi máu não thực nghiệm

DK liều 50 và 100 mg/kg có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh theo hướng dự phòng và điều trị nhồi máu não trên mô hình chuột nhắt trắng gây MCAO/tái tưới máu thông qua việc làm giảm thể tích nhồi máu não, cải thiện cân nặng chuột, chức năng thần kinh và trí nhớ của chuột. Tác dụng bảo vệ thần kinh của DK thông qua cơ chế chống oxy hoá, chống chết tế bào theo chương trình và duy trì tính toàn vẹn của hàng rào máu não qua con đường truyền tín hiệu VEGF/Akt.

- Chất (9) (kaempferol-3-O-(2"-O-galloyl-β-D-glucopyranosid)) là chất có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh tiềm năng nhất trong 9 flavonoid phân lập từ DK. Chất (9) liều 1 - 25 μM có tác dụng bảo vệ thần kinh trên mô hình gây thiếu oxy và glucose não trên lát cắt hồi hải mã nuôi cấy.

- Chất (9) liều 10 và 20 mg/kg thể hiện tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh trong điều trị nhồi máu não trên mô hình chuột nhắt trắng gây MCAO/tái tưới máu thông qua việc làm giảm thể tích nhồi máu não, cải thiện cân nặng chuột, chức năng thần kinh và vận động của chuột. Tác dụng bảo vệ thần kinh của chất (9) thông qua cơ chế chống oxy hóa và duy trì tính toàn vẹn của hàng rào máu não.

2. Tác dụng của DK lên một số yếu tố nguy cơ liên quan đến nhồi máu não trên thực nghiệm

- DK liều 100 mg/kg có tác dụng hạ huyết áp tâm thu, huyết áp tâm trương trên chuột cống gây tăng huyết áp bằng cortison acetat và NaCl mà không ảnh hưởng đến nhịp tim. Ngoài ra, DK còn làm giảm cân nặng tim và độ dày tâm thất trái. Tác dụng hạ huyết áp của DK thông

qua cơ chế ức chế enzyme chuyển angiotensin với nồng độ IC₅₀ là 4,71±0,53 μm/ml.

- DK liều 100 mg/kg có tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu trên mô hình chuột nhắt trắng gây rối loạn lipid máu bằng tyloxapol thông qua việc làm giảm triglycerid, LDL-C, non-HDL-C và làm tăng HDL-C trong máu chuột so với lô bệnh lý.

- DK liều 50 và 100 mg/kg có tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu trên mô hình chuột cống trắng gây rối loạn lipid máu bằng chế độ ăn giàu cholesterol thông qua việc làm giảm nồng độ cholesterol toàn phần, triglycerid, non-HDL-C và LDL-C. Ngoài ra, DK liều 50 và 100 mg/kg làm giảm hoạt độ AST và ALT của trong máu chuột so với lô bệnh lý.

KIẾN NGHỊ

- Tiến hành đánh giá sâu hơn về cơ chế tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của chất (9) trên mô hình MCAO/tái tưới máu.

- Bổ sung chất (9) vào tiêu chuẩn dược liệu lá hồng.

- Tiến hành thử nghiệm lâm sàng để đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của DK

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kuriakose D, Xiao Z (2020), Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives, *International journal of molecular sciences*, 21, 7609.
2. Xie C, Xie Z, Xu X et al (2015), Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves: a review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties, *Journal of ethnopharmacology*, 163, 229-240.
3. Bei W, Zang L, Guo J et al (2009), Neuroprotective effects of a standardized flavonoid extract from *Diospyros kaki* leaves, *Journal of ethnopharmacology*, 126, 134-142.
4. Bộ Y Tế (2020), *Hướng dẫn chẩn đoán và xử trí đột quỵ não*. Quyết định số 5331/QĐ-BYT ngày 23/12/2020.
5. Liu N, Shang J, Tian F (2011), *In vivo* optical imaging for evaluating the efficacy of edaravone after transient cerebral ischemia in mice, *Brain Research*, 1397, 66-75.
6. Cui HS, Matsumoto K, Murakami Y et al (2009), Berberine exerts neuroprotective actions against *in vitro* ischemia-induced neuronal cell damage in organotypic hippocampal slice cultures: involvement of B-cell lymphoma 2 phosphorylation suppression, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 79-85
7. Singh AA, Kharwar A, Dandekar MP (2022), A review on preclinical models of ischemic stroke: Insights into the pathomechanisms and new treatment strategies, *Current Neuropharmacol*, 20, 1667-1686.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN “NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG DƯỢC LÝ THEO HƯỚNG DỰ PHÒNG VÀ ĐIỀU TRỊ NHỒI MÁU NÃO CỦA LÁ HỒNG (*DIOSPYROS KAKI* L.F.) TRÊN THỰC NGHIỆM”

1. **Nguyen Thi Thanh Loan**, Pham Thi Van Anh, Le Thi Xoan (2022). Standardized flavonoid extract from *Diospyros Kaki* L.f leaves improves dyslipidemia in high-cholesterol diet fed rats. *Journal of Medicinal Materials*, 27(2), 112-116.
2. **Loan Thanh Thi Nguyen**, Xoan Thi Le, Hang Nguyet Thi Pham, Tai Van Nguyen, Phuong Thi Nguyen, Anh Van Thi Pham, Thu Bich Thi Nguyen, Kinzo Matsumoto (2023). Therapeutic effects of a standardized-flavonoid *Diospyros kaki* L.f. leaf extract on transient focal cerebral ischemia-induced brain injury in mice. *Journal of Natural Medicines*, 77, 544-560.
3. **Thi Thanh Loan Nguyen**, Thi Anh Van Pham, Thi Xoan Le (2023). Standardized flavonoid extract from *Diospyros kaki* L.f leaves alleviates high blood pressure and ventricular hypertrophy on cortisone acetate-induced hypertensive rats. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 65(3), 80-84.