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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI - 2022

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH: DƯỢC LÝ – DƯỢC LÂM SÀNG
MÃ SỐ: 9720205

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TSKH. Nguyễn Minh Khởi

2. TS. Lê Thị Xoan

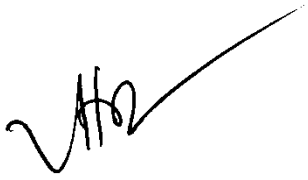
HÀ NỘI - 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TSKH. Nguyễn Minh Khởi và TS. Lê Thị Xoan.

Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận án



Nguyễn Thu Hiền

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được sự giúp đỡ quý báu của các tập thể, các thầy cô giáo, các nhà khoa học thuộc nhiều lĩnh vực cùng đồng nghiệp, bạn bè và người thân.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc nhất tới **PGS. TSKH. Nguyễn Minh Khởi** và **TS. Lê Thị Xoan** – hai thầy cô hướng dẫn đã tận tình dìu dắt, chỉ bảo và động viên tôi từ những bước đầu tiên cho đến khi tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn *Ban Lãnh Đạo Viện Dược liệu*; *Đảng ủy, Ban Giám Hiệu Trường Cao đẳng Y tế Hà Đông* đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới:

GS. Kinzo Matsumoto, Trường Đại học Toyama – Nhật Bản;

PGS.TS. Phạm Thị Nguyệt Hằng, ThS. Phí Thị Xuyến, ThS. Nguyễn Thị Phượng, các anh chị em Khoa Dược lý – Sinh hóa;

TS. Nguyễn Văn Tài, Khoa Hóa Thực vật;

TS. Phạm Thanh Huyền, Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu;

đã giúp tôi rất nhiều về mặt phương pháp luận cũng như hỗ trợ cho quá trình nghiên cứu và viết luận án của tôi.

Tôi xin chân thành cảm ơn *Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED)* đã tài trợ kinh phí để tôi thực hiện luận án này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới tập thể *Phòng Quản lý khoa học và Đào tạo* cùng các phòng ban có liên quan của Viện Dược liệu đã hết lòng giúp đỡ tôi trong suốt thời gian tôi học tập tại Viện.

Tôi xin cảm ơn các em sinh viên *Dương Thúy Linh, Nguyễn Thị Hương* và *Vũ Quang Huy* đã đồng hành và gắn bó cùng tôi những ngày miệt mài nghiên cứu trong phòng thí nghiệm.

Lời cuối cùng, từ tận đáy lòng, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới gia đình yêu thương, bạn bè thân thiết và đồng nghiệp của tôi, những người luôn sát cánh bên tôi, cùng sẻ chia những lúc khó khăn nhất, tiếp thêm cho tôi sức mạnh và nghị lực để tôi hoàn thành luận án này.

NCS. Nguyễn Thu Hiền

MỤC LỤC

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT
DANH MỤC CÁC BẢNG
DANH MỤC CÁC HÌNH
ĐẶT VẤN ĐỀ 1
1.1. Tổng quan về sa sút trí tuệ và trầm cảm 3
1.1.1. Hội chứng sa sút trí tuệ (dementia) *3*
1.1.2. Bệnh trầm cảm *10*
1.1.3. Mối liên quan giữa sa sút trí tuệ và trầm cảm *15*
1.2. Các mô hình dược lý gây suy giảm trí nhớ và trầm cảm trên thực nghiệm 18
1.2.1. Mô hình dược lý gây suy giảm trí nhớ *18*
1.2.2. Mô hình dược lý gây trầm cảm *21*
1.3. Hương nhu tía 24
1.3.1. Tên khoa học và vùng phân bố *24*
1.3.2. Đặc điểm hình thái *24*
1.3.3. Bộ phận dùng *25*
1.3.4. Thành phần hóa học *25*
1.3.5. Công dụng *26*
1.3.6. Tác dụng bảo vệ thần kinh và cải thiện trí nhớ *27*
1.3.7. Tác dụng chống trầm cảm, giải lo âu *30*
1.3.8. Một số tác dụng sinh học khác *34*
CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU, PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 37
2.1. Nguyên liệu, phương tiện nghiên cứu, địa điểm nghiên cứu 37
2.1.1. Dược liệu nghiên cứu *37*
2.1.2. Động vật thí nghiệm *37*
2.1.3. Hóa chất, thuốc thử *37*
2.1.4. Trang thiết bị, dụng cụ *38*
2.1.5. Địa điểm nghiên cứu *38*
2.2. Phương pháp nghiên cứu 40
2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng thể *40*
2.2.2. Phương pháp chiết xuất dược liệu *40*
2.2.3. Gây mô hình dược lý *42*
2.2.4. Các thử nghiệm hành vi *44*
2.2.5. Phương pháp nghiên cứu cơ chế tác dụng *52*
2.3. Thiết kế nghiên cứu 58

2.3.1. Nghiên cứu tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của hương nhu tía *58*
2.3.2. Nghiên cứu tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía *60*
2.4. Xử lý số liệu 62
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU 63
3.1. Tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của hương nhu tía 63
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 *63*
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 *73*
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 *76*
3.1.4. Tác dụng ức chế acetylcholinesterase in vitro của cao chiết cồn, phân đoạn ethyl acetat và một số chất phân lập được từ hương nhu tía *84*
3.2. Tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía 85
3.2.1. Tác dụng chống trầm cảm của cao chiết cồn và các cao chiết phân đoạn hương nhu tía trên mô hình chuột OBX *85*
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) *87*
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN 97
4.1. Nguyên liệu nghiên cứu 97
4.1.1. Đối tượng nghiên cứu *97*
4.1.2. Lựa chọn động vật thí nghiệm *98*
4.1.3. Lựa chọn thuốc chứng dương *98*
4.2. Mô hình dược lý 99
4.2.1. Mô hình loại bỏ thùy khứu giác (OBX) *99*
4.2.2. Mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS) *101*
4.3. Tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của hương nhu tía 103
4.3.1. Tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của cao chiết cồn OS toàn phần *103*
4.3.2. Tác dụng cải thiện trí nhớ của các cao chiết phân đoạn hương nhu tía *107*
4.3.3. Cơ sở lựa chọn chất phân lập tiềm năng từ hương nhu tía để đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ trên thực nghiệm *108*

4.3.4. Tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của các hoạt chất tiềm năng trong hương nhu tía.....*109*
4.4. Tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía 114
4.4.1. Tác dụng chống trầm cảm của các cao chiết phân đoạn hương nhu tía trên mô hình OBX.....*114*
4.4.2. Tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của cao OS-B trên mô hình UCMS.....*117*
4.4.3. Bàn luận chung về tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của OS-B *121*
4.4.4. Dự đoán thành phần hóa học có thể đóng vai trò quan trọng trong tác dụng chống trầm cảm của OS.....*122*
4.5. Bàn luận chung.....123
KẾT LUẬN 128
ĐỀ XUẤT.....130
DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ
TÀI LIỆU THAM KHẢO
PHỤ LỤC 1
PHỤ LỤC 2
PHỤ LỤC 3

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

STT	Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Giải nghĩa
1	ACh	acetylcholine	acetylcholin
2	AChE	acetylcholinesterase enzyme	enzym acetylcholinesterase
3	ACTH	adrenocorticotropic hormone	hormon kích thích vỏ thượng thận
4	AMPT	α-methyl-p-tyrosine	α-methyl-p-tyrosin
5	APP	amyloid precursor protein	protein tiền chất amyloid
6	ATP	adenosine triphosphate	adenosin triphosphat
7	BDNF	brain-derived neurotrophic factor	yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não
8	BSA	bovine serum albumin	albumin huyết thanh bò
9	ChAT	choline acetyltransferase enzyme	enzym cholin acetyltransferase
10	COMT	catechol-*O*-methyl transferase	catechol-O-methyl transferase
11	CRF	corticotropin-releasing factor	yếu tố giải phóng corticotropin
12	CRH	corticotropin releasing hormone	hormon giải phóng corticotrophin
13	CRHR1	corticotropin releasing hormone receptor 1	thụ thể 1 của hormone giải phóng corticotropin
14	DCX	doublecortin	chỉ dấu protein tế bào thần kinh mới sinh ở hồi răng hồi hải mã
15	DNA	deoxyribonucleic acid	acid deoxyribonucleic
16	DNCB	dinitrochlorobenzene	dinitrochlorobenzen
17	DZP	diazepam	diazepam
18	ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	Thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym
19	FST	forced swimming test	thử nghiệm bơi cưỡng bức
20	GSH	glutathione	glutathion
21	HCMECs	human cerebral microvascular endothelial cells	tế bào nội mô vi mạch não người
22	IMP	imipramine	imipramin
23	i.p.	intraperitoneal	đường tiêm phúc mạc

STT	Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Giải nghĩa
24	kl/kl		khối lượng/khối lượng
25	kl/tt		khối lượng/thể tích
26	MAO	monoamine oxidase	monoamin oxidase
27	MAOI	monoamine oxydase inhibitors	các chất ức chế monoamin oxydase
28	MDD	major depressive disorder	rối loạn trầm cảm chủ yếu
29	MI	myocardial infarction	nhồi máu cơ tim
30	MRI	magnetic resonance imaging	chụp cộng hưởng từ
31	NFTs	neurofibrillary tangles	đám rối thần kinh
32	NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-methyl-D-aspartat
33	OA	oleanolic acid	acid oleanolic
34	OBX	olfactory bulbectomized mice	chuột bị loại bỏ thùy khứu giác
35	ORT	object recognition test	thử nghiệm nhận diện vật thể
36	OS	*Ocimum sanctum* ethanol extract	cao chiết cồn hương nhu tía
37	OS-B	*Ocimum sanctum* n-butanol fractionated extract	cao chiết phân đoạn n-butanol hương nhu tía
38	OS-E	*Ocimum sanctum* ethylacetat fractionated extract	cao chiết phân đoạn ethylacetat hương nhu tía
39	OS-H	*Ocimum sanctum* n-hexan fractionated extract	cao chiết phân đoạn n-hexan hương nhu tía
40	PCPA	ρ-chlorophenylalanine	ρ-chlorophenylalanin
41	mRNA	message ribonucleic acid	acid ribonucleic - RNA thông tin
42	SEM	standard error of the mean	sai số chuẩn của giá trị trung bình
43	SPT	sucrose preference test	thử nghiệm tiêu thụ saccharose
44	TCAs	tricyclic antidepressants	các thuốc chống trầm cảm ba vòng
45	TST	tail suspension test	thử nghiệm treo đuôi
46	UCMS	unpredictable chronic mild stress	stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước
47	UA	ursolic acid	acid ursolic
48	VEGF	vascular endothelial growth factor	yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. *Các thuốc chống trầm cảm hiện có* 13

Bảng 2.1. *Một số hóa chất, thuốc thử chính sử dụng trong luận án*.....*37*
Bảng 2.2. *Một số trang thiết bị, dụng cụ chính sử dụng trong luận án*.....*39*
Bảng 2.3. *Mô phỏng lịch trình gây stress nhẹ không dự đoán trước trong 1 tuần*.....*44*
Bảng 2.4. *Cặp mồi cho các gen mục tiêu trong Real-time PCR.*.....*55*

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* 84

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. *Các giai đoạn hình thành thần kinh hồi hải mã ở người trưởng thành và phân tích hóa mô miễn dịch trong trầm cảm và bệnh Alzheimer.* *16*
Hình 1.2. *Hương nhu tía (Ocimum sanctum L.) trồng ở Trung tâm nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội, Viện dược liệu* *25*

Hình 2.1. *Sơ đồ nghiên cứu tổng thể* *41*
Hình 2.2. *Sơ đồ chiết xuất dược liệu* *42*
Hình 2.3. *Phẫu thuật loại bỏ thùy khứu giác (OBX)* *43*
Hình 2.4. *Gò bó chuột vào lọ nhỏ - một trong các tác nhân gây stress của mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS)* *45*
Hình 2.5. *Thử nghiệm nhận diện vật thể* *45*
Hình 2.6. *Thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến* *46*
Hình 2.7. *Thử nghiệm mê lộ nước Morris* *47*
Hình 2.8. *Thử nghiệm treo đuôi* *49*
Hình 2.9. *Thử nghiệm bơi cưỡng bức* *50*
Hình 2.10. *Thử nghiệm môi trường mở* *52*
Hình 2.11. *(A) Dụng cụ cắt lát não; (B) Phần não đem đúc parafin* *53*
Hình 2.12. *Lấy não chuột tách vùng hồi hải mã và vỏ não* *54*
Hình 2.13. *Sơ đồ thiết kế nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ của cao chiết cồn toàn phần hương nhu tía (OS)* *58*
Hình 2.14. *Sơ đồ thiết kế thí nghiệm đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ của các cao chiết phân đoạn hương nhu tía* *59*
Hình 2.15. *Sơ đồ thiết kế nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ của các chất phân lập tiềm năng từ hương nhu tía* *60*
Hình 2.16. *Sơ đồ thiết kế thí nghiệm đánh giá tác dụng chống trầm cảm của các cao chiết phân đoạn hương nhu tía trên mô hình OBX* *61*
Hình 2.17. *Sơ đồ thiết kế nghiên cứu tác dụng chống trầm cảm của cao chiết phân đoạn n-butanol hương nhu tía (OS-B) trên mô hình UCMS* *61*

