

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



Nguyễn Thu Hiền

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CẢI THIỆN SUY
GIẢM TRÍ NHỚ VÀ CHỐNG TRẦM CẢM
CỦA HƯƠNG NHU TÍA (*Ocimum sanctum* L.)
TRÊN THỰC NGHIỆM**

Chuyên ngành: Dược lý – Dược lâm sàng

Mã số: 9720205

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Hà Nội, năm 2022

Công trình hoàn thành tại:

- Viện Dược liệu
- Khoa Dược lý, Viện thuốc từ hợp chất thiên nhiên, Đại học Toyama, Nhật Bản.

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TSKH. Nguyễn Minh Khởi
2. TS. Lê Thị Xoan

Phản biện 1: PGS. TS. Phạm Thị Vân Anh

Phản biện 2: PGS. TS. Nguyễn Thị Thu Hương

Phản biện 3: PGS. TS. Cấn Văn Mão

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

Vào hồi 14 giờ 00, ngày 27 tháng 10 năm 2022

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

Các chứng bệnh rối loạn thần kinh, tâm thần như sa sút trí tuệ, suy giảm trí nhớ và trầm cảm là một trong những mối lo ngại lớn nhất về sức khỏe toàn cầu của thế kỷ 21. Hội chứng sa sút trí tuệ và trầm cảm đã được chứng minh có mối quan hệ mật thiết và thường hay đi kèm với nhau. Các thuốc điều trị chứng mất trí nhớ và trầm cảm hiện nay thường gây ra nhiều tác dụng không mong muốn và chi phí điều trị cao. Vì vậy, việc nghiên cứu các dược liệu có tác dụng cải thiện tình trạng suy giảm trí nhớ, chống trầm cảm được rất nhiều nhà khoa học trong nước và trên thế giới quan tâm.

Hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.) đã được sử dụng từ hàng nghìn năm nay trong y học cổ truyền Ấn Độ và các nước Đông Nam Á với tác dụng giúp cơ thể cân bằng và thích nghi với stress, có thể dễ dàng thu hái ở Việt Nam. Trên thế giới và trong nước đã có một số công bố khoa học về tác dụng cải thiện trí nhớ, chống trầm cảm và giải lo âu của hương nhu tía. Tuy nhiên số lượng các nghiên cứu còn ít và chủ yếu thực hiện trên các cao chiết toàn phần. Đặc biệt, hiểu biết về cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ, chống trầm cảm của cao chiết hương nhu tía và thành phần hoạt chất của nó vẫn còn rất hạn chế.

Xuất phát từ thực tế đó, luận án: “**Nghiên cứu tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ và chống trầm cảm của Hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.) trên thực nghiệm**” đã được tiến hành nhằm tìm hiểu tác dụng, cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ, chống trầm cảm của cao chiết hương nhu tía trên mô hình thực nghiệm, lựa chọn được liều dùng tối ưu, cũng như góp phần làm sáng tỏ phân đoạn cao chiết, thành phần hoạt chất có tác dụng. Thêm vào đó, nghiên cứu này cũng đóng góp vào việc phát triển các sản phẩm phòng và điều trị chứng suy giảm trí nhớ và trầm cảm từ cây hương nhu tía trồng tại Việt Nam, 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 và cơ chế tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ của hương nhu tía trên chuột bị loại bỏ thùy khứu giác (OBX).

Mục tiêu 2. Đánh giá tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía trên chuột bị loại bỏ thùy khứu giác (OBX) và chuột bị gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS).

3. Bố cục của Luận án

Luận án gồm 130 trang, bao gồm: Đặt vấn đề (02 trang); Chương 1. Tổng quan (34 trang); Chương 2. Nguyên liệu, phương tiện và phương pháp nghiên cứu (26 trang); Chương 3. Kết quả nghiên cứu (34 trang); Chương 4. Bàn luận (31 trang); Kết luận (02 trang) và Đề xuất (01 trang).

Luận án có 262 tài liệu tham khảo trong đó có 08 tài liệu tiếng Việt và 254 tài liệu tiếng Anh. Luận án có 06 bảng, 47 hình và 03 phụ lục kèm theo.

B. NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Sa sút trí tuệ - Suy giảm trí nhớ

Theo định nghĩa của Tổ chức Y tế thế giới (WHO): “Sa sút trí tuệ là một hội chứng - thường có tính chất mạn tính hoặc tiến triển - trong đó có sự suy giảm chức năng nhận thức vượt qua quá trình lão hóa bình thường”. Sa sút trí tuệ ảnh hưởng tới trí nhớ, tư duy, định hướng, hiểu biết, tính toán, năng lực học tập, ngôn ngữ và khả năng phán đoán nhưng không gây mất ý thức. Trong đó, suy giảm trí nhớ là triệu chứng quan trọng và thường xuất hiện sớm nhất trong sa sút trí tuệ [1].

Sa sút trí tuệ có nhiều nguyên nhân, trong đó, bệnh Alzheimer (bệnh lý thoái hóa thần kinh tiến triển) được coi là nguyên nhân phổ biến nhất (chiếm tỷ lệ 60 – 70%). Các giả thuyết về nguyên

nhân và cơ chế bệnh sinh của bệnh lý Alzheimer bao gồm: suy giảm hệ thống dẫn truyền thần kinh bằng acetylcholin (cholinergic) và những bất thường về các chất dẫn truyền thần kinh khác; sự lắng đọng mảng β -amyloid (A β) trong não; bất thường protein Tau và hình thành đám rối sợi thần kinh (NFTs); suy giảm yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF); suy giảm quá trình hình thành thần kinh mới; và 0,1% do sự di truyền của các gen đột biến [2, 3].

1.2. Bệnh trầm cảm

Theo Hiệp hội tâm thần Hoa Kỳ (DSM-5), rối loạn trầm cảm được định nghĩa là sự có mặt của giảm khí sắc và/hoặc giảm quan tâm/hứng thú với hầu hết các hoạt động thường ngày (anhedonia) kèm theo ít nhất 4 triệu chứng khác. Các triệu chứng kèm theo bao gồm: rối loạn giấc ngủ (mất ngủ hoặc ngủ li bì), rối loạn cảm giác ngon miệng hoặc thay đổi cân nặng (tăng hoặc giảm), mệt mỏi, kích thích hoặc suy giảm tâm thần vận động, cảm giác bất lực hoặc tội lỗi quá mức không rõ nguyên nhân, giảm khả năng tập trung hoặc thiếu quyết đoán, nghĩ nhiều về cái chết hoặc có ý định tự tử hoặc cố gắng thực hiện hành vi tự tử nhiều lần [4].

Nguyên nhân mắc bệnh trầm cảm là do những thay đổi trong mạng tín hiệu phức tạp. Các mạng này bao gồm các hệ dẫn truyền thần kinh monoaminergic, hệ nội tiết, các yếu tố thần kinh, phát sinh thần kinh, thay đổi hệ miễn dịch và biến đổi ngoại di truyền (do môi trường tác động), cũng như các yếu tố di truyền [5].

