

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG MÔ HÌNH THỰC NGHIỆM GÂY TĂNG HUYẾT ÁP TRÊN CHUỘT CỔNG TRẮNG

SV. TRẦN THỊ NGỌC MAI
 SV. NGUYỄN VĂN DIỆU, ThS. ĐỖ THỊ HƯƠNG LAN
 PGS.TS. NGUYỄN HOÀNG NGÂN - Học viện Quân y
 TS. HOÀNG THỊ TUYẾT NHUNG
 SV. NGUYỄN PHƯƠNG THẢO - Đại học Dược Hà Nội
 BSCKII. NGUYỄN HOÀNG LONG
 BSCKII. HOÀNG MẠNH VŨNG - Bệnh viện TƯQĐ108

TÓM TẮT: Nghiên cứu tiền cứu, thực nghiệm nhằm xây dựng mô hình gây tăng huyết áp bằng N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester trên chuột cống trắng (theo cơ chế giảm Nitric oxide). **Kết quả:** Xây dựng thành công mô hình gây tăng huyết áp chuột cống trắng bằng uống N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester (0,5% w/v), liều 50 mg/kg/ngày. Chuột sau uống N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester 4 tuần liên tục có biểu hiện tăng cả huyết áp tâm thu, huyết áp tâm trương và huyết áp trung bình; N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester làm giảm Nitric oxide và tăng stress oxy hóa trong máu chuột (tăng MDA, giảm SOD và GSH), nhưng không làm ảnh hưởng tới nhịp tim.

Từ khóa: Tăng huyết áp, N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME), mô hình.

ABSTRACT: A prospective, experimental study aimed at building a model of inducing hypertension by N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester in Wistar rats (by the mechanism of reducing Nitric oxide). **Results:** The hypertension model in Wistar rats by N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester (0.5% w/v) orally administrated at dose of 50 mg/kg/day has been successfully deployed. Rats after taking N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester for 4 consecutive weeks showed an increase in both systolic blood pressure, diastolic blood pressure and mean blood pressure; N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester reduced Nitric oxide and increased oxidative stress in the blood of rats (increased MDA, decreased SOD and GSH), but did not affect heart rate.

Keywords: Hypertension, N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME), model.

Chịu trách nhiệm nội dung: PGS.TS. Nguyễn Hoàng Ngân, Email: nganvnu@gmail.com

Ngày nhận bài: 14/5/2022; mời phản biện khoa học: 5/2022; chấp nhận đăng: 22/9/2022.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Tăng huyết áp (HA) là bệnh lí tim mạch phổ biến trong cộng đồng. Số người mắc tăng HA không ngừng gia tăng ở hầu hết các quốc gia trên thế giới. Tăng HA cũng là yếu tố nguy cơ chính của nhiều bệnh lí nguy hiểm như suy tim, rung nhĩ, đột quỵ não, bệnh thận mạn tính... [1]. Người bệnh tăng HA cần phải sử dụng thuốc hằng ngày nhằm kiểm soát tốt HA, phòng ngừa các biến chứng của bệnh. Hiện có nhiều nhóm thuốc tác dụng tốt trong điều trị tăng HA, như ức chế men chuyển, lợi tiểu, chẹn kênh Ca²⁺, chẹn receptor AT1 của angiotensin II, giãn mạch trực tiếp... Tuy nhiên, sự kháng thuốc và các tác dụng không mong muốn khi dùng thuốc kéo dài làm giảm hiệu quả điều trị, thậm chí có thể gây ra các tai biến. Lựa chọn loại thuốc thích hợp cho từng người bệnh là điều rất quan trọng, góp phần quyết định sự thành công của việc điều trị tăng HA. Nhằm hỗ trợ kiểm soát HA trên bệnh nhân tăng HA trong thời gian dài mà vẫn bảo đảm an toàn, ít gây tác dụng không mong muốn thì việc tìm kiếm các thuốc mới rất cần được quan tâm nghiên cứu.