Hình 3.1. *Ảnh hưởng của cao OS lên trí nhớ làm việc của chuột OBX trong thử nghiệm thử nghiệm nhận diện vật thể (ORT).* *63*
Hình 3.2. *Ảnh hưởng của cao OS lên trí nhớ không gian ngắn hạn của chuột OBX trong thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến.* *65*
Hình 3.3. *Tỷ lệ mở rộng não thất bên của các lô* *66*
Hình 3.4. *Số lượng tế bào dương tính với doublecortin (DCX) ở vùng hồi răng hồi hải mã của các lô* *68*

Hình 3.5. *Số lượng tế bào dương tính với cholin acetyltransferase (ChAT) ở vách giữa của các lô.....70*
Hình 3.6. *Ảnh hưởng của cao OS đến hoạt độ acetylcholinesterase (AChE) trong vỏ não chuột OBX ex vivo 71*
Hình 3.7. *Ảnh hưởng của OS lên mức độ biểu hiện gen VEGF và VEGFR2 trong hồi hải mã chuột OBX sử dụng kỹ thuật Real time PCR: (A) biểu hiện gen VEGF; (B) biểu hiện gen VEGFR2.....72*
Hình 3.8. *Ảnh hưởng của OS lên biểu hiện protein VEGF trong hồi hải mã chuột dùng phương pháp Western blot 73*
Hình 3.9. *Ảnh hưởng của các cao phân đoạn từ OS lên trí nhớ không gian làm việc của chuột OBX trong thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến.....74*
Hình 3.10. *Ảnh hưởng cao chiết phân đoạn ethyl acetat hương nhu tía (OS-E) ở 2 mức liều 200 và 400 mg/kg trên trí nhớ không gian ngắn hạn của chuột OBX trong thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến. 75*
Hình 3.11. *Ảnh hưởng của acid ursolic (UA) và acid oleanolic (OA) đến trí nhớ không gian ngắn hạn của chuột OBX trong mê lộ chữ Y cải tiến.....77*
Hình 3.12. *Ảnh hưởng của UA và OA lên thông số tiềm thời của chuột OBX giai đoạn luyện tập trong mê lộ nước Morris (MWM).....79*
Hình 3.13. *Ảnh hưởng của UA và OA lên thông số quãng đường bơi của chuột OBX giai đoạn luyện tập trong MWM 79*
Hình 3.14. *Ảnh hưởng của UA và OA lên thông số tốc độ bơi của chuột OBX giai đoạn luyện tập trong MWM.....80*
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.....81*
Hình 3.16. *Ảnh hưởng của UA đến hoạt độ AChE trong vỏ não chuột OBX.....82*
Hình 3.17. *Ảnh hưởng của UA lên biểu hiện protein ChAT và VEGF trong hồi hải mã chuột dùng phương pháp Western blot.....83*
Hình 3.18. *Đồ thị biểu diễn phần trăm ức chế hoạt độ AChE in vitro của các chất: (A) Acid ursolic; (B) Donepezil.....85*
Hình 3.19. *Ảnh hưởng của OS và các cao chiết phân đoạn lên thời gian bất động của chuột OBX trong thử nghiệm treo đuôi (TST).....86*
Hình 3.20. *Ảnh hưởng của OS và các cao chiết phân đoạn lên biểu hiện trầm cảm của chuột OBX trong thử nghiệm bơi cưỡng bức (FST).....88*
Hình 3.21. *Ảnh hưởng của OS-B lên triệu chứng giảm hứng thú của chuột UCMS trong thử nghiệm tiêu thụ saccharose (SPT).....90*
Hình 3.22. *Ảnh hưởng của OS-B (50 và 100 mg/kg) lên biểu hiện trầm cảm của chuột UCMS trong thử nghiệm TST thông qua thông số thời gian bất động. 91*

Hình 3.23. *Ảnh hưởng của OS-B (50 và 100 mg/kg) lên biểu hiện trầm cảm của chuột UCMS trong thử nghiệm FST thông qua (A) thông số thời gian bất động, (B) thông số thời gian trèo 92*
Hình 3.24. *Ảnh hưởng của OS-B (50 và 100 mg/kg) lên hoạt động tự nhiên và hành vi chải lông của chuột UCMS trong thử nghiệm không gian mở.....94*
Hình 3.25. *Ảnh hưởng của α-methyl-p-tyrosin (AMPT) đến thông số thời gian bất động của các lô chuột trong TST.....95*
Hình 3.26. *Ảnh hưởng của ρ-chlorophenylalanin (PCPA) đến thông số thời gian bất động của các lô chuột trong TST.....96*

Hình 4.1. *Tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ của hương nhu tía 126*
Hình 4.2*. Tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía.....127*

ĐẶT VẤN ĐỀ

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. Trên thế giới hiện có hơn 50 triệu người đang sống chung với chứng sa sút trí tuệ và con số này ước tính tăng gấp ba lần vào năm 2050 [1], mà nguyên nhân phổ biến nhất là do mắc bệnh Alzheimer (chiếm 60–70%) [2]. Đồng thời, theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), hiện có trên 350 triệu người bị trầm cảm ở các mức độ khác nhau với gần 1 triệu người tự tử mỗi năm [3]. Tại Việt Nam, ước tính có 370.000 người đang phải sống chung với căn bệnh Alzheimer [4]; trong khi khoảng 15% dân số mắc các rối loạn tâm thần phổ biến, theo thống kê của Bộ Y tế năm 2017 [5]. 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 [6-9]. 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 [10-14], chống trầm cảm và giải lo âu [15, 16] 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.

Do vậy, việc 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 các tác dụng này là hết sức cần thiết và cấp thiết. 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.

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"** được tiến hành với 2 mục tiêu sau:

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.

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 và chuột bị gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về sa sút trí tuệ và trầm cảm

1.1.1. Hội chứng sa sút trí tuệ (dementia)

1.1.1.1. Định nghĩa

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 (cognitive decline) vượt qua quá trình lão hóa bình thường".

Suy giảm trí nhớ là một triệu chứng quan trọng và thường xuất hiện sớm nhất trong sa sút trí tuệ. Bên cạnh ảnh hưởng tới trí nhớ, sự suy giảm nhận thức còn ảnh hưởng tới 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. Thêm vào đó, sự suy giảm chức năng nhận thức thường đi kèm với suy giảm khả năng kiểm soát cảm xúc hoặc hành vi xã hội [2].

Có nhiều dạng sa sút trí tuệ khác nhau, tuy nhiên phổ biến nhất là bệnh Alzheimer (Alzheimer's disease), chiếm tỷ lệ tới 60-70% [17].

1.1.1.2. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh

Các dấu hiệu tổn thương thường được ghi nhận trong bệnh Alzheimer, từ đó tiến triển tình trạng suy giảm trí nhớ, là sự xuất hiện của đám rối sợi thần kinh (neurofibrilary tangles – NFTs), cấu trúc mảng bám β-amyloid (Aβ) ở một số vùng não, teo não và sự thoái hóa của hệ cholinergic. Mặc dù đã gần 120 năm kể từ khi phát hiện ra bệnh Alzheimer, nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của bệnh lý này vẫn chưa được biết chính xác ngoại trừ 1% đến 5% các trường hợp có sự khác biệt di truyền đã được xác định.

Các nhà khoa học đã đưa ra một số giả thuyết như sau:

** Giả thuyết về hệ dẫn truyền thần kinh bằng acetylcholin (cholinergic) và những bất thường về các chất dẫn truyền thần kinh khác*

Đây là giả thuyết cổ điển nhất và là cơ sở cho đa số các loại thuốc điều trị hiện nay.

Acetylcholin (ACh) có một vai trò quan trọng trong hệ thống thần kinh ngoại biên và trung ương. Cholin acetyltransferase (ChAT) chịu trách nhiệm tổng hợp ACh từ acetyl-CoA và cholin trong tế bào chất, chất vận chuyển acetylcholin (vesicular acetylcholine transporter, VAChT) hấp thu dẫn truyền thần kinh vào túi synap. Sau khi khử cực, ACh trải qua quá trình xuất bào ở khe hở tiếp hợp, nơi nó có thể liên kết các thụ thể của nó, bao gồm thụ thể muscarinic và nicotinic. ACh có mặt tại khe hở tiếp hợp

bị thủy phân kịp thời bởi acetylcholinesterase (AChE), tạo thành acetat và cholin, được tái hấp thu vào hệ thần kinh tiền synap nhờ chất vận chuyển ái lực cao với cholin (high-affinity choline transporter, CHT1) [18]. Bên cạnh AChE chiếm ưu thế trong não khỏe mạnh, butyrylcholinesterase (BuChE) cũng đóng một vai trò nhỏ trong việc điều chỉnh mức độ ACh trong não. Tuy nhiên, bằng chứng cho thấy có sự gia tăng hoạt động của BuChE ở bệnh nhân Alzheimer, trong khi hoạt động của AChE không thay đổi hoặc thậm chí có thể suy giảm. Như vậy, AChE và BuChE không chỉ quyết định nồng độ ACh trong khớp thần kinh, mà còn đều có thể có vai trò trong nguyên nhân và sự tiến triển của bệnh Alzheimer [19].

Rối loạn chức năng và thoái hóa tế bào lan tỏa dẫn đến một loạt các khiếm khuyết dẫn truyền thần kinh, trong đó, các bất thường trên hệ cholinergic là nổi bật nhất. Sự mất hoạt động của hệ cholinergic tương quan thuận với mức độ nghiêm trọng của bệnh Alzheimer [18]. Vào giai đoạn muộn của bệnh, số lượng các tế bào thần kinh cholinergic và số lượng các thụ thể nicotinic trong vùng hải mã và vỏ não giảm xuống. Trong đó, thụ thể nicotinic trước synap có vai trò kiểm soát việc giải phóng của acetylcholin, cũng như các chất dẫn truyền thần kinh quan trọng khác cho bộ nhớ và tâm trạng, bao gồm: glutamat, serotonin và norepinephrin. Mặt khác, khi kích thích quá mức các thụ thể glutamat như thụ thể N-methyl-D-aspartat (NMDA), dường như có liên quan mật thiết đến sự chết tế bào thần kinh cholinergic ở não trước. Nếu sử dụng thuốc đối kháng chọn lọc tại vị trí thụ thể NMDA thì có thể ngăn chặn được sự chết các tế bào thần kinh cholinergic do hậu quả của bệnh thần kinh mạn tính [20]. Ngoài ra, những hậu quả khác gây bởi sự suy giảm chức năng hệ cholinergic trong bệnh Alzheimer cũng đã được đề xuất, ví dụ, bắt đầu tích tụ những mảng lớn amyloid, dẫn đến viêm thần kinh diện rộng [21].

Giả thuyết cholinergic lý giải việc giảm tổng hợp chất dẫn truyền thần kinh acetylcholin là nguyên nhân suy giảm nhận thức trong bệnh Alzheimer, do đó, việc tăng cường chức năng hệ cholinergic có thể cải thiện triệu chứng mất trí nhớ. Các đích tác dụng của thuốc liên quan đến giả thuyết này bao gồm: ức chế enzym thủy phân ACh là AChE, kích thích enzym tổng hợp ACh là ChAT, tăng sinh tế bào cholinergic, chủ vận receptor cholinergic.

** Giả thuyết β-amyloid*

Giả thuyết này dựa trên một điểm đặc trưng của bệnh Alzheimer là sự lắng đọng

mảng β-amyloid (Aβ) trong não. β - amyloid peptid (βAP) là những sản phẩm tự nhiên của quá trình chuyển hóa bao gồm 36-43 acid amin. Sự mất cân bằng giữa sản xuất, thanh thải các peptid làm cho các βAP dư thừa tích lũy và kết tụ lại gây độc cho tế bào [22]. Các mảng amyloid chủ yếu bao gồm sự tích lũy ngoại bào của peptid Aβ40 và Aβ42 có nguồn gốc từ protein tiền chất amyloid (amyloid precursor protein, APP, một glycoprotein xuyên màng (transmembrane protein) type 1) sau khi phân tách bởi enzym β-secretase và γ-secretase. Aβ42 ít phổ biến hơn nhưng được coi là ít hòa tan hơn và có cơ hội trùng hợp cao hơn, do đó thường dễ hình thành các cụm tích tụ bên ngoài nơ-ron dưới dạng dày đặc gọi là mảng lão hóa (senile plaques), trong khi Aβ40 được chỉ ra là thành phần chính trong bệnh lý mạch máu amyloid não (CAA). Tuy nhiên, một loại vaccin thử nghiệm đã được tìm thấy để loại bỏ các mảng amyloid trong các thử nghiệm đầu tiên ở người, lại không có bất kỳ ảnh hưởng đáng kể đến chứng mất trí nhớ. Do đó, có giả thuyết rằng các Aβ oligomer không tạo mảng (tập hợp của nhiều monomer) còn được gọi là phối tử khuếch tán có nguồn gốc amyloid (ADDLs), là dạng gây bệnh chủ yếu của Aβ do nó liên kết với một thụ thể bề mặt trên tế bào thần kinh và thay đổi cấu trúc của khớp thần kinh, từ đó làm gián đoạn tiếp xúc thần kinh [21].

** Giả thuyết Tau*

Protein Tau (Tauopathy) có vai trò ổn định cấu trúc vi ống (microtubule), giúp hệ thống vi ống thực hiện chức năng nâng đỡ tế bào, chức năng vận chuyển và vận động tế bào chất. Ở bệnh Alzheimer, Tau bị thay đổi về mặt hóa học, trở nên phosphoryl hóa quá nhiều. Giả thuyết Tau đề xuất rằng các bất thường protein Tau khởi đầu dòng thác bệnh lý. Protein Tau phosphoryl hóa bất thường bắt đầu ghép cặp với các sợi Tau khác và hình thành đám rối sợi thần kinh (NFTs), dẫn đến tan rã các vi ống, làm sụp đổ hệ thống vận chuyển của tế bào thần kinh và gây chết tế bào [23]. NFTs thường được tìm thấy trong các tế bào vùng hải mã và vỏ não ở người bệnh Alzheimer. Mật độ của các NFTs tương quan với mức độ nghiêm trọng của bệnh mất trí nhớ [17].