1.3. Mối liên quan giữa sa sút trí tuệ và trầm cảm

Trầm cảm là một rối loạn bệnh lý đi kèm phổ biến ở người lớn tuổi bị sa sút trí tuệ. Về biểu hiện lâm sàng, trầm cảm và sa sút trí tuệ tuy khác biệt nhưng vẫn có chung một số triệu chứng, chẳng hạn như suy giảm chức năng xã hội, thiếu chú ý và suy giảm trí nhớ làm việc. Mặt khác, trầm cảm làm tăng tốc độ suy giảm nhận thức và là một yếu tố nguy cơ độc lập của chứng sa sút trí tuệ [6].

Như vậy, một chiến lược để cải thiện quá trình suy giảm nhận thức là phương pháp điều trị tích hợp với các biện pháp chống trầm cảm. Hiện nay chưa có thuốc có tác dụng điều trị cả hai căn bệnh này. Điều này mở ra một hướng đi mới trong điều trị trên lâm sàng khi sử dụng những thuốc, dược liệu có cả hai tác dụng tiềm năng là cải thiện suy giảm trí nhớ và chống trầm cảm.

1.4. Mô hình dược lý

Mô hình loại bỏ thùy khứu giác (OBX) thuộc loại mô hình can thiệp bằng cách phẫu thuật, thường trên loài gặm nhấm. Việc phẫu thuật loại bỏ thùy khứu giác của chuột gây ra chứng mất khứu giác (anosmia), làm mất khả năng phát hiện pheromone (chất được tiết ra từ cơ thể như tín hiệu hóa học hấp dẫn các cá thể cùng loài) và đánh giá mức độ nguy hiểm. Điều này gây ảnh hưởng đến nhiều khía cạnh cuộc sống của động vật bao gồm hành vi sinh sản, sự thống trị xã hội giữa các con đực, hành vi không công nhận giới tính..., từ đó dẫn đến các triệu chứng của suy giảm trí nhớ và trầm cảm.

OBX có thể gây ra các đặc điểm đặc trưng cho sự phát triển của thoái hóa thần kinh loại Alzheimer như: suy giảm trí nhớ không gian, mất các tế bào thần kinh chính tổng hợp chất dẫn truyền thần kinh quan trọng và tăng mức độ A β của não, đôi khi các phần cấu trúc não như hồi hải mã, thùy thái dương ... cũng bị thoái hóa. Thuốc ức chế acetylcholinesterase (AChE) điều trị Alzheimer (tacrin, donepezil...) có hiệu quả trên động vật OBX. Bên cạnh đó, mô hình OBX cũng gây nhiều thay đổi hành vi liên quan đến trầm cảm, tăng nồng độ corticosteroid trong máu, có biểu hiện giảm tiêu thụ lượng dung dịch saccharose và saccharin hàng ngày, giảm hứng thú với các hoạt động ưa thích như giao phối, chạy trong mê cung tìm thức ăn và chạy bánh xe (hội chứng anhedonia). Những biểu hiện này liên quan đến rối loạn chức năng hệ monoaminergic [5, 7].

Mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS) trên chuột nhắt trắng là phát triển lâu dài trạng thái trầm cảm đáp ứng với các kích thích stress nhẹ khó lường khác nhau trong khoảng thời gian vài tuần; bao gồm giảm tiêu thụ saccharose (phát triển anhedonia), tăng biểu hiện hành vi tuyệt vọng, tăng ngưỡng tự kích thích nội sọ, giảm cân và giảm thèm ăn,... UCMS là mô hình có nhiều ưu điểm so với các mô hình trầm cảm trên động vật khác như: (1) gây trầm cảm mạn tính tương tự cơ chế bệnh sinh của trầm cảm ở người; (2) tái hiện được hội chứng anhedonia, đặc điểm trọng tâm của bệnh trầm cảm; (3) đánh giá được nhiều hành vi giống trầm cảm gồm hành vi tuyệt vọng, giảm hành vi xã hội, giảm hành vi chải lông...; (4) đáp ứng điều trị với các thuốc chống trầm cảm [5].

1.5. Hương nhu tía

Theo y học cổ truyền và một số nghiên cứu trong nước cũng như trên thế giới đã chỉ ra tác dụng sinh học của hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.) bao gồm: tác dụng bảo vệ thần kinh, cải thiện trí nhớ; tác dụng chống trầm cảm, giải lo âu và một số tác dụng khác như bảo vệ cơ thể, thải độc, chống oxy hóa; hạ đường huyết; tác dụng trên hệ tim mạch; chống ung thư, điều hòa miễn dịch; cải thiện rối loạn lipid máu, thừa cân béo phì.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU, PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

2.1.1. Dược liệu nghiên cứu

Dược liệu nghiên cứu là phần trên mặt đất của cây Hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.) được thu hái tại Hà Nội, Việt Nam vào tháng 6/2016 (mùa hoa quả) và được xác định tên khoa học bởi Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu. Mẫu dược liệu được sấy khô và đo

độ ẩm. Lưu mẫu tại Khoa Tài nguyên Dược liệu – Viện dược liệu (số tiêu bản: NIMM-16474B).

2.1.2. Mẫu nghiên cứu

Cao chiết còn toàn phần (OS); Cao chiết phân đoạn: n-hexan (OS-H), ethyl acetat (OS-E), n-butanol (OS-B); Chất tinh khiết: acid ursolic, acid oleanolic.

2.1.3. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino*, giống đực.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng thể

Nội dung nghiên cứu được trình bày ở sơ đồ nghiên cứu tổng thể như sau (*Hình 2.1.*).

2.2.2. Phương pháp chiết xuất dược liệu

- Cao chiết còn toàn phần (OS): bột dược liệu (phần trên mặt đất của hương nhu tía) chiết hồi lưu với ethanol 70% rồi cô trong chân không thành cao khô OS (độ ẩm 3-5%). Hiệu suất chiết 16,5% (kl/kl).

- Cao chiết phân đoạn: từ dịch chiết còn toàn phần, lắc phân đoạn với dung môi có độ phân cực tăng dần: n-hexan, ethyl acetat, H₂O, n-butanol và cất quay dưới áp suất giảm thành cao khô (độ ẩm 3-5%).

2.2.3. Gây mô hình dược lý

2.2.3.1. Mô hình chuột bị loại bỏ thùy khứu giác (OBX)

Mô hình OBX để nghiên cứu tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ và chống trầm cảm của hương nhu tía, được tiến hành như sau: gây mê bằng sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p). Hộp sọ của chuột được cố định bằng dụng cụ chuyên dụng. Tại phần sọ bao bên ngoài của thùy khứu giác, khoan một lỗ đường kính 1mm, dùng kim để phá hủy thùy khứu giác và hút bỏ toàn bộ phần mảnh não này. Cầm máu bằng bột gelatin. Sau khi hoàn thiện các thử nghiệm về hành vi, thu thập não chuột để kiểm tra các thương tổn trên vùng thùy khứu giác và loại bỏ số

liệu hành vi của những con chuột có thùy khứu giác bị lấy đi dưới 70% khi phân tích kết quả.