Nitric oxide (NO) là chất làm giãn mạch, có vai trò đặc biệt quan trọng đối với sức khỏe tim mạch và HA. Rối loạn chức năng nội mô đặc trưng bởi sự suy giảm sinh khả dụng của NO, là một yếu tố nguy cơ quan trọng đối với cả tăng HA và bệnh tim mạch [2]. Mô hình gây suy giảm NO làm tăng HA trên động vật thực nghiệm là cần thiết để nghiên cứu cơ chế bệnh sinh cũng như đánh giá, tìm kiếm các sản phẩm làm tăng sinh khả dụng của NO sử dụng trong điều trị tăng HA. Tại Việt Nam, hiện chưa có cơ sở nào xây dựng mô hình thực nghiệm gây tăng HA theo cơ chế làm suy giảm NO phục vụ các nghiên cứu.

Từ thực tế trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xây dựng mô hình gây tăng HA bằng N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) theo cơ chế giảm NO trên chuột cống trắng.

2. ĐỐI TƯỢNG, CHẤT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng, chất liệu nghiên cứu:

- Đối tượng nghiên cứu: 24 con chuột cống trắng chủng Wistar; chuột đực trưởng thành, khỏe mạnh,

trọng lượng mỗi con từ 180-200g. Chuột được nuôi dưỡng theo tiêu chuẩn động vật nghiên cứu, do Ban Chăn nuôi, Học viện Quân y cung cấp, nuôi dưỡng trong phòng nuôi động vật thí nghiệm ít nhất một tuần trước khi nghiên cứu.

- Chất liệu nghiên cứu:

+ Thiết bị nghiên cứu: hệ thống thu thập dữ liệu Powerlab và phần mềm đo, phân tích thông số sinh lí học Labchart Pro (hãng AD Instruments, Úc); buồng làm ấm và giữ chuột trong đo HA (hãng Ugo Basile, Italy); bộ phận ghi HA (bao áp lực, cấp nổi, bộ khuếch đại, hộp ghi...), ghi điện tim (điện cực, cấp nổi, bộ khuếch đại, hộp ghi...).

- Hóa chất: L-NAME, kit xét nghiệm SOD, MDA, Glutathione (hãng Sigma, Hoa Kỳ); kit Griess Reaction System (Promega, Madison, WI, USA).

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Thiết kế nghiên cứu: tiến cứu, thực nghiệm.

- Phương pháp gây tăng HA thực nghiệm trên chuột: xây dựng mô hình gây tăng HA bởi L-NAME theo phương pháp được mô tả bởi Bilanda và cộng sự (gây tăng HA chuột bằng cách cho uống L-NAME 0,5% w/v, liều 50 mg/kg/ngày trong 4 tuần liên tục [3]).

- Chuột nghiên cứu được chia ngẫu nhiên thành 2 lô, mỗi lô 12 con:

+ Lô chứng: không gây tăng HA + uống nước cất.

+ Lô tăng HA: gây tăng HA + uống nước cất.

- Phương pháp đo HA và nhịp tim chuột cả 2 lô bằng hệ thống đo HA đuôi chuột không xâm lấn:

+ Cho chuột làm quen với điều kiện ghi HA: 5 ngày trước khi ghi HA, chuột bị hạn chế vận động

trong buồng giữ từ 10-20 phút/ngày. Kiểm soát thân nhiệt chuột ở 28°C bằng tủ sưởi ấm trong 30 phút (phát hiện tốt hơn xung động mạch đuôi).

+ Ghi HA ở sát gốc đuôi chuột bằng kĩ thuật quấn đuôi (the tail - cuff technique) qua vòng vít và cảm biến vòng vít ở đuôi kết nối với bộ khuếch đại (ML 125 NIBP, AD Instruments, Úc). Để giảm thiểu sự thay đổi HA do căng thẳng gây ra, tất cả các phép đo được thực hiện bởi cùng 1 người, trong cùng 1 môi trường yên tĩnh, tại cùng 1 thời điểm trong ngày.

+ Đánh giá các chỉ số: HA tâm thu (HATTh), HA tâm trương (HATTr), HA trung bình (HATb), nhịp tim chuột; thời điểm đánh giá: trước dùng thuốc (T0) và sau dùng thuốc lần lượt 1 tuần (T1), 2 tuần (T2), 3 tuần (T3), 4 tuần (T4).

+ HATb của chuột theo công thức [4]:

$$HATb = HATTr + 0,4120 \times (HATTh - HATTr)$$

- Kết thúc thí nghiệm, lấy máu buồng tim chuột vào ống chống đông, li tâm lấy huyết tương, xét nghiệm các chỉ số NO, Superoxide Dismutase (SOD), Malondialdehyde (MDA), Glutathion (GSH). NO được đo bằng phản ứng Griess, sử dụng Griess Reaction System kit (Promega, Madison, WI, USA) [5]. SOD, GSH và MDA được đánh giá bằng phương pháp ELISA, sử dụng kit xét nghiệm của Sigma - Hoa Kỳ.