** Di truyền học*

Khoảng 0,1% trường hợp bệnh Alzheimer là do sự di truyền của các gen đột biến, bao gồm các gen mã hóa protein tiền chất amyloid (APP), presenilins 1 (PS1) và presenilins 2 (PS2), Tau, apolipoprotein (APOE), β-và γ-secretase; bệnh khởi phát trước 65 tuổi, được gọi là bệnh Alzheimer khởi phát sớm [21, 24]. Hầu hết các trường hợp mắc bệnh Alzheimer còn lại không có biểu hiện của di truyền trội nhiễm sắc thể và được

gọi là bệnh Alzheimer ngẫu nhiên, trong đó sự khác biệt về môi trường và di truyền có thể đóng vai trò là yếu tố rủi ro.

** Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu*

Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (vascular endothelial growth factor, VEGF) là một phân tử tín hiệu liên quan đến quá trình hình thành mạch, tham gia vào quá trình tăng sinh, di chuyển và chống lại quá trình chết theo chu trình (apoptosis) của tế bào nội mô thông qua thụ thể VEGF typ 2 (VEGFR2) nằm trên màng tế bào đích. Hơn nữa, các bằng chứng gần đây đã chỉ ra rằng tín hiệu VEGF-VEGFR2 cũng thể hiện một loạt các chức năng sinh lý quan trọng trong não như tăng cường hình thành mạch ở vùng não thiếu máu cục bộ, giảm thiểu hụt thần kinh trong quá trình hồi phục đột quỵ, liên kết hoạt động của hồi hải mã với sự hình thành thần kinh và hoạt động nhận thức [25, 26]. Bệnh nhân Alzheimer có nồng độ VEGF huyết thanh thấp hơn so với đối chứng trên *in vivo* [27] và mức độ biểu hiện VEGF ở vùng thái dương, hồi hải mã và thân não cũng thấp hơn [28]. Trên mô hình Alzheimer chuột chuyển gen, việc cấy ghép các tế bào gốc tăng cường biểu hiện VEGF vào hồi hải mã giúp cải thiện thiếu hụt nhận thức và các khiếm khuyết về trí nhớ [29]. Tương tự, điều trị chuột chuyển gen APP bằng VEGF giúp cải thiện suy giảm trí nhớ và giảm lắng đọng β-amyloid (Aβ) [30]. Cơ chế bảo vệ thần kinh của VEGF chống lại các tác hại của thác bệnh lý Alzheimer có thể do thông qua cải thiện thời gian sống sót của mạch máu. Như vậy, VEGF cũng được đánh giá là một dấu ấn sinh học tiềm năng của Alzheimer [31].

** Sự tăng sinh tế bào thần kinh mới (neurogenesis)*

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng, ở tuổi trưởng thành, quá trình hình thành thần kinh mới diễn ra chủ yếu trong thần kinh trung ương của động vật có vú, gồm phần trước của não thất (subventricular zone, SVZ) dọc theo não thất bên (lateral ventricles), và vùng dưới hạt (subgranular zone, SGZ) của hồi răng hồi hải mã [32].

Sự thoái hóa thần kinh tiến triển là dấu hiệu đặc trưng của bệnh Alzheimer. Tình trạng thoái hóa thần kinh trong giai đoạn sớm của Alzheimer bắt đầu từ vùng vỏ não xuyên tâm (transentorhinal cortex), sau đó lan đến vùng vỏ não nội khứu (entorhinal cortex) và đến hồi hải mã. Ở giai đoạn sau của bệnh, quá trình thoái hóa thần kinh này lan đến vùng thùy thái dương, thùy trán và thùy đỉnh. Đồng thời tình trạng teo não biểu hiện rõ rệt bởi sự mất đi nhiều tế bào thần kinh và giảm tiếp xúc khớp thần kinh [32, 33].

Như vậy, diễn biến bệnh lý Alzheimer có khả năng ảnh hưởng đến quá trình hình thành tế bào thần kinh. Ngược lại, suy giảm hình thành tế bào thần kinh có thể có liên quan đến sự tiến triển của Alzheimer, gây suy giảm nhận thức do thoái hóa thần kinh.

** Stress oxy hóa*

Stress oxy hóa đã được công nhận là một yếu tố góp phần gây ra lão hóa và tiến triển nhiều bệnh lý thoái hóa thần kinh bao gồm Alzheimer. Sự gia tăng các tác nhân gây oxy hóa (reactive oxygen species, ROS) liên quan đến rối loạn chức năng ty thể, ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động của khớp thần kinh và dẫn truyền thần kinh, dẫn đến rối loạn chức năng nhận thức. Quá trình chuyển hóa tế bào bất thường này cũng có thể góp phần thúc đẩy phosphoryl hóa protein Tau và tăng tích lũy amyloid-β (Aβ) [34].

** Các nguyên nhân khác*

Các quá trình viêm khác nhau và cytokin cũng có thể có vai trò trong bệnh Alzheimer. Viêm là một dấu hiệu chung của tổn thương mô trong bất kỳ bệnh nào và có thể là thứ phát tổn thương mô trong bệnh Alzheimer hoặc một dấu hiệu của phản ứng miễn dịch [35].

Ngày càng có nhiều bằng chứng về mối quan hệ nhân - quả giữa các bệnh lý tim mạch và những yếu tố nguy cơ tim mạch với tỷ lệ mắc bệnh bệnh Alzheimer: mức cholesterol cao trong tế bào thần kinh não có thể làm thay đổi chức năng màng tế bào, dẫn đến hình thành các βAP và các mảng bám [36].

Bệnh đái tháo đường có thể làm tăng nguy cơ mất trí nhớ thông qua các yếu tố liên quan đến "hội chứng chuyển hóa" (rối loạn lipid máu và tăng huyết áp) và thông qua bất thường insulin bởi insulin cũng có vai trò trong việc điều chỉnh sự chuyển hóa của βAP và protein Tau [37].

Các bệnh mạch máu não làm giảm cung cấp các chất dinh dưỡng cho tế bào thần kinh, làm tăng tốc độ lắng đọng và độc tính β-amyloid do đó làm nặng tình trạng sa sút trí tuệ [38].

Những giả thuyết khác được đề xuất để giải thích cơ chế bệnh sinh của suy giảm trí nhớ bao gồm thay đổi các yếu tố thần kinh khác nhau và biểu hiện các receptor của chúng chẳng hạn như yếu tố tế bào thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF), sự oxy hóa, rối loạn chức năng ty thể, và những ảnh hưởng của estrogen ở phụ nữ sau mãn kinh [21].

1.1.1.3. Thuốc điều trị

Cho đến nay, chưa có thuốc nào được chứng minh rõ ràng có thể trì hoãn hoặc

ngăn chặn sự tiến triển của bệnh Alzheimer. Tuy nhiên, hàng chục loại thuốc và liệu pháp nhằm làm chậm hoặc ngăn chặn sự tổn thương và mất đi của tế bào não đang được nghiên cứu trên toàn thế giới. Hiện tại, chỉ có 5 loại thuốc được Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chấp thuận giúp cải thiện triệu chứng bệnh Alzheimer tạm thời bao gồm: 3 thuốc là chất ức chế acetylcholinesterase, một thuốc là chất đối kháng thụ thể N-methyl D-aspartat (NMDA) và một thuốc còn lại tác dụng trên β- amyloid bệnh lý. Lợi ích từ việc sử dụng của những thuốc này là nhỏ và cho đáp ứng khác nhau trên từng người bệnh [39].

** Nhóm thuốc kháng cholinesterase*

Đây là nhóm thuốc chính trong điều trị Alzheimer và các bệnh sa sút trí tuệ khác. Các thuốc thuộc nhóm này bao gồm: donepezil (Aricept – Eisem), rivastigmin (Exelon – Norvatis), galantamin (Remenyl – Janssen) (tacrin cũng thuộc nhóm này nhưng đã bị rút số đăng ký do độc tính trên gan).

Các thuốc ức chế acetylcholinesterase được sử dụng để làm giảm tốc độ phân hủy ACh, do đó làm tăng nồng độ ACh trong não và chống lại sự giảm ACh gây ra bởi sự mất đi của các tế bào thần kinh cholinergic, dùng trong điều trị ở giai đoạn bệnh sa sút trí tuệ nhẹ hay nặng vừa, tuy nhiên không làm chậm khởi đầu hoặc ngăn chặn được diễn tiến tự nhiên của bệnh. Chỉ có donepezil được chấp thuận để điều trị chứng mất trí tiến triển trong bệnh Alzheimer. Liều dùng thông thường của donepezil là 5, 10 và cao nhất là 23 mg một ngày. Tác dụng không mong muốn phát sinh trên khoảng 10 - 20% người dùng, ở mức độ nhẹ đến trung bình như buồn nôn và ói mửa, chuột rút cơ bắp, giảm nhịp tim (nhịp tim chậm), giảm sự thèm ăn, giảm cân nặng, và tăng tiết acid dạ dày [21].

** Thuốc kháng thụ thể N-methyl D aspartate (NMDA)*

Glutamat là một chất kích thích dẫn truyền thần kinh hữu ích của hệ thần kinh, tuy nhiên một lượng lớn trong não có thể dẫn đến chết tế bào thông qua quá trình nhiễm độc do kích thích (excitotoxicity) trong đó các thụ thể glutamat (như receptor NMDA) bị kích thích quá mức, gây tăng nhập calci vào tế bào, có liên quan đến suy giảm trí nhớ trong bệnh Alzheimer. Memantin là một chất đối kháng không cạnh tranh trên thụ thể N-methyl D-aspartat (NMDA) với ái lực vừa phải, có tác dụng ở mức glutamat bệnh lý, từ đó cải thiện trí nhớ và chức năng nhận thức. Điều trị Alzheimer vừa và nặng với memantin không cải thiện chức năng và hành vi, có cải thiện ít về tổng thể và tình trạng

nhận thức. Các tác dụng bất lợi được báo cáo với memantin là không thường xuyên và nhẹ, bao gồm ảo giác, nhầm lẫn, chóng mặt, đau đầu và mệt mỏi. Sự kết hợp của memantin và donepezil chưa chứng minh được lợi ích trên lâm sàng [21].

** Nhóm thuốc tác dụng trên amyloid bệnh lý*

Tuy dòng thác amyloid (amyloid cascade) là một trọng tâm nghiên cứu trong điều trị suy giảm trí nhớ nhưng đến nay mới có một thuốc đối kháng amyloid được FDA phê duyệt là Aduhelm (aducanumab), một kháng thể hướng beta amyloid được chỉ định để điều trị bệnh Alzheimer. Aduhelm được phê duyệt theo lộ trình phê duyệt nhanh vào tháng 6 năm 2021, giúp bệnh nhân có khả năng tiếp cận thuốc sớm hơn tuy chưa chắc chắn về lợi ích lâm sàng [40]. Ngoài ra còn có nhiều chất ở pha cuối thử nghiệm lâm sàng theo các cơ chế như: giảm sản xuất Aβ (do ức chế β-secretase [41] hoặc γ-secretase [42], hoạt hóa α-secretase- enzym cạnh tranh với β-secretase [43]); giảm kết tập Aβ oligome [44]. Tuy nhiên chưa có chất nào trong số này thành công, có thể do Aβ không phải là mục tiêu chính xác cho thuốc điều trị bệnh Alzheimer hoặc hiểu biết hiện tại về cơ chế bệnh sinh của bệnh Alzheimer là chưa đủ [45].

** Các phương pháp điều trị khác*

Một số phương pháp điều trị khác có thể được áp dụng hỗ trợ bao gồm: liệu pháp chống oxy hóa và vitamin (vitamin E), liệu pháp tế bào gốc, liệu pháp nội tiết tố (estrogen), sử dụng thuốc điều trị tăng huyết áp hoặc rối loạn lipid máu, các chất ức chế phosphodiesterase chọn lọc (PDE), các thuốc chống viêm không steroid (NSAID), chất điều chỉnh nồng độ kim loại bằng cách chelat hóa (transition metal chelators), thuốc kháng insulin, yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (brain-derived neurotrophic factor, BDNF),… [46].

Theo Abhijit Dey và cộng sự năm 2017, dược liệu bao gồm 23 loài thực vật thuộc 21 chi và 18 họ, với 43 hợp chất hóa học phân lập được và 9 công thức thảo dược truyền thống đã được báo cáo về khả năng chống sa sút trí tuệ trong một số thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng [46] ví dụ như *Allium sativum* L. (tỏi, họ Amaryllidaceae) [47], *Angelica gigas* Nakai (bạch chỉ, họ Apiaceae) [48], *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (đương qui, họ Apiaceae) [49], *Artemisia asiatica* Nakai ex Pamp (họ Asteraceae) [50], *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. (rau đắng biển, họ Plantaginaceae) [51], *Cajanus cajan* (L.) Huth (đậu bồ câu, họ Fabaceae) [52], *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (trà xanh, họ Theaceae) [53], *Ginkgo biloba* L. (cây tiên nữ, họ Ginkgoaceae) [54], *Panax ginseng*

C.A. Mey. (nhân sâm, họ Araliaceae) [55],…

Hiện tại, bệnh Alzheimer vẫn chưa được kiểm soát mặc dù các nhà khoa học trên toàn thế giới đã và đang tập trung giải quyết hơn một trăm năm qua. Do đó, tiếp tục thực hiện các nghiên cứu để cung cấp bằng chứng khoa học cho việc sử dụng thuốc thảo dược như một liệu pháp hỗ trợ/phối hợp điều trị là hết sức cần thiết và cấp thiết.