2.2.3.2. Mô hình chuột bị gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS)

Mô hình UCMS để nghiên cứu tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của cao phân đoạn hương nhu tía tiềm năng, được tiến hành như sau: chuột phải chịu các loại tác nhân gây stress nhẹ không dự đoán trước (bao gồm: gò bó chuột vào lọ nhỏ trong 3 giờ, nghiêng chuồng 45° trong 24 giờ, bình không có nước trong 24 giờ, ướm chuồng (200ml nước/50g trấu) trong 24 giờ, chiếu sáng liên tục 36 giờ, tiếng chuột cống kêu 3 giờ liên tục (phát băng ghi âm sẵn có), nhồi 2 chuồng với nhau trong 24 giờ). Hai trong số các yếu tố gây stress này được áp dụng hàng ngày vào thời điểm khác nhau, tuân theo lịch trình 1 tuần bán ngẫu nhiên. Cô lập chuột và bỏ thức ăn, nước uống trong 18 giờ (để chuẩn bị cho thử nghiệm tiêu thụ saccharose, thực hiện 1 lần/tuần). Quá trình UCMS kéo dài 6 tuần trước khi kiểm tra hành vi. Tác nhân gây stress tiếp tục áp dụng suốt giai đoạn thử nghiệm hành vi, trừ ngày thử nghiệm để tránh ảnh hưởng đến kết quả.

2.2.4. Các thử nghiệm hành vi

+ Đánh giá tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ: thử nghiệm nhận diện vật thể (trí nhớ làm việc không liên quan đến không gian); thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến (trí nhớ không gian ngắn hạn); thử nghiệm mê lộ nước Morris (trí nhớ không gian dài hạn).

+ Đánh giá tác dụng chống trầm cảm: thử nghiệm treo đuôi và thử nghiệm bơi cưỡng bức (hành vi tuyệt vọng); thử nghiệm tiêu thụ saccharose (hành vi giảm hứng thú anhedonia); thử nghiệm môi trường mở (vận động tự nhiên và hành vi giảm hứng thú anhedonia).

2.2.5. Nghiên cứu cơ chế tác dụng

2.2.5.1. Cơ chế cải thiện trí nhớ

+ Phương pháp nghiên cứu mô học: nhuộm tím cresyl tiêu bản

não để phân tích kích thước não thất bên; nhuộm hóa mô miễn dịch với chỉ dấu protein doublecortin (DCX) của tế bào thần kinh mới sinh và chỉ dấu cholin acetyltransferase (ChAT) của tế bào cholinergic.

+ Phương pháp nghiên cứu hóa thần kinh: dùng kỹ thuật Real time PCR để đánh giá mức độ biểu hiện gen của yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và thụ thể VEGF 2 (VEGFR2) trong hồi hải mã chuột; dùng kỹ thuật Western blotting để đánh giá biểu hiện protein của VEGF và ChAT trong hồi hải mã chuột; dùng phương pháp của Ellman để xác định hoạt độ acetylcholinesterase (AChE) trong vỏ não chuột *ex vivo* và đánh giá khả năng ức chế AChE *in vitro* của các cao chiết và các chất phân lập tiềm năng.

2.2.5.2. Cơ chế chống trầm cảm

+ Thử nghiệm dược lý sử dụng chất đối kháng: Để tìm hiểu xem cơ chế chống trầm cảm của cao chiết phân đoạn hương nhu tím tác dụng rõ nhất có liên quan đến hệ monoaminergic (noradrenergic, dopaminergic và serotonergic) hay không, vào tuần thứ 9 và tuần thứ 11 gây mô hình UCMS, các lô chuột được tiêm phúc mạc α -methyl- p -tyrosin (AMPT, 100 mg/kg, 1 lần duy nhất) hoặc DL- p -chlorophenyl alanin (PCPA, 80 mg/kg/ngày, 4 ngày liên tiếp) tương ứng, sau đó tiến hành thử nghiệm treo đuôi.

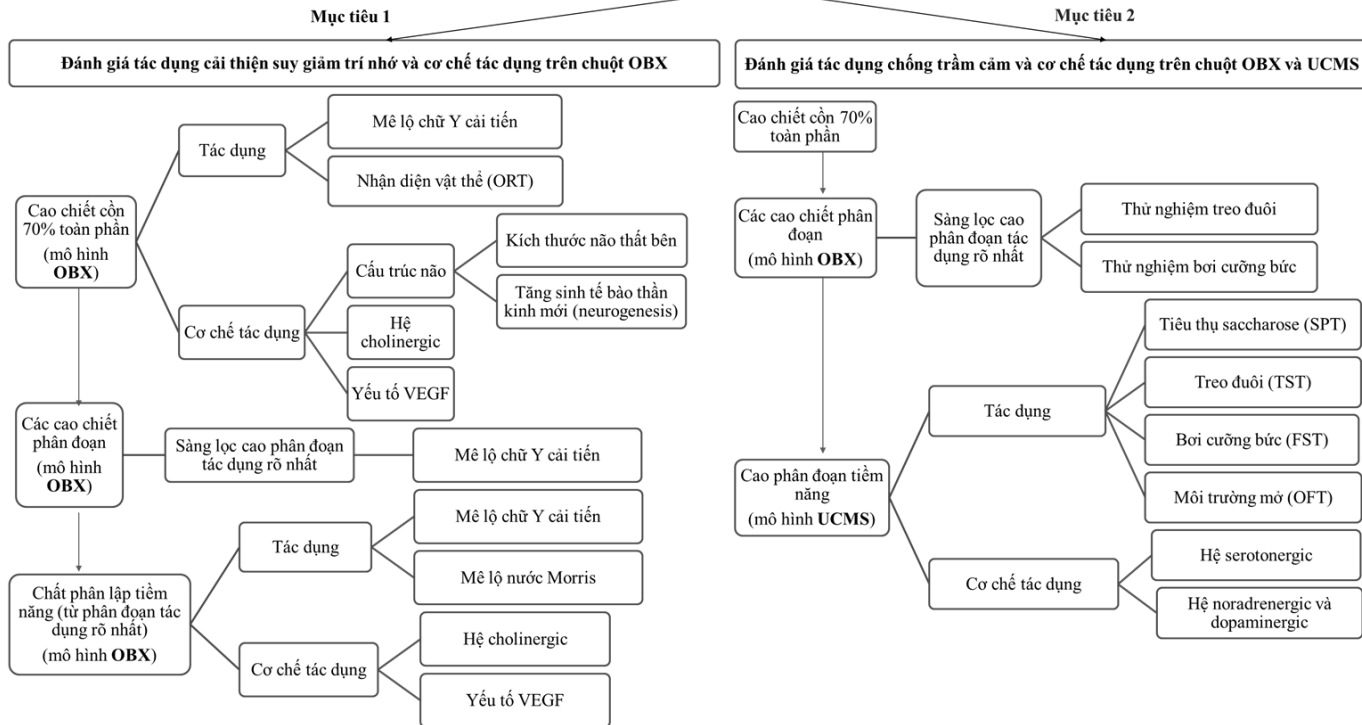
2.3. Đạo đức nghiên cứu trên động vật

Tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện theo Hướng dẫn Chăm sóc và sử dụng Động vật (NIH xuất bản số 85–23, sửa đổi năm 1985) và đã được phê duyệt bởi Ủy ban Chăm sóc và sử dụng động vật của Viện Dược liệu.

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.