- Xử lí số liệu theo các phương pháp thống kê y sinh học; so sánh bằng Anova test, post - hoc Tukey test, sử dụng phần mềm SPSS 16.0. Khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.

3.1. Kết quả giá trị HA đuôi chuột:

Bảng 1. Sự biến đổi HA của chuột trong các lô theo thời gian nghiên cứu.

Giá trị so sánh		Thời điểm đo HA đuôi chuột thực nghiệm					P _a
		T0 ^(a)	T1 ^(b)	T2 ^(c)	T3 ^(d)	T4 ^(e)	
HATTh (mmHg)	Lô chứng ⁽¹⁾	121,26 ± 16,67	122,01 ± 32,43	122,64 ± 24,48	123,01 ± 24,23	122,22 ± 25,36	> 0,05
	Lô tăng HA ⁽²⁾	121,31 ± 14,57	139,57 ± 24,05	146,21 ± 25,35	155,13 ± 21,85	163,18 ± 28,08	p _{c-a} < 0,05 p _{d,e-a} < 0,01
	p ₂₋₁	> 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,01	< 0,01	-
HATTr (mmHg)	Lô chứng ⁽¹⁾	100,97 ± 13,99	101,67 ± 27,02	102,20 ± 20,40	102,51 ± 20,19	101,85 ± 21,13	> 0,05
	Lô tăng HA ⁽²⁾	101,09 ± 12,14	116,31 ± 20,03	121,84 ± 21,12	129,28 ± 18,21	135,99 ± 23,41	p _{c-a} < 0,05 p _{d,e-a} < 0,01
	p ₂₋₁	> 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,01	< 0,01	-
HATb (mmHg)	Lô chứng ⁽¹⁾	109,33 ± 15,10	110,05 ± 29,25	110,62 ± 22,08	110,96 ± 21,89	110,24 ± 22,87	> 0,05
	Lô tăng HA ⁽²⁾	109,42 ± 13,14	125,89 ± 21,69	131,88 ± 22,86	139,93 ± 19,71	147,19 ± 25,34	p _{c-a} < 0,05 p _{d,e-a} < 0,01
	p ₂₋₁	> 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,01	< 0,01	-

- Chuột lô chứng: HATTh, HATTr và HATb khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa các thời điểm T1, T2, T3, T4 so với thời điểm ban đầu (T0).

- Chuột lô tăng HA: HATTh, HATTr và HATb thời điểm T1 so với thời điểm ban đầu (T0) cũng như so với các giá trị này của chuột lô chứng cùng thời điểm thấy khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, tại các thời điểm T2, T3, T4 so với thời điểm T0, giá trị HATTh, HATTr và HATb của chuột lô tăng HA bắt đầu khác biệt rõ rệt (tăng có ý nghĩa với $p < 0,05$ và $p < 0,01$).

Bảng 2. Kết quả đánh giá nhịp tim của chuột trong mô hình nghiên cứu.

Lô chuột	Nhịp tim của chuột (nhịp/phút)					P _a
	T0 ^(a)	T1 ^(b)	T2 ^(c)	T3 ^(d)	T4 ^(e)	
Lô chứng ⁽¹⁾	431,45 ± 26,36	430,26 ± 30,85	428,92 ± 32,54	430,12 ± 33,36	431,22 ± 3,16	> 0,05
Lô THA ⁽²⁾	429,96 ± 35,18	427,92 ± 32,16	426,68 ± 34,37	425,85 ± 35,18	424,94 ± 33,61	> 0,05
p ₂₋₁	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	-

So sánh các lô chuột với nhau trong cùng một thời điểm, cũng như so sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, thấy nhịp tim chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, L-NAME không ảnh hưởng đến nhịp tim chuột.

3.2. Đánh giá nồng độ NO và các chỉ số oxy hóa (SOD, GSH, MDA) trong huyết tương chuột:

Bảng 3. Nồng độ NO, SOD, GSH, MDA trong huyết tương chuột tại thời điểm T4.