1.1.2. Bệnh trầm cảm

1.1.2.1. Định nghĩa

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), các rối loạn tâm thần phổ biến được đề cập đến gồm hai loại chẩn đoán chính: rối loạn trầm cảm và rối loạn lo âu [3]. Trong đó, rối loạn trầm cảm là một trong những dạng bệnh tâm thần phổ biến nhất [56].

Theo Hiệp hội tâm thần Hoa Kì (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 [57].

Mặc dù trầm cảm có thể xảy ra đối với bất cứ ai ở mọi lứa tuổi, mọi tầng lớp, nhưng nguy cơ gây trầm cảm thường tăng lên bởi nghèo đói, thất nghiệp, các sự kiện đau buồn trong cuộc sống như cái chết của người thân hoặc tan vỡ mối quan hệ, bệnh tật hay sử dụng rượu và ma túy. Năm 2020, đại dịch COVID-19 đã tác động rất bất lợi đến sức khỏe tâm thần con người, khi hơn một nửa số người được khảo sát đều trải qua ít nhất một triệu chứng rõ nét của trầm cảm [58].

1.1.2.2. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh

Các bằng chứng gần đây cho thấy 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 monoamin, 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). Các yếu tố di truyền cũng đóng góp không nhỏ vào cơ chế bệnh sinh của trầm cảm. Ngoài ra, sự tương tác giữa các gen nhạy cảm với môi trường stress cũng là nguyên nhân chính của rối loạn này. Hạn chế trong việc phân định cơ chế sinh học thần kinh chính xác của bệnh trầm cảm

nằm ở bản chất phức tạp, tính không đồng nhất của bệnh và mối liên hệ với các rối loạn tâm thần khác. Việc sử dụng các mô ngoại biên từ bệnh nhân, chẳng hạn như máu, không có nhiều giá trị [59].

Cho đến thời điểm hiện tại, vẫn chưa có một cơ chế thống nhất để giải thích cho quá trình sinh bệnh học của chứng trầm cảm. Hai giả thuyết phổ biến nhất hiện nay bao gồm giả thuyết thiếu hụt monoamin và giả thuyết dinh dưỡng thần kinh.

** Giả thuyết monoamin*

Giả thuyết monoamin là giả thuyết chính đầu tiên về trầm cảm được hình thành từ năm 1960, đề xuất rằng sự thiếu hụt chức năng của một hoặc nhiều bước dẫn truyền monoaminergic gồm norepinephrin (NE), serotonin (5-HT) và/hoặc dopamin (DA) ở vỏ não và hệ viền (limbic) dẫn đến triệu chứng trầm cảm, trong khi hưng cảm gây ra bởi sự dư thừa monoamin trong não. Bằng chứng cho giả thuyết này đến từ các quan sát lâm sàng và thí nghiệm trên động vật, ví dụ như bệnh nhân được điều trị thuốc reserpin hạ huyết áp, gây ra sự cạn kiệt NE, 5-HT và DA dự trữ trước synap dẫn đến một hội chứng giống như trầm cảm. Ngược lại, sự hưng phấn và hành vi hiếu động đã được quan sát thấy ở một số bệnh nhân điều trị bằng iproniazid (một hợp chất tổng hợp kháng lao), trong đó nồng độ của NE và 5-HT trong não tăng lên do iproniazid ức chế enzym giáng hóa monoamin (monoamin oxidase, MAO). Hầu hết các thuốc điều trị trầm cảm hiện nay đều đã được chứng minh tác động lên hệ monoaminergic và làm tăng nồng độ các chất dẫn truyền 5-HT, NE hay DA tại khe synap. Cho đến nay, giả thuyết monoamin vẫn mang lại nhiều giá trị và có tính phù hợp cao với thực tế lâm sàng [60].

** Giả thuyết dinh dưỡng thần kinh*

Giả thuyết dinh dưỡng thần kinh cho rằng trầm cảm là kết quả của sự suy giảm dinh dưỡng thần kinh, dẫn tới teo các tế bào thần kinh, giảm sinh tế bào thần kinh hồi hải mã và mất các tế bào đệm. Các yếu tố dinh dưỡng thần kinh, bao gồm yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (brain-derived neurotrophic factor -BDNF), yếu tố tăng trưởng thần kinh (nerve grow factor -NGF), yếu tố dinh dưỡng thần kinh NT-3 và yếu tố dinh dưỡng thần kinh NT-4/5 là những chất điều hòa quan trọng của hoạt động thần kinh, bao gồm quá trình biệt hóa, tồn tại và phát triển của synap. Thụ thể Tropomyosin kinase B (TrkB) là một thụ thể của BDNF. Sự suy giảm nồng độ BDNF và mức độ biểu hiện thụ thể TrkB cũng đã được ghi nhận trong máu và não ở những bệnh nhân trầm cảm [61]. Giả thuyết này có thể giải thích thuyết phục hiện tượng suy

giảm thể tích hồi hải mã [62], giãn rộng não thất bên hoặc teo cục bộ thùy trán trên bệnh nhân trầm cảm [63].

** Một số giả thuyết khác*

Ngoài hai giả thuyết trên, trầm cảm cũng được cho là có liên quan đến một số bất thường nội tiết, như thay đổi mức độ cortisol, quá mẫn yếu tố giải phóng corticotrophin (corticotropin-releasing factor -CRF), hormon tăng trưởng (GH) hoặc hormon tuyến giáp, đặc biệt là rối loạn chức năng ở trục vùng dưới đồi - tuyến yên - tuyến thượng thận (hypothalamic–pituitary–adrenal axis, HPA axis). Đã có bằng chứng về sự thay đổi chức năng tuyến giáp có mối liên quan rõ ràng đến trầm cảm và sử dụng triiodothyronin (T3) dường như là một liệu pháp bổ trợ hiệu quả cho bệnh nhân được điều trị trầm cảm. Steroid sinh dục cũng được cho là có vai trò trong cơ chế bệnh sinh trầm cảm: sự thiếu hụt estrogen ở phụ nữ sau sinh và mãn kinh hay sự thiếu hụt testosteron ở nam giới có liên quan đến các triệu chứng trầm cảm [64].

Bên cạnh đó, yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (vascularendothelial growth factor -VEGF), được biết là có ảnh hưởng nhiều đến tế bào thần kinh. Tương tự, ngày càng có nhiều bằng chứng liên quan đến sự hình thành tế bào thần kinh mới vùng hồi hải mã người góp phần vào sự tiến triển thành rối loạn trầm cảm. Mối quan tâm đáng kể đã được hướng vào việc xác định các tín hiệu phân tử, bao gồm các yếu tố thần kinh và con đường tín hiệu liên quan tác dụng chống trầm cảm và có thể hoạt động như bộ điều biến chính trong điều chỉnh thần kinh ở hồi hải mã trưởng thành [65].

Một số cơ chế bệnh sinh khác của trầm cảm cũng đã được đề cập như thay đổi dẫn truyền thần kinh thông qua hệ glutamatergic, giảm hoạt tính hệ GABAergic, giảm tổng hợp các steroid thần kinh, giảm chức năng opioid nội sinh, mất cân bằng monoamin-acetylcholin... Tuy nhiên do sự giao thoa phức tạp của các hệ thống khác nhau tại não, những giả thuyết này vẫn có thể chỉ dừng lại ở những thay đổi thứ phát của trầm cảm mà chưa chỉ ra được nguyên nhân thực sự của rối loạn này [66].

Không còn nghi ngờ nữa về vai trò của hệ monoaminergic trong sinh lý bệnh trầm cảm, nhưng bất kỳ giả thuyết nào về cơ chế bệnh sinh của trầm cảm đều phải xem xét đến sự tương tác với các hệ khác và sự phức tạp quy định chức năng hệ thần kinh trung ương (central neuvous system, CNS). Bất chấp tất cả những tiến bộ đã đạt được trong những thập kỷ qua, ngày nay vẫn còn nhiều vấn đề cần được giải đáp trong hiểu biết và điều trị trầm cảm nặng cũng như trầm cảm kháng với điều trị.

1.1.2.3. Thuốc điều trị

Các cơ chế hiện có để phát triển các loại thuốc điều trị chủ yếu dựa trên giả thuyết monoamin, việc giảm nồng độ các chất dẫn truyền thần kinh monoamin đóng vai trò chính trong trầm cảm [67]. Nói chung, các thuốc chống trầm cảm đều tập trung vào tăng cường dẫn truyền serotonergic và/hoặc noradrenergic [68]. Kể từ khi Kuhn giới thiệu imipramin vào những năm 1950, thuốc chống trầm cảm đã trở nên sẵn có, không chỉ về số lượng, mà còn về sự đa dạng trong cơ chế dược lý liên quan đến tác dụng *(Bảng 1.1 [68])*.

Bảng 1.1. *Các thuốc chống trầm cảm hiện có*

STT	Nhóm thuốc	Cơ chế tác dụng	Một số thuốc điển hình	Tác dụng không mong muốn
1	Chống trầm cảm ba vòng (Tricyclic antidepressants, TCAs)	tăng norepinephrin nhanh và ở một mức độ nào đó cả serotonin (5-HT) bằng việc chặn tái hấp thu ở khe synap	amitriptylin, butriptylin, clomipramin	- quá liều gây độc - nhiều tác dụng phụ do sự ức chế muscarinic, kháng histamin, kích thích α_1-adrenergic và kháng cholinergic mạnh
2	Ức chế MAO (Monoamine oxydase inhibitors, MAOIs)	ức chế sự phân huỷ amin oxy hóa của 3 loại amin sinh học (norepinephrin, dopamin, 5-HT) và các phenylethylamin khác	- không chọn lọc cả MAO-A và -B: phenelzin, isocarboxazid, tranylcypromin, moclobemid - chọn lọc MAO-B: selegilin	- cơn tăng huyết áp cấp - rối loạn cương dương - lo âu, buồn nôn, chóng mặt, mất ngủ, phù phổi và tăng cân
3	Ức chế chọn lọc thu hồi serotonin (Selective	- ngăn ngừa tái hấp thu 5-HT trước synap, làm tăng 5-	citalopram, escitalopram, fluoxetin,	- kích động, chán nản và lo lắng nhiều hơn trong vòng một

STT	Nhóm thuốc	Cơ chế tác dụng	Một số thuốc điển hình	Tác dụng không mong muốn
	serotonin reuptake inhibitors, SSRIs)	HT để kích thích thụ thể 5-HT hậu synap. - có chọn lọc với hệ 5-HT nhưng không đặc hiệu với các thụ thể 5-HT khác nhau	fluvoxamin, paroxetin, sertralin, và vilazodon	tuần đầu điều trị - mất ngủ - rối loạn chức năng tình dục - tăng cân hoặc chán ăn, tiêu chảy
4	Điều hòa serotonin - chẹn 5-HT_2 (5-HT_2 blockers)	chẹn thụ thể 5-HT_2, ức chế tái hấp thu 5-HT và norepinephrin	trazodon mirtazapin	- gây giảm huyết áp tư thế đứng - gây ngủ và tăng cân
5	Ức chế tái hấp thu kép (Serotonine and noradrenaline reuptake inhibitors-SNRIs)	ức chế tái hấp thu cả 5-HT và norepinephrin, cũng như thuốc chống trầm cảm ba vòng	desvenlafaxin, duloxetin, levomilnacipran, venlafaxin, vortioxetin	- độc tính tương đương với các SSRIs - buồn nôn phổ biến nhất trong 2 tuần đầu
6	Hoạt động đa thụ thể (Atypical antidepressants)	tác động đến chức năng catecholaminergic, dopaminergic và noradrenergic, không ảnh hưởng đến hệ serotonergic	mirtazapin, nefazodon, bupropion, trazodon	- gây tăng huyết áp - có thể gây co giật - kích động
7	Thuốc chống trầm cảm melatonin	chủ vận melatonin (MT_1/MT_2) và đối kháng thụ thể 5-HT_{2C}	agomelatin	ít gặp: có thể gây đau đầu, buồn nôn, tiêu chảy, tăng enzym gan

Khi xem xét các loại thuốc chống trầm cảm hiện có, không còn nghi ngờ gì nữa là hệ noradrenergic và serotonergic rất quan trọng trong sinh lý bệnh và điều trị trầm cảm, vì tất cả các thuốc đều tương tác với một hoặc cả hai hệ này và gây hiệu ứng ròng là tăng dẫn truyền thần kinh 5-HT. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nhóm thuốc chống trầm cảm nào vừa có hiệu quả với tất cả bệnh nhân, khả năng dung nạp tốt, vừa ít tác dụng không mong muốn, hơn nữa đã có hiện tượng đề kháng toàn bộ hay một phần đối với các thuốc điều trị trầm cảm và thời gian khởi phát tác dụng thường chậm. Nhiều tài liệu đã chỉ ra tầm quan trọng của liệu pháp sử dụng thuốc bổ sung và thay thế (complementary and alternative medicine, CAM) trong điều trị các bệnh tâm thần. Trong đó, thuốc thảo dược là liệu pháp được sử dụng phổ biến nhất [69] và được nhiều nhà khoa học quan tâm ví dụ như: *Panax ginseng* (nhân sâm, họ Araliaceae) [70]; *Paeonia lactiflora* Pall (hoa mẫu đơn, họ Ranunculaceae) [71]; *Albizia julibrissin* (hoa hợp hoan, họ Fabaceae) [72]; *Butea superba* (huyết đằng lông, họ Fabaceae) [73]…

Do vậy, tiếp tục nghiên cứu tác dụng chống trầm cảm và xác định cơ chế tác dụng của các loại thảo dược, từ đó cung cấp bằng chứng khoa học cho việc áp dụng thuốc thảo dược trong điều trị là hết sức hữu ích.