Nghiên cứu tác dụng của Hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.) trên thực nghiệm



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng thể

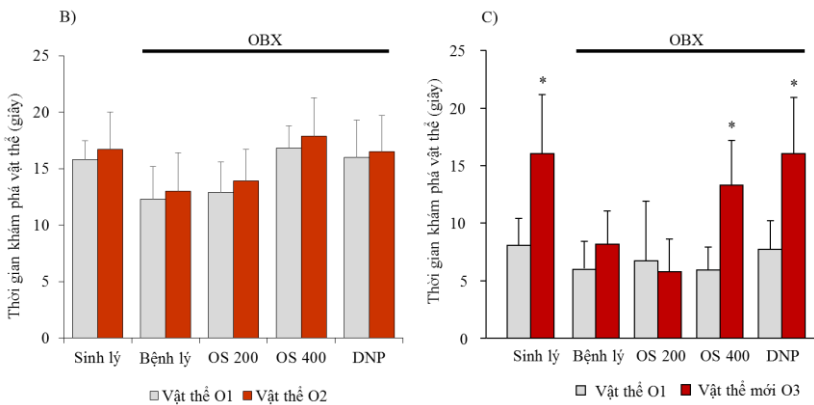
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của hương nhu tía

3.1.1. Tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của cao chiết cồn toàn phần hương nhu tía (OS) trên mô hình chuột nhắt loại bỏ thùy khứu giác OBX

3.1.1.1. Tác dụng của cao OS lên trí nhớ ngắn hạn của chuột OBX trong thử nghiệm hành vi

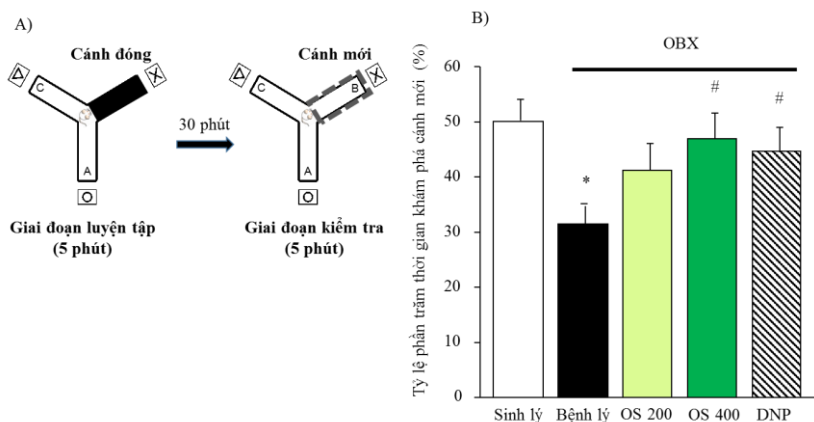
Trong thử nghiệm nhận diện vật thể (ORT), OS ở mức liều 400 mg/kg/ngày và DNP liều 1,5 mg/kg/ngày đã làm tăng rõ rệt thời gian khám phá vật thể mới O3 so với vật thể tương tự O1 (Hình 3.1).



Hình 3.1. Ảnh hưởng của lên trí nhớ nhận diện vật thể của chuột OBX trong thử nghiệm ORT

Trong thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến, OS ở liều 400 mg/kg/ngày và DNP liều 1,5 mg/kg/ngày đã làm tăng đáng kể thời gian khám phá cánh mới (Hình 3.2).

Kết quả này chứng tỏ rằng OS có tác dụng cải thiện sự suy giảm trí nhớ ngắn hạn liên quan và không liên quan đến không gian do OBX gây ra, tương tự chứng dương DNP liều 1,5 mg/kg/ngày.



Hình 3.2. Ảnh hưởng của lên trí nhớ không gian ngắn hạn của chuột OBX trong thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến

3.1.1.2. Ảnh hưởng của cao OS lên sự giãn não thất bên của chuột OBX

OBX gây ra tình trạng giãn rộng não thất bên và điều trị chuột OBX lâu dài bằng OS ở mức liều 400 mg/kg/ngày đã ngăn chặn đáng kể tình trạng giãn não thất bên này trong khi DNP ở liều 1,5 mg/kg/ngày không thể hiện rõ tác dụng này.

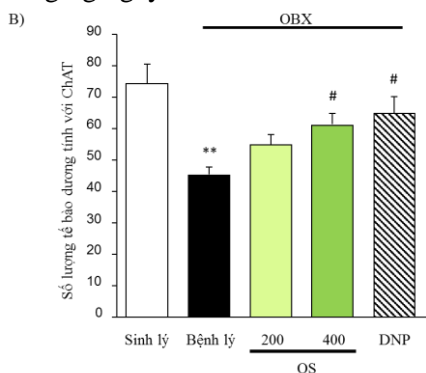
3.1.1.3. Ảnh hưởng của cao OS đến sự tăng sinh tế bào thần kinh mới vùng hồi hải mã trên chuột OBX

Ở chuột OBX có sự suy giảm rõ rệt quá trình hình thành tế bào thần kinh mới ở hồi hải mã. Điều trị chuột OBX lâu dài bằng OS ở mức liều 400 mg/kg/ngày đã ngăn chặn đáng kể sự suy giảm tăng sinh tế bào thần kinh mới này, tương tự với DNP ở liều 1,5 mg/kg/ngày.

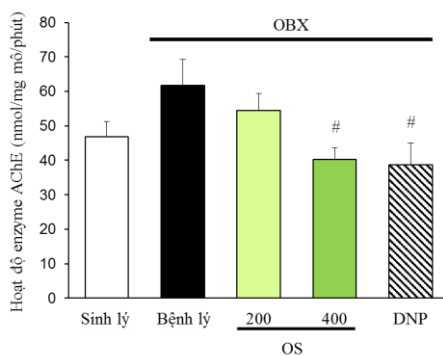
3.1.1.4. Ảnh hưởng của cao OS lên hoạt động của hệ cholinergic

Điều trị chuột OBX lâu dài bằng OS ở mức liều 400 mg/kg/ngày đã ngăn chặn sự suy giảm tế bào thần kinh cholinergic ChAT vùng vách giữa do OBX gây ra (Hình 3.5.) và làm giảm hoạt độ AChE ở vỏ

não chuột OBX *ex vivo* (Hình 3.6), tương tự với DNP ở liều 1,5 mg/kg/ngày.



Hình 3.5. Số lượng tế bào dương tính với ChAT ở vách giữa của các lô



Hình 3.6. Ảnh hưởng của cao OS đến hoạt độ AChE trong vỏ não chuột OBX *ex vivo*

3.1.1.5. Ảnh hưởng của cao OS lên tín hiệu VEGF vùng hồi hải mã

Có sự suy giảm đáng kể yếu tố VEGF trong hồi hải mã chuột OBX bao gồm sự suy giảm biểu hiện gen VEGF, VEGFR2 và biểu hiện protein VEGF. Cả OS (400 mg/kg/ngày) và DNP (1,5 mg/kg/ngày) đều cho thấy tác dụng cải thiện rõ rệt tình trạng suy giảm biểu hiện VEGF nhưng không có ảnh hưởng đáng kể đến biểu hiện gen VEGFR2.

3.1.2. Tác dụng của các cao chiết phân đoạn hương nhu tía lên trí nhớ không gian làm việc của chuột OBX trong thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến

Phân đoạn ethyl acetat của OS (OS-E) có tác dụng cải thiện trí nhớ không gian ngắn hạn rõ rệt nhất, ở cả mức liều 400 mg/kg và 200 mg/kg ở thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến trong khi hai phân đoạn còn lại n-hexan (OS-H) và n-butanol (OS-B) liều 400 mg/kg không thể hiện tác dụng này. Điều này chứng tỏ rằng OS-E giàu

các thành phần hoạt chất đóng vai trò quan trọng với tác dụng cải thiện trí nhớ của OS.