Lô chuột	Nồng độ NO (µM/ml)	SOD (U/ml)	GSH (µmol/ml)	MDA (nmol/ml)
Lô chứng ⁽¹⁾	20,81 ± 3,27	119,66 ± 29,86	82,69 ± 19,21	5,24 ± 0,92
Lô THA ⁽²⁾	15,83 ± 3,22	60,27 ± 13,17	39,13 ± 7,24	11,09 ± 2,35
p ₂₋₁	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Sau 4 tuần cho chuột uống L-NAME, nồng độ NO, SOD, GSH trong huyết tương chuột lô tăng HA đều giảm có ý nghĩa so với lô chứng; riêng nồng độ MDA trong huyết tương chuột lô tăng HA tăng so với lô chứng, khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

4. BÀN LUẬN.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chuột uống L-NAME làm tăng cả HATTh, HATTr và HATb. Sau 2 tuần cho chuột uống L-NAME, HA của chuột bắt đầu tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) và mức tăng rõ rệt (với $p < 0,01$) sau cho chuột uống L-NAME 3 tuần và 4 tuần. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác trên thế giới [3, 6].

Ở người, tăng HA được xác định khi HATTh ≥ 140 mmHg và/hoặc HATTr ≥ 90 mmHg. Như vậy, so với mức HA bình thường ở người (110/70 mmHg), tăng HA được xác định khi HATTh tăng hơn hoặc bằng 30 mmHg, HATTr tăng hơn hoặc bằng 20 mmHg. Goldblatt xác định chuột tăng HA khi HATTh > 140 mmHg. Trong nghiên cứu của Goldblatt, HATTh của chuột bình thường có giá trị quanh 110 mmHg [7]. Như vậy, Goldblatt xác định chuột tăng HA khi HATTh tăng hơn 30 mmHg so với bình thường. Với sự tương đồng về phương pháp đo HA cánh tay ở

người và phương pháp đo HA đuôi chuột, cùng với các trị số HA bình thường đo được ở chuột không khác biệt nhiều so với ở người, tiêu chuẩn để xác định tăng HA trên chuột có thể được suy ra từ tiêu chuẩn ở người. Trong nghiên cứu này, sau 3 tuần và 4 tuần cho chuột uống L-NAME, thấy HATTh chuột tăng lần lượt là 33,82 mmHg và 41,87 mmHg; HATTr chuột tăng lần lượt là 28,19 mmHg và 34,90 mmHg. Với mức tăng này của HA (áp dụng từ tiêu chuẩn ở người sang chuột), có thể nói chuột uống L-NAME đã bị tăng HA.

Như vậy, mô hình thực nghiệm gây tăng HA ở chuột bằng L-NAME của chúng tôi được xác định là đã thành công, căn cứ vào 3 tiêu chí: (1) Kết quả nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác trên thế giới; (2) HA ở chuột lô uống L-NAME sau 3 tuần và 4 tuần tăng cao có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) so với trước uống L-NAME cũng như so với lô chứng; (3) HATTh chuột tăng hơn 30 mmHg, HATTr chuột tăng hơn 20 mmHg trong mô hình thực nghiệm uống L-NAME.

L-NAME là chất gây rối loạn con đường tổng hợp oxit nitric nội mô (eNOS), làm giảm sinh tổng hợp NO, dẫn đến co mạch (gây tăng HA). Cùng với đó, sự co mạch làm hình thành các loại oxy phản ứng (reactive oxygen species - ROS), tạo nên stress oxy

hóa và gây tổn thương gan, thận, mạch máu... Các rối loạn này có thể diễn biến phức tạp, tạo thành vòng xoắn bệnh lí. Do vậy, ngoài chỉ số về HA, các chỉ số quan trọng của mô hình cũng cần được đánh giá, bao gồm nhịp tim, nồng độ NO và các chỉ số oxy hóa trong máu. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấy L-NAME không làm thay đổi nhịp tim chuột ($p > 0,05$), làm giảm nồng độ NO trong máu chuột ($p < 0,01$), tăng stress oxy hóa thông qua tăng MDA và giảm các enzym chống oxy hóa SOD, GSH. Kết quả nghiên cứu này cũng hoàn toàn tương đồng với kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác trên thế giới [3, 6]. Điều này chỉ ra tính ổn định và sự thành công của mô hình chúng tôi xây dựng.