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

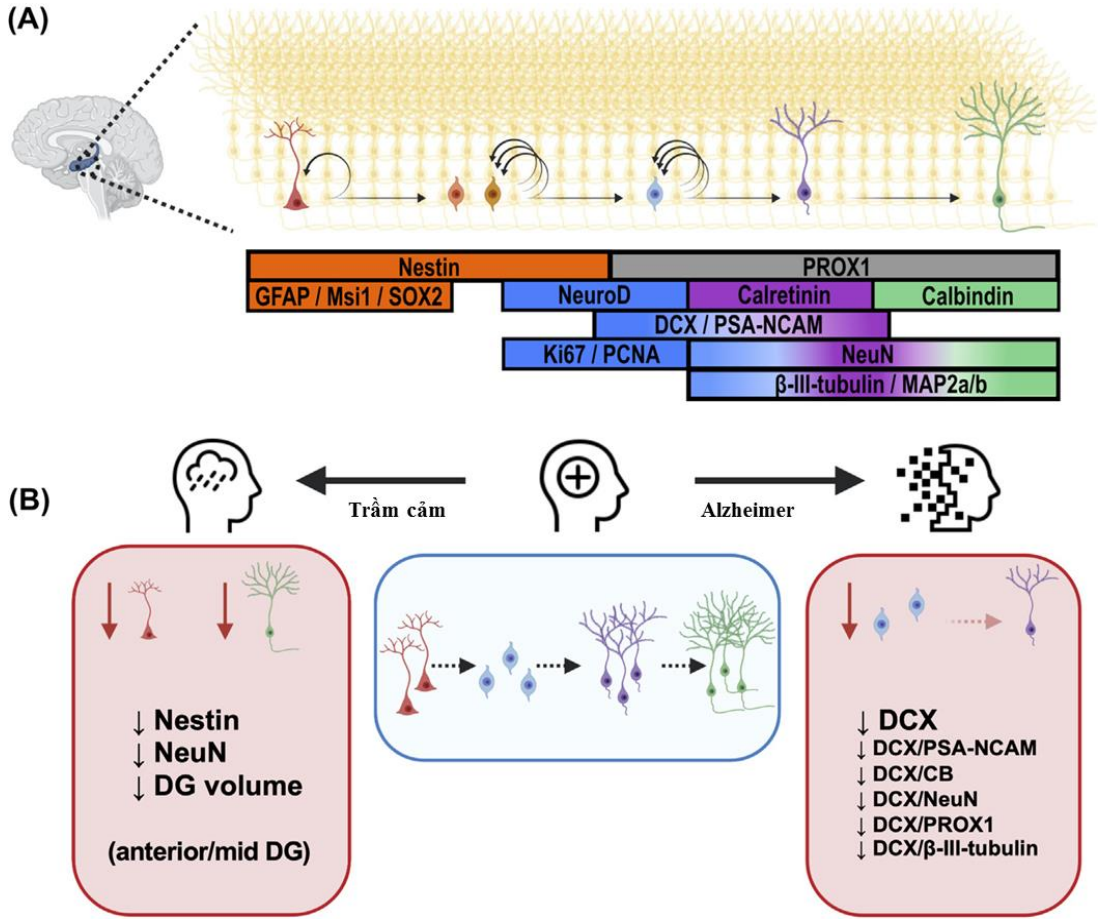
Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra mối liên quan giữa sa sút trí tuệ và trầm cảm, tuy rằng mối liên hệ này là rất phức tạp và khó xác định [74].

Một mặt, trầm cảm là một rối loạn bệnh lý đi kèm phổ biến ở người lớn tuổi bị sa sút trí tuệ. Trên thực tế, có tới 30% –50% trường hợp sa sút trí tuệ có kèm theo trầm cảm [75]. 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 [76]. Mặt khác, các nghiên cứu trước đây đã báo cáo rằng trầm cảm làm tăng tốc độ suy giảm nhận thức [77] và là một yếu tố nguy cơ độc lập của chứng sa sút trí tuệ [78].

Các cơ chế sinh học nổi bật nhất thể hiện mối liên hệ giữa trầm cảm và sa sút trí tuệ bao gồm: 1) bệnh mạch máu (vascular diseases) [79]; 2) các triệu chứng trầm cảm kích hoạt trục HPA và tăng sản xuất glucocorticoid do đó có thể làm giảm thể tích vùng hồi hải mã, teo đồi thị và suy giảm nhận thức [80]; 3) stress liên quan đến trầm cảm làm gia tăng nồng độ glucocorticoid, dẫn đến tăng sản xuất β-amyloid và protein tau [81], đồng thời gây tăng tích lũy β-amyloid do có thể có sự liên kết với hệ serotonergic [80];

4) phản ứng viêm: sự gia tăng các cytokin trong bệnh trầm cảm có thể dẫn đến sự suy giảm điều hòa chống viêm và ức chế miễn dịch, tăng các chất gây viêm trong thần kinh trung ương, giảm tính dẻo của khớp thần kinh, giảm hình thành thần kinh hồi hải mã và cuối cùng là suy giảm nhận thức và trí nhớ [82]; 5) sự suy giảm tín hiệu yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) ở hồi hải mã được ghi nhận trên cả bệnh nhân trầm cảm và Alzheimer [80].

Đặc biệt, hồi hải mã đóng một vai trò rất quan trọng trong cả bệnh lý Alzheimer và trầm cảm. Ở vùng hồi răng hồi hải mã của một người trưởng thành khỏe mạnh, khoảng 700 tế bào thần kinh mới được tạo ra mỗi ngày trong suốt cuộc đời, chịu trách nhiệm cho trí nhớ và các chức năng nhận thức khác, cũng như điều hòa tâm trạng. Các giai đoạn hình thành thần kinh hồi hải mã ở người trưởng thành và phân tích hóa mô miễn dịch trong trầm cảm và bệnh Alzheimer được trình bày ở *Hình 1.1.* [83].



Hình 1.1. *Các giai đoạn hình thành thần kinh hồi hải mã ở người trưởng thành và phân tích hóa mô miễn dịch trong trầm cảm và bệnh Alzheimer.*

(A) Thế hệ tế bào thần kinh mới sinh trong vùng dưới hạt (SGZ) của hồi răng (dentate gyrus, DG) chứa các tế bào gốc thần kinh giống tế bào gốc hướng tâm loại I

(RGL-NSCs, màu đỏ). RGL-NSCs phân chia không thường xuyên và phát triển nhanh chóng thành tế bào tiền thân thần kinh typ II a/b (đỏ nhạt/cam). Chúng tiếp tục sinh sôi, phát triển thành các nguyên bào thần kinh loại III (màu xanh lam). Khi ra khỏi chu trình tế bào, chúng định hình thành các nơron chưa trưởng thành ở lớp hạt (màu tím). Trong giai đoạn đầu hậu kỳ, chúng rất dễ bị kích thích bởi GABA, điều chỉnh sự trưởng thành của đuôi gai và tích hợp khớp thần kinh cho đến khi chúng trưởng thành đúng cách (màu xanh lá cây) và kết nối tới mạng tín hiệu xung quanh (màu vàng) [84].

Các chỉ dấu của tế bào thần kinh ở các giai đoạn phát triển tương ứng gồm Nestin, protein homeobox Prospero 1 (PROX1), protein có tính acid dạng sợi thần kinh đệm (glial fibrillary acidic protein, GFAP), musashi-1(Msi1), yếu tố phiên mã SRY-box 2 (SRY-box transcription factor 2, SOX2), NeuroD, calretinin, calbindin (CB), phân tử kết dính tế bào thần kinh-acid polysialic (polysialic acid-neural cell adhesion molecule, PSA-NCAM), kháng nguyên nhân tế bào thần kinh (neuronal nuclear antigen, NeuN), Ki67, kháng nguyên nhân tế bào tăng sinh (proliferating cell nuclear antigen, PCNA), βIII-tubulin, protein liên kết vi ống a/b (microtubule-associated protein a/b, MAP2a/b).

(B) Trầm cảm có liên quan đến giảm số lượng tế bào dương tính với Nestin và NeuN, được biểu hiện cho tế bào gốc thần kinh và tế bào thần kinh trưởng thành, cũng như với thể tích vùng hồi răng (DG), đặc biệt là ở vùng trước và giữa DG. Alzheimer liên quan chặt chẽ với sự suy giảm các tế bào dương tính với doublecortin (DCX), đại diện cho tiền nhân hoặc nguyên bào thần kinh. Các nguyên bào thần kinh dương tính với DCX đã giảm còn khoảng 60-70% so với đối chứng trong giai đoạn sớm của Alzheimer (Braak giai đoạn I – II). Khi bệnh lý Alzheimer tiến triển (Braak giai đoạn IV – VI), mức DCX giảm thêm xuống còn khoảng 30–40%. Trong tất cả các tế bào dương tính với DCX, sự đồng biểu hiện của PSA-NCAM, PROX1, NeuN, βIII-tubulin hoặc calbindin (CB) đều giảm, cho thấy sự hình thành tế bào thần kinh bị suy giảm [85].

Phân tích sau khi khám nghiệm về mô não người cho thấy rằng, điều trị trầm cảm bằng SSRI có liên quan đến việc tăng số lượng tế bào dương tính với DCX trong bệnh nhân bị sa sút trí tuệ thể Lewy, cho thấy hoạt động thần kinh tăng lên, cũng như có biểu hiện ít suy giảm nhận thức hơn. Trên thực tế, mức độ DCX tăng lên tương quan với điểm nhận thức tốt hơn [86]. Những phát hiện này ủng hộ giả thuyết rằng thuốc chống trầm cảm làm tăng hình thành thần kinh, có thể vừa cải thiện tâm trạng vừa ngăn ngừa thoái hóa thần kinh và cải thiện trí nhớ.

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 vừa có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ, vừa có tác dụng chống trầm cảm. Tuy nhiên đã có một số nghiên cứu thử nghiệm cho thấy sự cải thiện đáng kể về trí nhớ, khi bổ sung thêm chất ức chế cholinesterase sau khi điều trị bằng thuốc chống trầm cảm ở những bệnh nhân cao tuổi bị trầm cảm, suy giảm nhận thức [87]. 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.

1.2. Các mô hình dược lý gây suy giảm trí nhớ và trầm cảm trên thực nghiệm

1.2.1. Mô hình dược lý gây suy giảm trí nhớ

Cho đến nay, mô hình động vật của bệnh Alzheimer chỉ cho thành công hạn chế trong việc dự đoán hiệu quả điều trị trong thử nghiệm lâm sàng. Thực tế là, không có một mô hình động vật nào có thể tái tạo hoàn toàn cả ba mặt: triệu chứng bệnh (sự giống nhau trong các triệu chứng lâm sàng), cấu tạo bệnh (sự tương đồng về nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh) và dự đoán điều trị (sự tương đồng trong đáp ứng lâm sàng với điều trị) so với bệnh Alzheimer trên người. Tuy nhiên, cách tiếp cận khác nhau cho phép các nhà nghiên cứu đi sâu vào một số khía cạnh bệnh lý nhất định của bệnh Alzheimer.

1.2.1.1. Một số mô hình dược lý hiện nay

Hiện nay các mô hình động vật áp dụng cho bệnh Alzheimer được chia thành 3 nhóm như sau:

- Mô hình tự nhiên (Natural AD models)

Mất trí nhớ là dấu hiệu phổ biến ban đầu của lão hóa. Do đó, động vật già có thể được sử dụng để gây mô hình tự nhiên của chứng mất trí nhớ. Mô hình tự nhiên không có bất kỳ tác động nào, có thể là những công cụ vô giá bắt chước sinh lý bệnh tự nhiên của bệnh Alzheimer. Tuy vậy, loại mô hình này khó áp dụng trên chuột nhắt và chuột cống vì ở điều kiện tự nhiên, các mảng lão hóa hiếm khi hình thành trong quá trình lão hóa của chúng; trong khi loài gặm nhấm là động vật được sử dụng thường xuyên nhất trong nghiên cứu thực nghiệm do chi phí thấp, sẵn có và dễ dàng thao tác, cũng như mô phỏng được các hành vi đặc trưng của bệnh [24].

- Mô hình chuyển gen (Transgenic animal models)

Nghiên cứu trên mô hình động vật chuyển gen mang bệnh ở người là cần thiết để hiểu rõ về cơ chế phân tử và thúc đẩy nghiên cứu tiền lâm sàng. Phần lớn mô hình

chuyển gen được thực hiện trên chuột nhắt, dẫn đến hình thành các mảng amyloid (bằng cách biểu hiện riêng lẻ gen mã hóa protein tiền chất amyloid (APP) hoặc kết hợp với presenilin 1 (PS 1) và presenilin 2 (PS 2) của người) và các đám rối sợi thần kinh (bởi biểu hiện gen mã hóa protein Tau liên kết vi ống (microtubule associated protein Tau, MAPT) của người) [88]. Các mô hình khác trên động vật không xương sống như ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*) [45] và giun tròn (*Caenorhabditis elegans*) [89], cũng như động vật có xương sống như cá ngựa [90] có khoảng cách xa hơn với sinh lý học của con người nên ít được sử dụng rộng rãi hơn. Tuy nhiên, ngày càng nhiều câu hỏi được đặt ra về tính tương đồng với đáp ứng điều trị của các mô hình chuyển gen sẵn có, khi tỷ lệ thất bại của các chất điều trị Alzheimer trong thử nghiệm lâm sàng là rất cao (~ 99,6%), mặc dù trước đó đã thành công trong thử nghiệm tiền lâm sàng trên mô hình động vật [91].