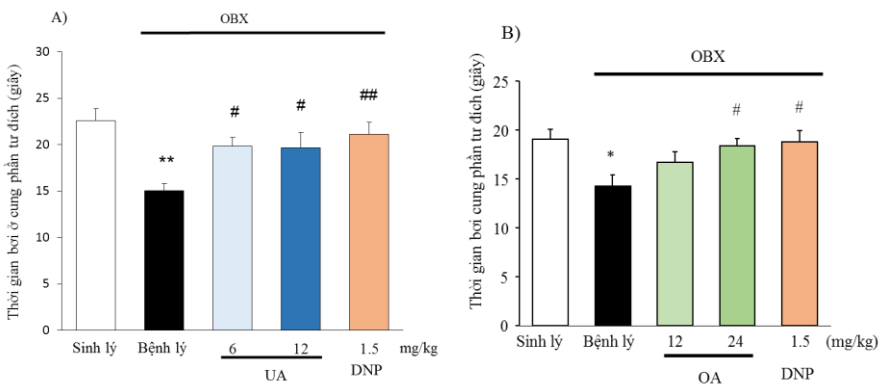
3.1.3. Tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của các chất phân lập tiềm năng (acid ursolic - UA và acid oleanolic - OA) trong hương nhu tía trên chuột OBX

3.1.3.1. Tác dụng cải thiện trí nhớ không gian ngắn hạn của acid ursolic và acid oleanolic trên thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến

UA liều 6 và 12 mg/kg/ngày, OA 24 mg/kg/ngày và DNP 1,5 mg/kg/ngày đều có tác dụng cải thiện trí nhớ làm việc liên quan đến không gian của chuột OBX. OA chưa thể hiện tác dụng này ở mức liều thấp (6 và 12 mg/kg).

3.1.3.2. Tác dụng cải thiện trí nhớ không gian dài hạn của UA và OA trong thử nghiệm mê lộ nước Morris (MWM)

Chuột OBX được điều trị bằng DNP và UA (6 và 12 mg/kg/ngày) và OA (24 mg/kg/ngày) có thông số tiềm thời và quãng đường bơi giảm rõ rệt qua các ngày luyện tập, đồng thời kéo dài thời gian bơi ở cung phần tư đích rõ rệt so với chuột OBX không được điều trị (Hình 3.15).



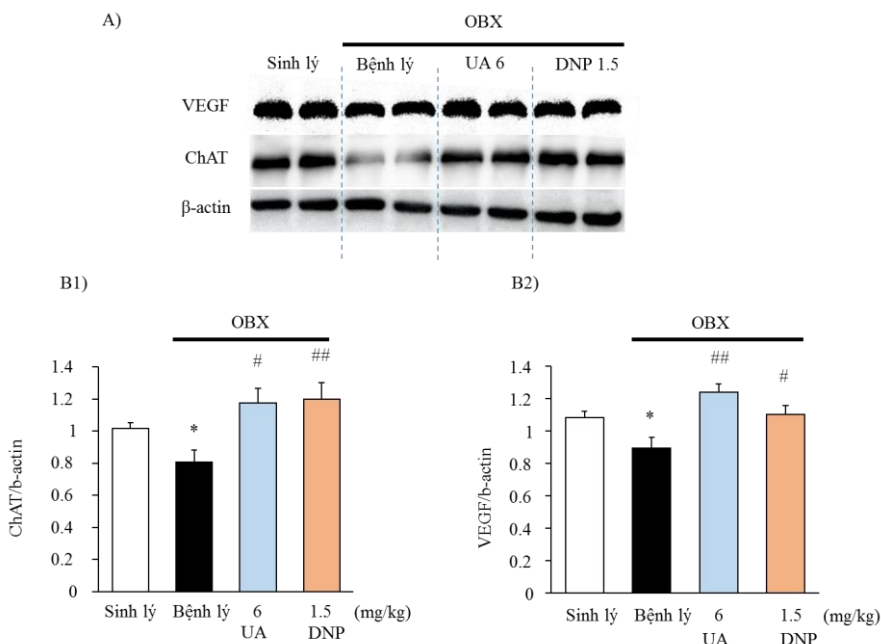
Hình 3.15. Ảnh hưởng của UA và OA đến thông số thời gian bơi ở cung phần tư đích của chuột OBX giai đoạn probe test trong MWM.

3.1.3.3. Ảnh hưởng của acid ursolic lên hoạt độ AChE ở vỏ não *ex vivo*

UA làm giảm đáng kể hoạt độ AChE trong vỏ não chuột OBX, ở cả 2 mức liều 6 và 12 mg/kg, hiệu quả tương tự với thuốc chống dương DNP.

3.1.3.4. Ảnh hưởng của acid ursolic lên biểu hiện protein ChAT và VEGF vùng hồi hải mã

Chuột OBX có sự suy giảm đáng kể biểu hiện của ChAT và VEGF trong hồi hải mã. UA 6 mg/kg/ngày và DNP 1,5 mg/kg/ngày đều cho thấy tác dụng cải thiện rõ rệt sự suy giảm biểu hiện của ChAT và VEGF (Hình 3.17.).



Hình 3.17. Ảnh hưởng của UA lên biểu hiện protein ChAT và VEGF trong hồi hải mã chuột dùng phương pháp Western blot.

3.1.4. Tác dụng ức chế acetylcholinesterase in vitro của cao chiết cỏn, phân đoạn ethyl acetat và một số chất phân lập được từ hương nhu tía

Trong số các cao chiết và các chất phân lập được từ OS, chỉ có UA có tác dụng ức chế AChE đáng kể với IC₅₀ là 106,51 μM (Bảng 3.1.).

Bảng 3.1. Tác dụng ức chế AChE in vitro của các cao chiết và các hợp chất được phân lập từ phân đoạn ethyl acetat

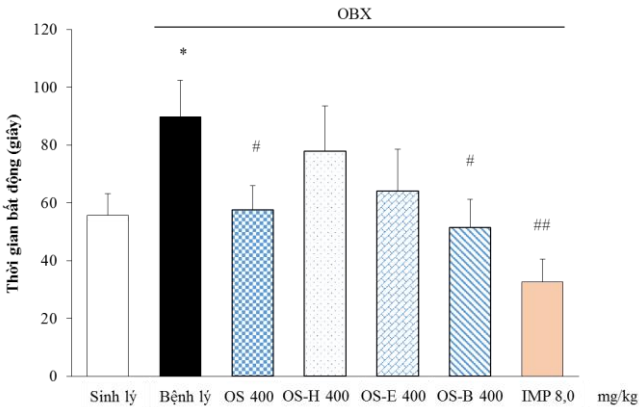
STT	Tên mẫu	IC ₅₀
1	Cao chiết OS	>200 μg/ml
2	Cao phân đoạn ethyl acetat	>200 μg/ml
3	Acid ursolic	106,51 μM
4	Acid oleanolic	>160 μM
5	Apigenin	>160 μM
6	Luteolin	>160 μM
7	Luteolin-7-O-glucuronid	>160 μM
8	Donepezil	8,23 nM