5. KẾT LUẬN.

Nghiên cứu xây dựng thành công mô hình tăng HA chuột cống bằng L-NAME. Chuột uống L-NAME (0,5% w/v), liều 50 mg/kg/ngày trong 4 tuần liên tục làm tăng cả HATth, HATtr và HAtb. L-NAME làm giảm NO và tăng stress oxy hóa trong máu chuột (tăng MDA, giảm SOD và GSH), nhưng không làm ảnh hưởng tới nhịp tim chuột.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. WHO (2021), *Cardiovascular diseases (CVDs)*.
2. Hermann M, et al (2006), "Nitric oxide in hypertension", *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)*, 8 (12 Suppl 4), 17-29.
3. Bilanda D.C, et al (2017), "Bidens pilosa Ethylene acetate extract can protect against L-NAME-induced hypertension on rats", *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17 (1): 479.
4. Papaioannou T, et al (2016), "Mean arterial pressure values calculated using seven different methods and their associations with target organ deterioration in a single-center study of 1878 individuals", *Hypertens Res*, 39, 640-647.
5. Bryan N.S, Grisham M.B (2007), "Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples", *Free Radic Biol Med*, 43 (5), pp. 645-57.
6. Mali V.R, Mohan V., Bodhankar S.L (2012), "Antihypertensive and cardioprotective effects of the Lagenaria siceraria fruit in NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) induced hypertensive rats", *Pharmaceutical biology*, 50 (11), 1428-1435.
7. Goldblatt H, Lynch J, Hangal R.F, Summerville W.W (1934), "Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia", *Journal of Experimental Medicine*, 59, pp.347-379. □

NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ DUNG DỊCH M11 THAY THẾ DUNG DỊCH HW...

(Tiếp theo trang 46)

4. KẾT LUẬN.

- Nghiên cứu xây dựng thành công công thức và quy trình bào chế dung dịch M11 thay thế cho dung dịch HW trong túi lọc nước biển S.P. Công thức cơ bản gồm: glucose, fructose, natribenzoat, natridihydrophosphat, natrikaltartrat, kalisorbat, acid malic, acid tartric, acid citric.

- Đánh giá khả năng lọc của dung dịch M11 ở phòng thí nghiệm với nước muối pha chế (nồng độ NaCl 3,5%) và các mẫu nước biển thuộc vùng biển Đà Nẵng, Côn Đảo, Hải Phòng (nồng độ NaCl từ 2,9895-3,5285%) thấy tương đương với khả năng lọc của dung dịch HW cả về thể tích nước lọc ra và nồng độ NaCl trong nước lọc ra. Đồng thời, nồng độ NaCl trong nước lọc ra giảm mạnh đạt tiêu chí có thể uống được.

- Về khả năng tái sử dụng túi lọc nước biển S.P: khả năng sử dụng trong 10 lần lọc nước biển với dung dịch HW và với dung dịch M11 đều tương đương nhau cả về thể tích nước lọc ra và nồng độ NaCl trong nước lọc ra. Nước lọc ra từ nguồn nước biển của túi S.P khi sử dụng với dung dịch HW và với dung dịch M11 đều đáp ứng được yêu cầu về thể tích và nồng độ NaCl có thể uống được sau cả 10 lần sử dụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Bộ Y tế, *Dược Điển Việt Nam V*.
2. Bộ Y tế (2010), *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phụ gia thực phẩm và chất bảo quản QCVN 4-12:2010/BYT*.
3. Bộ Y tế (2019), *Quy định về quản lí và sử dụng phụ gia thực phẩm*, Quyết định đi kèm Thông tư số 24/2019/TT-BYT ngày 30/8/2019.
4. Bộ Y tế (2010), *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phụ gia thực phẩm - chất điều chỉnh độ acid QCVN 4-11:2010/BYT*.
5. Nicoll P, Thompson N, Gray V (2012), "Forward Osmosis Applied to Evaporative Cooling Make-up Water", *Cooling Technology Institute*, Houston, USA, February.
6. Peter G (2013), "Nicoll Technical Director - Modern Water plc - United Kingdom", in: *Forward osmosis - a brief introduction*, The International Desalination Association World Congress on Desalination and Water Reuse 2013/Tianjin, (China REF: IDAWC/TIAN13-445).
7. Nicoll P (2013), *Forward osmosis as a pre-treatment to reverse osmosis*, Proceedings IDA World Congress, Tianjin, China, October. □