- *Mô hình can thiệp (Intervention models)*

Các mô hình can thiệp gây bệnh Alzheimer ngẫu nhiên khác nhau dựa trên tiêm nội sọ chất độc thần kinh (mô hình can thiệp bằng hóa học - chemically-induced/injection models) hoặc khởi phát tổn thương ở các vùng não đặc biệt (mô hình can thiệp bằng phẫu thuật - lesion models) [24].

Mô hình can thiệp bằng hóa học được thực hiện bằng cách tiêm một hóa chất vào não nhằm gây thiệt hại đến con đường dẫn truyền thần kinh, dẫn đến chứng mất trí nhớ như β-amyloid (Aβ) [92], scopolamin (đối kháng thụ thể acetylcholin muscarinic) [93], cholinotoxin AF64A (ethylcholine aziridinium- là một chất tương tự cholin) [94], L-methionin (kích hoạt thụ thể NMDA) [95], acid okadaic (gây phosphoryl hóa Tau) [96],… Các mô hình này tuy thiết lập được các triệu chứng lâm sàng liên quan nhưng không mô phỏng được đặc điểm thoái hóa thần kinh tiến triển của bệnh Alzheimer [24].

Mô hình can thiệp bằng phẫu thuật gồm một số mô hình như mô hình gây mất trí nhớ do thiếu máu não cục bộ (ischemia-induced learning and memory deficit) bằng cách thắt 2 động mạch cảnh đồng thời gây hạ huyết áp bằng cách rút máu đuôi chuột [51] và mô hình loại bỏ thùy khứu giác hai bên (olfactory bulbectomized, OBX).

Trong đó, mô hình OBX trên loài gặm nhấm là một mô hình hứa hẹn tái tạo được các dấu hiệu đặc trưng của bệnh lý Alzheimer tiến triển.

1.2.1.2. Mô hình loại bỏ thùy khứu giác hai bên (olfactory bulbectomized, OBX)

Mô hình OBX thuộc loại mô hình can thiệp bằng cách phẫu thuật, thường trên

loài gặm nhấm [24]. 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 [97].

Gây tổn thương thùy khứu giác hai bên trên chuột cống được thực hiện lần đầu tiên bởi Mark và cộng sự năm 1971 nhằm đánh giá ảnh hưởng của mất khứu giác đến khả năng học tập. Đến năm 1976, Van Riezen và cộng sự đã đề xuất OBX như một mô hình bệnh trầm cảm và được sử dụng phát hiện các chất chống trầm cảm hiệu quả [98]. Ngày nay, loại bỏ khứu giác ở loài gặm nhấm đã được sử dụng rộng rãi trên thế giới như một mô hình bệnh trầm cảm, rối loạn cảm xúc [99] và suy giảm chức năng nhận thức, thoái hóa thần kinh, trong đó có Alzheimer [100].

Sự suy giảm chức năng khứu giác không chỉ xuất hiện từ giai đoạn sớm của bệnh Alzheimer [101] mà còn được ghi nhận trên bệnh nhân rối loạn nhận thức mức độ nhẹ (mild cognitive impairment, MCI) và trung bình [102, 103]; cũng như trên chuột chuyển gen có biểu hiện quá mức một dạng đột biến protein tiền thân β-amyloid và Tau của người [104]. Loại bỏ thùy khứu giác 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 [105], mất các tế bào thần kinh chính tổng hợp chất dẫn truyền thần kinh quan trọng như acetylcholin, serotonin, dopamin, và norepinephrin [100, 106-108] và tăng mức độ Aβ của não [109]. Đồng thời, đôi khi các phần cấu trúc não như hồi hải mã, thùy thái dương … cũng bị thoái hóa sau khi loại bỏ thùy khứu giác. Thuốc ức chế AChE, được sử dụng rộng rãi cho điều chỉnh rối loạn nhận thức ở bệnh nhân Alzheimer, có hiệu quả trên động vật OBX [110].

Như vậy, mô hình OBX là một mô hình bệnh Alzheimer rất khả thi khi tái tạo thành công phức hợp các triệu chứng của bệnh này, cũng như mang tính sẵn có do dễ dàng thực hiện trong một thời gian tương đối ngắn. Não chuột nhỏ khi so sánh với loài khác tuy nhiên các nhà phẫu thuật thần kinh lành nghề có thể nhắm chính xác mục tiêu nhờ bản đồ giải phẫu thần kinh có giá trị như “Atlas bộ não chuột” của Franklin (2008) hoặc “Bản đồ não chuột hoàn chỉnh”của D.Brill (2006) [111]. Hơn nữa, ưu điểm chính của mô hình là sự phù hợp của nó đối với sự phát sinh và diễn biến tự nhiên bệnh do bắt

chước thiệt hại của hệ thống khứu giác ngoại vi trên bệnh nhân Alzheimer [112, 113]. Mô hình tổn thương này cung cấp cái nhìn mới sâu sắc về nhiều cơ chế của mất trí nhớ và học tập, đặc biệt được sử dụng để phát triển các phương pháp điều trị cho chứng sa sút trí tuệ [24].

1.2.2. Mô hình dược lý gây trầm cảm

Dựa trên nguyên nhân, đặc điểm của trầm cảm, các mô hình động vật đã được phát triển trên cơ sở phơi nhiễm với stress cấp tính hoặc mạn tính, tương tác gen- môi trường, sử dụng glucocorticoid ngoại sinh và kỹ thuật gen. Mỗi mô hình có những ưu điểm và nhược điểm riêng. Các mô hình này thường được áp dụng trên loài gặm nhấm và thể hiện tính hữu dụng trong thiết kế nghiên cứu nhằm phân định cơ chế sinh học và phân tử thần kinh, cũng như đánh giá tác dụng và cơ chế của các liệu pháp điều trị trầm cảm [59].

1.2.2.1. Một số mô hình dược lý hiện nay

- *Mô hình thất bại trong xã hội (social defeat model)*

Ưu điểm chính của mô hình này là sử dụng các xung đột xã hội làm tác nhân gây căng thẳng, do đó phản ánh vai trò của căng thẳng tâm lý xã hội trong cơ chế bệnh sinh của bệnh trầm cảm ở người. Mô hình thất bại xã hội gây ra các hành vi giống như trầm cảm lâu dài và các thay đổi nội tiết thần kinh, có thể được đảo ngược bằng cách điều trị lâu dài với thuốc chống trầm cảm [114]. Tuy nhiên, mô hình này chỉ áp dụng được trên các loài gặm nhấm đực trưởng thành, vì các con cái không thể hiện đủ hành vi hung hăng, trong khi mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS) có thể áp dụng trên cả chuột đực và chuột cái.

- *Mô hình cô lập trong xã hội (social isolation model)*

Sự cô lập trong xã hội là một yếu tố căng thẳng dẫn đến thay đổi hành vi xã hội, chức năng của hệ thần kinh và nội tiết thần kinh ở người [115]. Do đó, sự cô lập xã hội lâu dài đối với động vật thí nghiệm là một mô hình để nghiên cứu các hậu quả về hành vi và hóa học thần kinh của việc không có tương tác xã hội ở loài gặm nhấm. Nhiều triệu chứng do cô lập gây ra đã được ghi nhận giống với triệu chứng trầm cảm và rối loạn lo âu [116].

- *Mô hình bất lực học được (Learned helplessness, LH)*

Mô hình bất lực học được là mô hình đặc trưng bởi nguyên nhân và triệu chứng giống như trầm cảm ở người vì nó tạo ra kịch bản vô vọng, không thể giải thích và không

thể kiểm soát được, dẫn đến kết quả là sự trầm cảm. Chính việc không thể kiểm soát các sự kiện tiêu cực như chấn thương, những cú sốc, đã dẫn đến cảm giác lo lắng và bất lực khi tiếp xúc với chúng [59].

- *Mô hình gây stress giai đoạn đầu đời (Early life stress model)*

Những stress trong giai đoạn đầu đời (con non bị tách khỏi mẹ, maternal separation-MS) có tác động lâu dài đối với cảm xúc, ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của bệnh tâm thần ở giai đoạn sau của cuộc đời, chẳng hạn như trầm cảm và rối loạn tâm thần. Mô hình này làm gián đoạn tương tác trực tiếp thông thường giữa mẹ và con, gây tổn thương khả năng đáp ứng của trục HPA [117].

- *Mô hình di truyền*

Bởi vì serotonin (5-HT) thường được sử dụng để điều trị trầm cảm và suy giảm 5-HT đóng vai trò sinh lý bệnh trầm cảm nên hầu hết các mô hình di truyền đều dựa trên tác động vào hệ 5-HT. Mô hình di truyền chính gây lo lắng và hành vi giống trầm cảm trên loài gặm nhấm dựa trên phương pháp loại bỏ thành tố cơ bản như chuột đột biến đồng hợp tử Tph 2 −/− (tryptophan hydroxylase, TPH) [118, 119] hay chuột đột biến dị hợp tử Vmat 2 +/− (chất vận chuyển túi monoamin 2, vesicular monoamine transporter –Vmat 2) [120]. Nhìn chung, các mô hình gặm nhấm di truyền có thể cung cấp bằng chứng về sự liên quan của gen cụ thể trong sinh lý bệnh trầm cảm.

Bên cạnh đó, mô hình loại bỏ thùy khứu giác (olfactory bulbectomized, OBX) và mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (unpredictable chronic mild stress, UCMS) là hai mô hình động vật quan trọng tái hiện được nhiều điểm tương đồng với bệnh lý trầm cảm ở người.

1.2.2.2. Mô hình loại bỏ thùy khứu giác (olfactory bulbectomized, OBX)

Như đã nói ở trên, mô hình loại bỏ thùy khứu giác không chỉ được dùng để nghiên cứu bệnh lý suy giảm nhận thức và thoái hóa thần kinh mà còn là một mô hình rất hữu ích trong việc dự đoán hiệu quả của các chất chống trầm cảm tiềm năng. Rối loạn chức năng khứu giác có mối liên hệ rõ rệt với hành vi trầm cảm. Các nghiên cứu lâm sàng đã chứng minh có sự giảm độ nhạy cảm với tín hiệu khứu giác rõ rệt trên bệnh nhân trầm cảm, mức độ giảm liên quan đến mức độ nghiêm trọng của triệu chứng. Loại bỏ khứu giác ở động vật gây ra các thay đổi về thần kinh, sinh lý, nội tiết và hành vi, tương tự như các triệu chứng ở bệnh nhân bị trầm cảm nặng [98]. Chuột cống bị loại bỏ thùy khứu giác biểu hiện nhiều thay đổi hành vi bao gồm trạng thái kích thích, hiếu động và

nồng độ corticosteroid cao trong máu, đồng thời giảm khả năng học trốn thoát. Chuột OBX cũng 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) [97]. Ngoài ra, những thay đổi hành vi trên chuột nhắt OBX như vận động quá mức và chậm tăng cân, được cho là liên quan tới trạng thái trầm cảm, cũng đã được ghi nhận [121]. Điều trị bằng các thuốc chống trầm cảm có thể cải thiện hành vi giống trầm cảm của chuột OBX [97]. Đồng thời, một loạt ảnh hưởng của OBX đến cấu trúc và chức năng tại các vùng não đã được phát hiện bao gồm thay đổi cường độ tín hiệu ở vỏ não, hồi hải mã, vùng hạch. Những thay đổi này phù hợp với các báo cáo trên bệnh nhân trầm cảm như giảm khối lượng thùy trán, vùng hạch cũng như có những tổn thương ở thùy trán và hạch nền [122].

Việc phẫu thuật loại bỏ khứu giác cũng tạo ra những thay đổi ở cấp độ tế bào. Ví dụ, số lượng khớp thần kinh, đuôi gai và sợi trục giảm đi ở chuột OBX, lượng serotonin và 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), chất chuyển hóa chính của serotonin) ở hồi hải mã, vỏ não trước và vùng dưới đồi cũng giảm đáng kể và các phương pháp điều trị chống trầm cảm mạn tính có thể đảo ngược sự thay đổi nồng độ serotonin và 5-HIAA. Tương tự, có sự suy giảm chức năng chuyển hóa rõ rệt của dopamin (DA) vùng dưới đồi cũng như mức độ neuropeptid Y (neuropeptid 36 acid amin có nhiều nhất trong hệ thần kinh trung ương, có tác dụng giảm lo lắng, stress), cholin acetyltransferase (ChAT), norepinephrin và glutamat ở chuột loại bỏ thùy khứu giác. Tăng mức độ BDNF ở vùng hồi hải mã (+108%) và vỏ não trước (+48%) 16 ngày sau khi loại bỏ khứu giác ở chuột cũng đã được báo cáo [121].

Như vậy phẫu thuật loại bỏ thùy khứu giác trên chuột nhắt có thể coi là một mô hình động vật liên quan đến rối loạn chức năng hệ monoaminergic rất hữu ích để nghiên cứu sinh học thần kinh của trầm cảm và cơ chế tác dụng của các chất chống trầm cảm.