3.2. Tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía

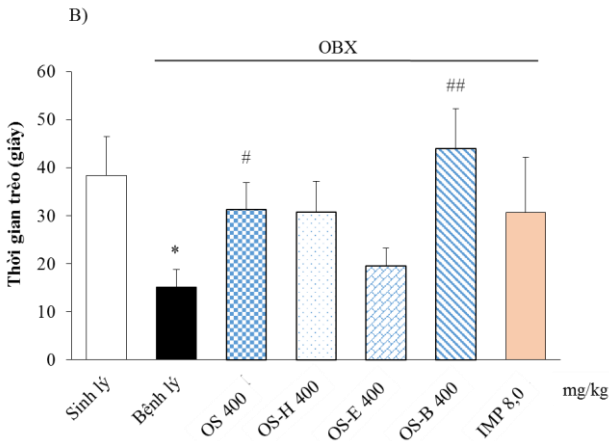
3.2.1. Tác dụng chống trầm cảm của cao chiết cỏn và các cao chiết phân đoạn hương nhu tía trên mô hình chuột OBX trong thử nghiệm treo đuôi (TST) và thử nghiệm bơi cưỡng bức (FST)

OS và cao phân đoạn n-butanol (OS-B) liều 400 mg/kg/ngày có tác dụng làm giảm thời gian bất động trong TST và tăng thời gian trèo trong FST, tương tự tác dụng của imipramin (IMP) liều 8 mg/kg. Chúng tỏ OS và OS-B có tác dụng chống trầm cảm trên chuột OBX, tương tự IMP. Hai cao phân đoạn n-hexan (OS-H) và cao phân đoạn

ethyl acetat (OS-E) ở mức liều tương tự không thể hiện tác dụng này (Hình 3.19 và Hình 3.20).



Hình 3.19. Ảnh hưởng của OS và các cao chiết phân đoạn lên thời gian bắt động của chuột OBX trong TST

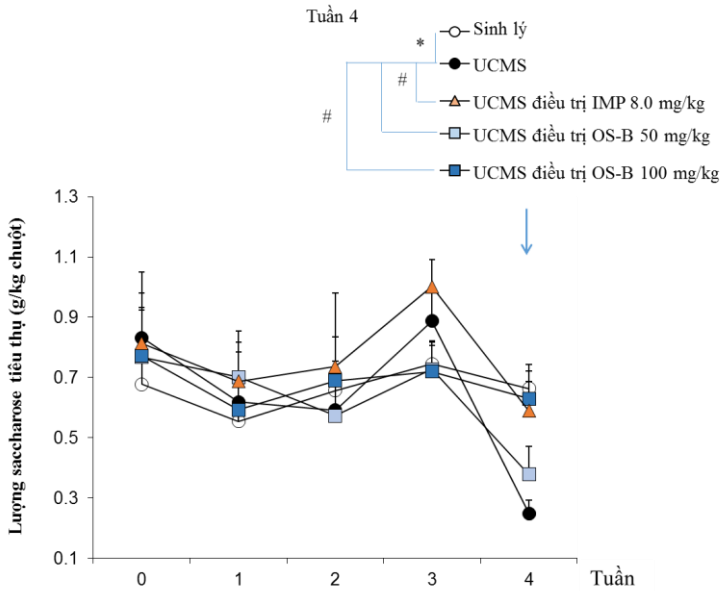


Hình 3.20. Ảnh hưởng của OS và các cao chiết phân đoạn lên biểu hiện trầm cảm của chuột OBX trong FST

3.2.2. Tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của cao chiết phân đoạn n-butanol (OS-B) trên mô hình chuột gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS)

3.2.2.1. Ảnh hưởng của OS-B lên triệu chứng giảm hứng thú (anhedonia) của chuột UCMS trên thử nghiệm tiêu thụ saccharose (SPT)

Chuột UCMS được điều trị bằng OS-B 100 mg/kg/ngày, đường uống, cũng như IMP 8,0 mg/kg/ngày, đường tiêm phúc mạc đã cải thiện đáng kể hội chứng giảm hứng thú (anhedonia), một biểu hiện của trầm cảm ở chuột UCMS (Hình 3.21).



Hình 3.21. Ảnh hưởng của OS-B lên triệu chứng giảm hứng thú của chuột UCMS trên SPT.

3.2.2.2. Ảnh hưởng của OS-B lên biểu hiện trầm cảm của chuột UCMS trong thử nghiệm TST và FST

OS-B 100 mg/kg/ngày có tác dụng cải thiện biểu hiện của trầm

cảm của chuột UCMS trong thử nghiệm TST và FST, tương tự như tác dụng của IMP 8,0 mg/kg/ngày.

3.2.2.3. Ảnh hưởng của OS-B đến vận động tự nhiên và hành vi chải lông của chuột UCMS trong thử nghiệm môi trường mở (OFT)

Các yếu tố stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước cũng như OS-B và IMP không làm ảnh hưởng đến vận động tự nhiên của chuột. OS-B ở các liều 50 và 100 mg/kg/ngày có tác dụng cải thiện sự suy giảm hành vi chải lông ở chuột UCMS, tương tự như tác dụng của IMP 8 mg/kg.

3.2.2.4. Cơ chế tác dụng chống trầm cảm của OS-B trên chuột UCMS thông qua hệ monoaminergic

+ *Thông qua hệ dẫn truyền thần kinh noradrenergic và dopaminergic*

α -methyl-p-tyrosin (AMPT, 100 mg/kg) là chất ức chế tyrosin hydroxylase dẫn đến giảm sinh tổng hợp catecholamin. AMPT đã làm mất tác dụng rút ngắn thời gian bắt động của OS-B và IMP đối với chuột UCMS, chứng tỏ tác dụng của OS-B và IMP có liên quan đến hệ dẫn truyền thần kinh noradrenergic và dopaminergic.

+ *Thông qua hệ dẫn truyền thần kinh serotonergic*

ρ -chlorophenylalanin (PCPA, 80 mg/kg) là chất ức chế chọn lọc tryptophan hydroxylase (TPH) dẫn đến giảm sinh tổng hợp serotonin (5-HT). PCPA đã làm mất tác dụng rút ngắn thời gian bắt động của OS-B và IMP trên chuột UCMS, chứng tỏ tác dụng của OS-B và IMP có liên quan đến hệ dẫn truyền thần kinh serotonergic.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Những 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 cả hai mô hình chuột nhất loại bỏ thùy khứu giác và mô hình gây stress

nhẹ trường diễn không dự đoán trước tại Việt Nam. Mặc dù hai mô hình này không phải là mô hình mới đối với thế giới, trong quá trình thực hiện, nghiên cứu đã tìm ra một số điểm mới có giá trị như sau:

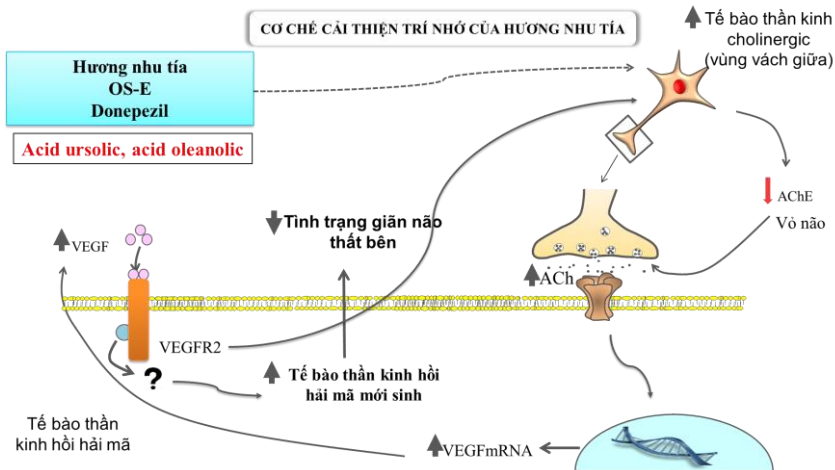
- Chứng minh được mô hình OBX đã đáp ứng cả 3 khía cạnh của một mô hình gây suy giảm trí nhớ, đồng thời cũng là mô hình gây trầm cảm, bao gồm: tương đồng về hành vi và sinh lý bệnh, có giá trị dự đoán và tương đồng về cấu tạo bệnh. Trong đó, nghiên cứu đã chỉ ra đặc điểm giãn não thất bên và suy giảm VEGF trong hồi hải mã của chuột OBX, bên cạnh sự suy giảm chức năng của hệ cholinergic, tương ứng với đặc điểm sinh lý bệnh của bệnh nhân Alzheimer trên lâm sàng.

- Chứng minh được mô hình UCMS cũng đáp ứng đầy đủ cả 3 khía cạnh của một mô hình gây trầm cảm hiệu quả, bao gồm: tương đồng về hành vi, có giá trị dự đoán và tương đồng về nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh. Trong đó, nghiên cứu đã căn cứ vào các phương pháp kinh điển trên thế giới, để khảo sát, điều chỉnh các điều kiện thí nghiệm nhằm đảm bảo sự thành công của mô hình trong thực tế như: các tác nhân gây stress, tần suất, mức độ gây stress, thời gian gây mô hình và kiểm soát tốt các yếu tố khác có liên quan. Hơn thế nữa, nghiên cứu đã đề xuất thêm công cụ hữu ích để đánh giá hành vi trong thử nghiệm FST là thời gian treo và trong thử nghiệm OFT là thời gian chải lông.

4.1.2. Tác dụng và cơ chế tác dụng của cao chiết cò non toàn phần hương nhu tía

Kết quả của luận án đã chứng minh rằng hương nhu tía là một ứng viên đầy hứa hẹn cho dự phòng và điều trị không chỉ chứng sa sút trí tuệ, suy giảm trí nhớ mà còn cả chứng rối loạn trầm cảm. Một số cơ chế tác dụng của cao chiết cò non hương nhu tía đã được đưa ra như:

- Với tác dụng cải thiện trí nhớ: tăng cường hệ cholinergic (ức chế AChE vùng vỏ não và tăng số lượng tế bào tạo ChAT vùng vách giữa), giảm tình trạng giãn não thất bên, tăng sinh tế bào thần kinh mới hồi hải mã và tăng cường biểu hiện gen và protein VEGF (*Hình 4.1*).



Hình 4.1. Cơ chế tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ của hương nhu tía

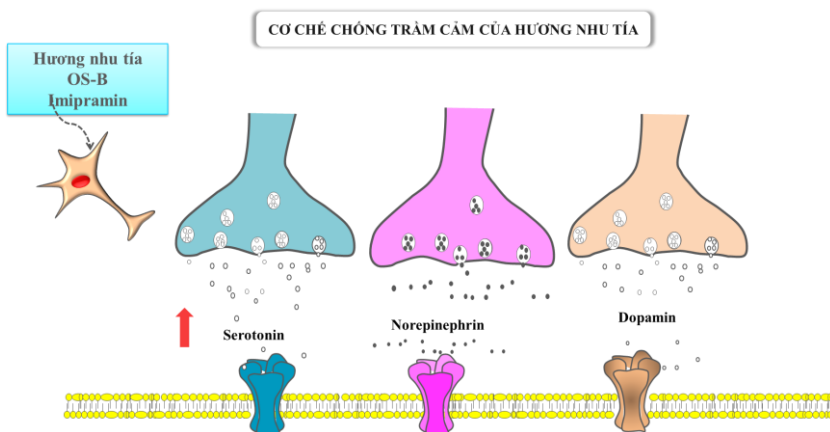
- Với tác dụng chống trầm cảm: tăng cường các chất dẫn truyền thần kinh monoamin của hệ noradrenergic, dopaminergic và serotonergic (Hình 4.2).

Trong đó cơ chế cải thiện tình trạng giãn não thất bên và tăng sinh tế bào thần kinh mới hồi hải mã không chỉ liên quan đến tác dụng cải thiện trí nhớ mà còn có mối liên hệ mật thiết với tác dụng chống trầm cảm của OS. Bằng chứng là hiện tượng suy giảm thể tích hồi hải mã, giãn rộng não thất bên hoặc teo cục bộ thùy trán đã được ghi nhận trên bệnh nhân trầm cảm.

4.1.3. Thành phần hợp chất đóng vai trò quan trọng đối với tác dụng của hương nhu tía

Nghiên cứu chỉ ra các hợp chất có mặt ở phân đoạn ethyl acetat có tác dụng cải thiện trí nhớ, trong khi các hợp chất trong phân đoạn n-butanol lại có tác dụng chống trầm cảm. Cụ thể hơn, acid ursolic và acid oleanolic trong OS-E đã được chứng minh có tác dụng cải thiện trí nhớ rất tốt, là hai thành phần hoạt chất có đóng góp quan trọng vào tác dụng

cải thiện trí nhớ của hương nhu tía. Acid ursolic có tác dụng ở mức liều khá thấp (6-12 mg/kg) theo cơ chế tăng cường hoạt động của hệ cholinergic và biểu hiện protein VEGF vùng hồi hải mã. Trong khi đó, luteolin, apigenin và apigenin-7-*O*- β -D-glucuronid trong cao OS-B được dự đoán là thành phần hoạt chất đóng góp vai trò quan trọng với tác dụng chống trầm cảm.



Hình 4.2. Cơ chế tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía

4.2. Ý nghĩa của luận án

Trong luận án này, lần đầu tiên hương nhu tía, một dược liệu sẵn có, đã được trồng rộng rãi và khai thác theo tiêu chuẩn của 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 có ý nghĩa đóng góp cho khoa học cũng như có tính ứng dụng cao trong thực tiễn.

Các kết quả của luận án đã chỉ ra những bằng chứng khoa học về tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ và chống trầm cảm của hương nhu tía. Đây là phát hiện rất có giá trị về tiềm năng rất lớn của hương nhu tía trong điều trị lâm sàng, vì suy giảm trí nhớ và trầm cảm có quan hệ mật thiết và thường hay đi kèm với nhau. Điều này sẽ có ý nghĩa trên lâm

sàng khi sử dụng hương nhu tía hàng ngày có lợi trong điều trị cho bệnh nhân sa sút trí tuệ mang các triệu chứng trầm cảm và ngược lại.

Đồng thời, bằng chứng khoa học về thành phần hợp chất đóng vai trò quan trọng đối với tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ và chống trầm cảm của nghiên cứu này đã tạo cơ sở tin cậy cho công tác tiêu chuẩn hóa thành phần hoạt chất trong các chế phẩm từ hương nhu tía có tác dụng cải thiện trí nhớ, hoặc chống trầm cảm, hoặc cả hai tác dụng nêu trên.

Bên cạnh đó, luận án cũng cung cấp một 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 điều trị bệnh lý rối loạn tâm thần – thần kinh.