1.2.2.3. Mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (unpredictable chronic mild stress, UCMS)

Mô hình UCMS đầu tiên được phát triển bởi Katz và cộng sự năm 1981 [123]. Sau đó, mô hình đã được cải tiến bởi phòng thí nghiệm Willner năm 1987, dựa trên hai chiến lược: một là giảm cường độ của yếu tố gây căng thẳng (stress nhẹ) và hai là giới thiệu "anhedonia" (tình trạng thiếu hoàn toàn niềm vui hoặc mất nhu cầu trải nghiệm và tận hưởng cuộc sống) làm tiêu chuẩn thẩm định [124]. Mức độ ưa thích saccharose và

saccharin là thử nghiệm chính được sử dụng để đánh giá chứng anhedonia do UCMS. Các thước đo kết quả đáng chú ý khác bao gồm thử nghiệm treo đuôi (tail suspension test, TST), thử nghiệm bơi cưỡng bức (forced swimming test, FST), thử nghiệm môi trường mở (open field test, OFT), thử nghiệm mê cung chữ thập nâng cao (the elevated plus maze, EPM)… Điểm quan trọng nhất của mô hình UCMS là phát triển lâu dài trạng thái trầm cảm đáp ứng với các kích thích stress nhẹ 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,… [59].

Đối với sinh học thần kinh, stress cấp tính kích hoạt trục dưới đồi - tuyến yên - tuyến thượng thận (trục HPA) và do đó làm tăng glucocorticoid trong máu. Mức độ cao của glucocorticoid có thể dẫn đến teo và chết tế bào (apoptosis) ở vùng vỏ não trước và vùng đồi thị [125]. UCMS gây giảm mức độ biểu hiện của yếu tố tăng trưởng tế bào thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) mRNA, protein liên kết yếu tố đáp ứng AMP vòng (CREB) và dạng phosphoryl hóa của thụ thể N-methyl-D-aspartat trên tiểu đơn vị NR1, protein tín hiệu liên quan đến tính mềm dẻo synap. Ngoài ra, UCMS cũng làm giảm các tế bào dương tính với doublecortin ở vùng hồi răng hồi hải mã [73].

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.

1.3. Hương nhu tía

1.3.1. Tên khoa học và vùng phân bố

Hương nhu tía hay é tía, é đỏ, é rừng (*Ocimum sanctum* L. hoặc *Ocimum tenuiflorum* L.) là loài nổi bật nhất trong 4 loài thuộc chi *Ocimum,* tên nước ngoài là Monk’s basil, sacred basil, holy basil, rough basil, tusil..., vốn là cây cổ nhiệt đới Châu Á, được trồng rải rác ở Ấn Độ, Trung Quốc, Lào, Thái Lan, Malaysia và một số nước Ả Rập cũng như ở Úc, một số nước Tây Phi để làm thuốc và làm rau gia vị. Ở Việt Nam, hương nhu tía phân bố từ Hòa Bình, Bắc Giang, Hà Nội, Ninh Bình vào Khánh Hòa, Ninh Thuận, thành phố Hồ Chí Minh, An Giang và được trồng ở nhiều nơi [126].

1.3.2. Đặc điểm hình thái

Hương nhu tía là loài cây nhỏ, thân thẳng, cao 0,5 – 1m, toàn cây phủ lông trắng

xanh hoặc tía, có mùi thơm tinh dầu, sống hàng năm hay nhiều năm. Lá hình mác hoặc thuôn dài, mép răng cưa, hai mặt màu tím có lông mềm, mọc đối chéo chữ thập, cuống dài [127] *(Hình 1.2.)*.

Hình 1.2. *Hương nhu tía (Ocimum sanctum L.) trồng ở Trung tâm nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội, Viện dược liệu*

1.3.3. Bộ phận dùng

Hầu như các bộ phận của hương nhu tía đều được sử dụng làm dược liệu, trong đó bao gồm cả thân, cành, hoa và lá. Thông thường, hương nhu tía được thu hoạch khi cây đang ra hoa, từ tháng 5 – tháng 10 hằng năm. Sau khi thu hái, người ta đem dược liệu đi rửa sạch, cắt thành từng đoạn khoảng 3 – 4cm, phơi dưới bóng râm cho đến khi khô [127].

1.3.4. Thành phần hóa học

Các đặc tính dinh dưỡng và dược lý của hương nhu tía ở dạng tự nhiên, như đã được sử dụng theo truyền thống, là kết quả của sự tương tác hiệp đồng nhiều hoạt chất khác nhau. Do thành phần hóa học, đặc điểm thực vật và sinh hóa phức tạp, cho đến nay, khoa học hiện đại vẫn chưa tiêu chuẩn hóa được hương nhu tía [128].

Tinh dầu dễ bay hơi, chủ yếu tập trung ở lá là thành phần đáng chú ý và có giá trị cao trong cây hương nhu tía. Phần trên mặt đất chứa tinh dầu, hàm lượng tinh dầu khi cây bắt đầu có hoa đến lúc ra hoa là 1,08 – 1,62%. Dược điển Việt Nam V quy định hàm lượng tinh dầu không dưới 0,5% (tính theo dược liệu khô tuyệt đối) [129]. Thành phần tinh dầu trong hương nhu tía ở Việt Nam chủ yếu là phenol, terpen và aldehyd, trong đó chiếm tới 71% là eugenol, euginal (còn gọi là acid eugenic), ngoài ra còn có methyleugenol (khoảng 20%), carvacrol, linalool, limatrol, caryophyllen, methyl

carvicol, α-pinen, sabinen, β-pinen, mycren, camphor, borneol, citral, terpinen,…

Các hoạt chất phenolic sau đây đã được xác định, thể hiện hoạt động chống oxy hóa và chống viêm, là acid rosmarinic, apigenin, luteolin, apigenin-7-glucoronid, luteolin-7-glucoronid, cirsimaritin và isothymonin, acid gallic, acid gallic methylester, acid gallic ethylester, acid protocatechic [128, 130].

Hương nhu tía được biết đến là một dược liệu làm tăng sức chịu đựng về thể chất nhưng lại không chứa caffein hoặc các chất kích thích khác. Thân và lá của hương nhu tía có chứa nhiều saponin, flavonoid, triterpenoids, alcaloid, glycosid và tannin.

Hai flavonoid tan trong nước: orientin và vicenin, đã được chứng minh là có tác dụng bảo vệ chống lại tổn thương nhiễm sắc thể do bức xạ trong tế bào lympho máu ở người [131].

Acid ursolic và đồng phân cấu tạo của nó, acid oleanolic là thành phần chính và quan trọng chiếm hàm lượng cao trong hương nhu tía thuộc nhóm saponin triterpenoid. Theo USP 36, lá hương nhu tía có ≥ 0,5% triterpen (acid ursolic và acid oleanolic); sản phẩm từ hương nhu tía có ≥ 2% triterpen [132].

Năm 2008, Silva và cộng sự đã tiến hành định lượng acid ursolic trong lá của 8 loài thuộc chi *Ocimum L.* gồm: *O.americanum, O. basilicum, O. basilicum var purpurascens, O. basilicum var minimum, O. grastissimum, O. micranthum, O. selloi, và O. sanctum* bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography – HPLC). Kết quả cho thấy hương nhu tía *O. sanctum* có hàm lượng acid ursolic trong lá cao nhất (lên tới 2,02%) [133].

1.3.5. Công dụng

1.3.5.1. Y học cổ truyền thế giới

Hương nhu tía đã được sử dụng từ hàng nghìn năm trong y học cổ truyền Ấn Độ với đặc tính chữa bệnh đa dạng. Sử dụng hương nhu tía hàng ngày được cho là để ngăn ngừa bệnh tật, tăng cường sức khỏe và tuổi thọ nói chung. Hương nhu tía cũng được tin là mang lại nước da sáng, giọng nói ngọt ngào, bồi dưỡng vẻ đẹp, trí thông minh và giúp cân bằng các quá trình khác nhau trong cơ thể, hữu ích cho việc thích nghi với stress, tăng sức chịu đựng và giữ được cảm xúc bình tĩnh. Theo truyền thống, hương nhu tía được dùng theo nhiều cách như trà thảo dược, phơi khô hoặc lá tươi. Dịch chiết hương nhu tía được sử dụng trong các phương thuốc Ayurvedic cho cảm lạnh thông thường, đau đầu, rối loạn dạ dày, viêm, bệnh tim, các trường hợp ngộ độc khác nhau và sốt rét.

Trong nhiều thế kỷ, lá khô của hương nhu tía đã được trộn với các loại ngũ cốc để xua đuổi côn trùng. Nước hãm của lá hương nhu tía được dùng chữa đau dạ dày ở trẻ em và sốt rét. Dịch ép từ lá chữa nôn mửa và giun móc vì trong dược liệu có thymol, phối hợp với mật ong gừng và dịch ép tỏi làm thuốc lợi đờm, chữa viêm phế quản, ho ở trẻ em. Dịch ép từ lá còn chữa rắn độc cắn [130].

Ở Myanma, nước sắc của lá hương nhu tía chữa đầy hơi và tiêu chảy ở trẻ em, hạt chữa bệnh thận, nước hãm từ lá chữa viêm đường hô hấp, rối loạn kinh nguyệt [127].

1.3.5.2. Y học cổ truyền Việt Nam

Tính vị, công năng

Hương nhu tía có vị cay, mùi thơm, tính ấm, quy vào hai kinh: phế, vị, có tác dụng phát hãn (làm ra mồ hôi), thanh nhiệt, tán thấp, hành thủy, giảm đau [127].

Công dụng

Hương nhu tía được dùng làm thuốc trong phạm vi kinh nghiệm dân gian để hạ sốt, chữa cảm, nhất là cảm nắng, say nắng, nhức đầu, đau bụng, đi ngoài, nôn mửa, phù thũng. Ngày dùng 6-12g dưới dạng thuốc sắc hoặc thuốc hãm. Eugenol, chiết từ hương nhu tía, được dùng trong nha khoa và là nguyên liệu để tổng hợp vanillin.

Bài thuốc có hương nhu [134]

1. Chữa cảm sốt, nhức đầu, đau bụng, chân tay lạnh: Hương nhu tía 500g, hậu phác (tẩm gừng nướng) 200g, bạch biển đậu (sao) 2000g. Tất cả tán nhỏ, trộn đều, mỗi lần uống 10g có khi đến 20g với nước sôi để nguội.
2. Chữa cảm, làm ra mồ hôi, hạ sốt: Hương nhu, hoắc hương, bạc hà, sả, tía tô, lá bưởi, lá chanh mỗi thứ 10g. Tất cả rửa sạch, đun sôi dùng xông hơi (Nồi nước xông).
3. Phòng, chữa cảm nắng, say nắng: Lá hương nhu 32g, hạt đậu ván 32g, củ sắn dây 24g, gừng sống 12g. Các vị phơi khô, tán nhỏ, rây bột mịn. Mỗi lần người lớn dùng 16g, trẻ em 8g; hãm với nước sôi, gạn uống (kinh nghiệm của Viện Y học cổ truyền).
4. Chữa trẻ em chậm mọc tóc: Hương nhu sắc đặc, hòa với mỡ lợn bôi hàng ngày (Tuệ Tĩnh, Nam Dược thần hiệu).
5. Chữa hôi miệng: Hương nhu 10g, sắc với 200 ml nước, dùng súc miệng và ngậm.

1.3.6. Tác dụng bảo vệ thần kinh và cải thiện trí nhớ

Tác dụng bảo vệ thần kinh và cải thiện trí nhớ của cao chiết hương nhu tía đã thu hút sự chú ý của các nhà khoa học trong và ngoài nước trong nhiều năm gần đây. Có thể kể đến một số nghiên cứu về tác dụng cải thiện trí nhớ và nhận thức của hương nhu tía

như sau:

Yanpallewar và cộng sự đã sử dụng mô hình gây thiếu máu não trên chuột nhắt, chứng minh rằng dịch chiết cồn từ lá hương nhu tía giúp làm giảm peroxy hóa lipid, cải thiện hoạt tính chống oxy hóa của enzym SOD (superoxid dismutase) và các chất nội sinh nhóm thiol như TSH (total sulfhydryl) cùng những biến đổi về mô học gây ra do thiếu máu não - một trong những nguyên nhân gây suy giảm trí nhớ [135]. Nghiên cứu của Ahmad và cộng sự (2012) cũng chứng minh rằng chuột Wistar đực bị gây tắc động mạch não giữa (middle cerebral artery occlusion - MCAO), được uống hương nhu tía 200 mg/kg/ngày trong 15 ngày đã cải thiện đáng kể tình trạng giảm enzym chống oxy hóa, thâm hụt thần kinh và mất tế bào thần kinh sau chấn thương tái tưới máu não/thiếu máu cục bộ gây bại não khu trú. Do đó, điều trị trước với hương nhu tía có thể làm giảm những tổn thương gây ra bởi các gốc tự do, và do đó có thể được sử dụng để ngăn chặn những thay đổi hành vi, sinh hóa và mô bệnh học tiếp theo xảy ra trong quá trình thiếu máu não [10]. Nghiên cứu tập trung vào tác dụng cải thiện trí nhớ của hương nhu tía thông qua cơ chế chống oxy hóa, giảm gốc tự do.