KẾT LUẬN

1. Về tác dụng cải thiện trí nhớ của hương nhu tía

- Cao chiết còn hương nhu tía (OS, 400 mg/kg/ngày, đường uống) và cao chiết phân đoạn ethyl acetat (OS-E, 200 và 400 mg/kg/ngày, đường uống) có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ làm việc trên chuột OBX.

- Một số cơ chế tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ của cao OS bao gồm: cải thiện tình trạng giãn não thất bên và sự suy giảm tế bào thần kinh mới sinh vùng hồi hải mã, tăng cường hệ cholinergic (bao gồm gia tăng số lượng tế bào dương tính với ChAT vùng vách giữa và ức chế hoạt độ acetylcholinesterase ở vỏ não *ex vivo*), đồng thời ngăn chặn sự suy giảm biểu hiện gen và protein VEGF vùng hồi hải mã trên chuột OBX.

- Hai chất tinh khiết có hàm lượng cao nhất trong OS-E là acid ursolic và acid oleanolic đã được chứng minh có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ không gian ngắn hạn và dài hạn trên mô hình chuột OBX. Acid ursolic có tác dụng rõ rệt ở liều thấp cả 6 và 12 mg/kg/ngày,

đường uống, trong khi acid oleanolic chỉ có tác dụng ở mức liều 24 mg/kg/ngày, đường uống.

- Cơ chế tác dụng của acid ursolic thông qua tăng cường hệ cholinergic (bao gồm ức chế hoạt động acetylcholinesterase vỏ não và cải thiện sự suy giảm mức độ biểu hiện protein ChAT vùng hồi hải mã), đồng thời tăng cường biểu hiện protein VEGF trong hồi hải mã của chuột OBX. Như vậy, acid ursolic và acid oleanolic là hai thành phần quan trọng đóng góp vào tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ của hương nhu tía, trong đó acid ursolic có tác dụng mạnh hơn acid oleanolic.

2. Về tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía

- Cao OS và cao chiết phân đoạn n-butanol (OS-B) liều 400 mg/kg/ngày, đường uống có tác dụng giảm hành vi tuyệt vọng trong thử nghiệm treo đuôi (TST) và tăng hành vi trốn thoát có định hướng trong thử nghiệm bơi cưỡng bức (FST) trên chuột OBX.

- Cao OS-B (50 và 100 mg/kg/ngày, đường uống) có tác dụng chống trầm cảm phụ thuộc liều trên chuột UCMS. Trong đó, OS-B liều 100 mg/kg/ngày làm giảm các biểu hiện trầm cảm trên chuột UCMS một cách rõ rệt, tương đương IMP liều 8,0 mg/kg/ngày, tiêm phúc mạc, như: cải thiện hành vi giảm hứng thú (anhedonia) gồm giảm đáp ứng với phần thưởng trong thử nghiệm tiêu thụ saccharose (SPT) và giảm hành vi chải lông trong thử nghiệm môi trường mở (OFT), giảm hành vi tuyệt vọng trong TST, FST và tăng hành vi trốn thoát có định hướng trong FST, đồng thời không gây ảnh hưởng đến vận động tự nhiên của chuột trong OFT. Như vậy, cao OS-B có chứa thành phần hoạt chất đóng vai trò quan trọng đối với tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía.

- Cơ chế tác dụng chống trầm cảm của OS-B trên chuột UCMS một phần thông qua tác động lên hệ monoaminergic, cụ thể là hệ serotonergic, noradrenergic và dopaminergic.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục tìm hiểu sâu hơn về cơ chế chống trầm cảm của các chất phân lập được từ phân đoạn n-butanol hương nhu tía.

- Xây dựng quy trình chiết xuất và tiêu chuẩn hóa cao chiết hương nhu tía

- Xác định độ tinh cấp và độ tinh bán trường diễn của cao tiêu chuẩn hương nhu tía để hướng đến khả năng phát triển thành thực phẩm chức năng hoặc sản phẩm hỗ trợ dự phòng và điều trị sa sút trí tuệ và/hoặc trầm cảm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Association, A.s. (2012), "2012 Alzheimer's disease facts and figures", *Alzheimer's & Dementia*. 8(2), pp. 131-168.
2. Bi, C., S. Bi, and B. Li (2019), "Processing of mutant β -amyloid precursor protein and the clinicopathological features of familial Alzheimer's disease", *Aging and disease*. 10(2), pp. 383.
3. Khyade, V.B., S.V. Khyade, and S.G. Jagtap (2016), "Alzheimer's Disease: Overview", *International Academic Journal of Social Sciences*. 3(12), pp. 23-38.
4. Association, A.P. (2013), "Diagnostic and statistical manual of mental disorders", *BMC Med*. 17, pp. 133-137.
5. Wang, Q., M.A. Timberlake II, K. Prall, and Y. Dwivedi (2017), "The recent progress in animal models of depression", *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 77, pp. 99-109.
6. Yu, O.-C., B. Jung, H. Go, M. Park, and I.-H. Ha (2020), "Association between dementia and depression: a retrospective study using the Korean National Health Insurance Service-National Sample Cohort database", *BMJ open*. 10(10), pp. e034924.
7. Li, X., X. Bao, and R. Wang (2016), "Experimental models of Alzheimer's disease for deciphering the pathogenesis and therapeutic screening", *International journal of molecular medicine*. 37(2), pp. 271-283.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN “NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG
CẢI THIỆN SUY GIẢM TRÍ NHỚ VÀ CHỐNG TRẦM CẢM
CỦA HƯƠNG NHU TÍA (*Ocimum sanctum* L.)
TRÊN THỰC NGHIỆM

1. **Nguyen Thu Hien**, Le Thi Xoan, Phung Nhu Hoa, Nguyen Van Tai, Nguyen Minh Khoi (2020), “Putative constituents contributing to the antidepressant-like effects of *Ocimum sanctum* on olfactory bulbectomized-mice”, *Journal of medicinal materials*, 25(3), pp. 186-192.

2. Xoan Thi Le, **Hien Thu Nguyen**, Tai Van Nguyen, Hang Thi Nguyet Pham, Phuong Thi Nguyen, Khoi Minh Nguyen, Ba Van Nguyen, Kinzo Matsumoto (2021), *Ocimum sanctum* Linn. extract improves cognitive deficits in olfactory bulbectomized mice via the enhancement of central cholinergic systems and VEGF expression, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021, P. 6627648.

3. **Thu Hien Nguyen**, Thi Xoan Le, Van Tai Nguyen, Thi Nguyet Hang Pham, Minh Khoi Nguyen, Matsumoto Kinzo (2021), The antidepressant-like effects of an n-butanol fraction of *Ocimum sanctum* Linn. extract in unpredictable chronic mild stress-induced depression in mice, *Vietnam Journal Science, Technology and Engineering*, 63(4), pp. 55-61.

4. **Hien Thu Nguyen**, Xoan Thi Le, Hoa Nhu Phung, Tai Van Nguyen, Hang Thi Nguyet Pham, Khoi Minh Nguyen, Matsumoto Kinzo (2022), Ursolic acid and its isomer oleanolic acid are responsible for the anti-dementia effects of *Ocimum sanctum* in olfactory bulbectomized mice, *Journal of Natural Medicines*, <https://doi.org/10.1007/s11418-022-01609-2>, 1-13.