Joshi và Parle (2006) đã đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ của dịch chiết nước hương nhu tía trên mô hình chuột gây suy giảm trí nhớ bằng scopolamin (0,4 mg/kg), diazepam (1 mg/kg) và do lão hóa. Thử nghiệm hành vi được sử dụng trong nghiên cứu này là mê lộ chữ thập nâng cao (Elevated plus maze) và trốn thoát thụ động (passive avoidance). Kết quả cho thấy hương nhu tía có thể có tiềm năng là một tác nhân nootropic (chất cải thiện khả năng hoạt động của hệ thần kinh trung ương) và mang lại lợi ích trong điều trị các rối loạn nhận thức như chứng mất trí và bệnh Alzheimer [11]. Nghiên cứu tập trung vào tác dụng cải thiện trí nhớ của hương nhu tía thông qua cơ chế tăng cường hoạt động của hệ thần kinh trung ương.

Nghiên cứu của Giridharan và cộng sự cũng đã chứng minh hương nhu tía hữu ích cho việc điều chỉnh các rối loạn chức năng nhận thức do trên các mô hình gây ra ở chuột. Dịch chiết nước (300 và 500 mg/kg) và dịch chiết cồn (300 và 500 mg/kg) của lá cây hương nhu tía, đường uống có khả năng chống suy giảm trí nhớ, ức chế acetylcholinesterase và làm tăng cường miễn dịch trên chuột cống gây mất trí nhớ bằng 3 mô hình sốc điện (maximal electroshock MES), atropin (thuốc kháng acetyl cholin) và cyclosporine (thuốc ức chế miễn dịch) liều cao. Thuốc chứng dương được sử dụng là piracetam 250mg/kg, tiêm phúc mạc. Đánh giá hành vi của động vật bằng thử nghiệm

trốn thoát thụ động (passive avoidance task – nhằm kiểm tra trí nhớ dài hạn). Sự cải thiện chức năng miễn dịch có liên quan chặt chẽ đến việc cải thiện suy giảm liên quan đến học tập và trí nhớ. Miễn dịch qua trung gian tế bào được đánh giá định lượng bằng xét nghiệm độ nhạy cảm của da với dinitrochlorobenzen (DNCB), theo dõi vùng da sau tiếp xúc 24 giờ và ghi nhận bất kì kích ứng hay ban đỏ, kết quả cho thấy hương nhu tía có thể gây kích thích hoạt động miễn dịch [136]. Nghiên cứu tập trung vào tác dụng cải thiện trí nhớ của hương nhu tía thông qua cơ chế ức chế acetylcholinesterase và tăng cường miễn dịch.

Nghiên cứu của Kusindarta và cộng sự (2016) được thực hiện để xác định biểu hiện của enzym tổng hợp acetylcholin (cholin acetyltransferase, ChAT) trong tế bào nội mô mạch máu não người (human cerebral microvascular endothelial cells - HCMECs) và làm rõ khả năng kích thích sự hiện diện của ChAT trong tế bào nội môi mạch máu não già hóa của chiết xuất cồn hương nhu tía. Kết quả chỉ ra rằng HCMEC là một trong những tế bào không phải cholinergic sản xuất được ChAT. Sử dụng chiết xuất cồn hương nhu tía có thể kích thích và khôi phục biểu hiện của ChAT bị suy giảm trên các tế bào HCMEC già hóa, do đó hương nhu tía có thể giúp bảo vệ thần kinh và sản xuất acetylcholin [13]. Nghiên cứu tập trung vào tác dụng cải thiện trí nhớ của hương nhu tía trên *in vitro* thông qua cơ chế tăng cường cholin acetyltransferase.

Một thử nghiệm lâm sàng có đối chứng với giả dược (placebo) được tiến hành bởi Sampath và cộng sự, cho thấy viên nang chứa 300mg cao chiết cồn lá hương nhu tía (OS) uống mỗi ngày trong 30 ngày, có tác động tích cực lên các thông số nhận thức cụ thể ở những người tình nguyện trưởng thành khỏe mạnh. Đây là một trong số rất ít nghiên cứu lâm sàng để ghi nhận những tác dụng bảo vệ thần kinh, tăng cường nhận thức và giảm stress của hương nhu tía [12].

Ở Việt Nam, năm 2011 tác giả Trần Đình Năng và cộng sự đã khảo sát khả năng cải thiện trí nhớ của cao chiết lá hương nhu tía với các thí nghiệm được thực hiện trên mô hình gây suy giảm trí nhớ bởi trimethyltin ở chuột. Đánh giá trí nhớ dài hạn của động vật bằng thử nghiệm mê lộ nước Morris (Morris water maze, MWM), đồng thời đánh giá các chỉ số hóa sinh (acetylcholin và acetylcholinesterase). Các kết quả cho thấy, với liều dùng 50 và 100 mg/kg, cao chiết toàn phần lá hương nhu tía có tác dụng cải thiện trí nhớ trên thử nghiệm MWM. Tác dụng này có liên quan đến hệ cholinergic, làm tăng hàm lượng acetylcholin và giảm hoạt tính acetylcholinesterase trong vùng hồi hải

mã não chuột [14]. Đây cũng là một trong số ít các công trình đã công bố ở Việt Nam về tác dụng dược lý cao chiết toàn phần lá hương nhu tía.

Tuy nhiên, hiện tại ở trong nước cũng như trên thế giới, chưa có nghiên cứu nào được thực hiện một cách toàn diện để đánh giá tác dụng và cơ chế tác dụng bảo vệ thần kinh, cải thiện trí nhớ, cũng như làm sáng tỏ thành phần hoạt chất chính đóng góp vào tác dụng này của hương nhu tía.

1.3.7. Tác dụng chống trầm cảm, giải lo âu

Hiện nay trên thị trường Việt Nam đã có một sản phẩm Viên uống Hush & Hush Mind your mind với tác dụng giảm stress, cải thiện giấc ngủ, trong thành phần có chứa lá hương nhu. Một số nghiên cứu về tác dụng chống trầm cảm, lo âu của cây hương nhu tía đã được công bố bao gồm:

Nghiên cứu của Jothie Richard và cộng sự đã đánh giá tiềm năng chống stress của hương nhu tía trên mô hình stress biến thiên mạn tính (chronic variable stress - CVS). Chuột CVS được điều trị bằng cao OS tiêu chuẩn hóa 200 mg/kg trong 16 ngày. Vào các ngày 4, 8, 12 và 16, trọng lượng cơ thể và thời gian bất động trong thử nghiệm bơi cưỡng bức được đánh giá. OS làm tăng đáng kể trọng lượng cơ thể và giảm thời gian bất động của chuột CVS. Hơn nữa, OS và acid ursolic phân lập từ nó có tác dụng ức chế giải phóng cortisol và thể hiện hoạt tính đối kháng thụ thể typ 1 của hormon giải phóng corticotropin (corticotropin-releasing hormone receptor type 1, CRHR1) đáng kể trên thử nghiệm tế bào (cell assay) *in vitro* và ức chế hoạt động 11β-hydroxysteroid dehydrogenase loại 1 (11β-HSD1), catechol-*O*-methyltransferase (COMT) trên thử nghiệm không có tế bào (cell-free assay) *in vitro*. Nghiên cứu không dùng thuốc chứng dương và cơ chế tác dụng của OS chỉ được đánh giá trên *in vitro* [15].

Trong một nghiên cứu khác của Bathala và cộng sự, tác dụng giải lo âu của viên nang chứa 250 mg bột hương nhu tía, liều dùng 100 mg/kg đã được đánh giá trên mô hình stress kiềm chế (restraint stress, RS) ở chuột cống albino đực chủng Wistar, sử dụng thử nghiệm bơi cưỡng bức (FST) và thử nghiệm rotarod (nhằm đánh giá khả năng cân bằng và phối hợp vận động của động vật trên thanh quay; thông số đánh giá là thời gian con vật bám trụ trên thanh quay mà không bị rơi xuống), thuốc chứng dương là alprazolam (nhóm benzodiazepin) liều 0,25 mg/kg thể trọng. Kết quả cho thấy hương nhu tía và alprazolam làm giảm thời gian bất động ở chuột RS, chứng tỏ hiệu quả chống stress của hương nhu tía, có thể do tác động lên thần kinh trung ương thông qua hệ

dopaminergic. Với thử nghiệm rotarod, hương nhu tía cũng cải thiện sự suy giảm hiệu suất trên rotarod của chuột RS, mặc dù yếu hơn alprazolam. Như vậy hương nhu tía có tác dụng chống stress đáng kể nhưng yếu hơn thuốc chứng dương alprazolam [137]. Đối tượng của nghiên cứu là bột dược liệu và cơ chế tác dụng giải lo âu của hương nhu tía chưa được làm rõ.

Trong nghiên cứu của Chatterjee M và cộng sự, dịch chiết cồn của lá hương nhu tía với 4 mức liều 25, 50, 100, 200 mg/kg đã được đánh giá tác dụng giải lo âu trên thử nghiệm không gian mở (open field), thử nghiệm hộp sáng tối, thử nghiệm mê lộ chữ thập nâng cao (elevated plus maze test) và thử nghiệm holeboard 16 lỗ; tác dụng chống trầm cảm trên mô hình trầm cảm cấp tính treo đuôi (TST) và bơi cưỡng bức (FST), sử dụng chuột nhắt trắng *Swiss albino*. Hành vi của động vật được giám sát thông qua thiết bị hoạt động động vật Digiscan. Thử nghiệm rotarod cũng được sử dụng để đánh giá khiếm khuyết trong phối hợp vận động của chuột. Thuốc chứng dương cho thử nghiệm chống trầm cảm (gồm FST, open field, TST) là imipramin (IMP) liều 60 mg/kg, đường uống; thuốc chứng dương cho thử nghiệm chống lo âu (TST) là diazepam (DZP) liều 1,5 mg/kg, đường uống. Có thể thấy hương nhu tía có tác dụng giải lo âu và chống trầm cảm ở cùng một liều 50 mg/kg, tuy nhiên tác dụng yếu hơn thuốc chứng dương. Hương nhu tía không gây ra sự thay đổi phối hợp vận động của chuột trong thử nghiệm rotarod [138]. Nghiên cứu chỉ sử dụng mô hình gây lo âu và trầm cảm cấp tính, cơ chế và thành phần hóa học có tác dụng của hương nhu tía vẫn chưa được chỉ ra.

Tác dụng chống trầm cảm, lo âu của chiết xuất cồn hương nhu tía cũng được chứng minh trên mô hình chuột gây stress bởi tiếng ồn (acute noise stress model) (10 kHz: 100 dB, trong 30 phút) bằng cách định lượng acetylcholin và hoạt độ acetylcholinesterase ở các vùng khác nhau của não chuột. Ở chuột phơi nhiễm với tiếng ồn đã làm giảm đáng kể nồng độ acetylcholin và tăng hoạt động của acetylcholinesterase ở vỏ não, vân não, vùng dưới đồi và vùng đồi thị của não. Cao chiết ethanol 70% của lá hương nhu tía với liều 100 mg/kg, đường uống, dùng 7 ngày đã ngăn chặn sự thay đổi hai thông số cholinergic này trong cả bốn khu vực của não trên động vật phơi nhiễm với tiếng ồn. Kết quả nghiên cứu chỉ ra tính chất bảo vệ các mô não trước tác động có hại gây stress bởi tiếng ồn của hương nhu tía. Từ những quan sát này, có thể suy đoán rằng hệ thần kinh trung ương là một trong những đích tác dụng quan trọng của hương nhu tía [139]. Nghiên cứu thực hiện trên mô hình stress cấp tính và thành phần hóa học tham

gia vào tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía chưa được đề cập.

Tại Việt Nam, tác giả Lê Thị Xoan và cộng sự cũng chứng minh rằng chuột OBX (chuột gây trầm cảm bằng cách loại bỏ thùy khứu giác) uống cao chiết cồn từ lá hương nhu tía với liều 400 mg/kg có hành vi giảm lo âu trên thử nghiệm không gian mở (open field) và giảm trầm cảm trên thử nghiệm treo đuôi chuột (TST), khi so sánh với chuột OBX không được điều trị [16]. Tuy nhiên, nghiên cứu mới dừng lại ở việc sàng lọc tác dụng của hương nhu tía.

Ở một nghiên cứu dược lý sơ bộ của Gupta và cộng sự (2007), tác dụng chống stress của cao OS (100-400 mg/kg, đường uống) và phân đoạn chiết n-butanol (200 mg/kg, đường uống) của hương nhu tía, đã được xác nhận khi đánh giá trên mô hình stress cấp tính (acute stress –AS) và mô hình stress mạn tính không dự đoán trước (chronic unpredictable stress – CUS). Hơn thế nữa, ba hợp chất mới, ocimumosid A (1) và B (2) (nhóm glycoglycerolipids) và ocimarin (3) (nhóm curmarin), đã được phân lập từ phân đoạn n-butanol cùng với 10 chất đã biết. Cấu trúc của các hợp chất mới được xác định trên cơ sở phân tích phổ 1D và 2D NMR. Các hợp chất mới (1 đến 3) và các hợp chất 4 (acid apigenin-7-*O*-*β*-D-glucuronid) và 5 (4-allyl-1-*O*-*β*-D-glucopyronoxyl-2-hydroxybenzen) đã biết được sàng lọc với liều 40 mg/kg thể trọng, để thay đổi sinh hóa do stress cấp tính ở chuột đực *Sprague Daw Dawley*. Hợp chất 1, 2, 5 cho thấy tác dụng chống trầm cảm thông qua bình thường hóa hiện tượng tăng đường huyết, corticosterone huyết tương, creatin kinase huyết tương và phì đại tuyến thượng thận. Ngược lại, hợp chất 3 và 4 không thể hiện bất kỳ hiệu quả nào trên các thông số này [140]. Ahmad và cộng sự năm 2012 đã thực hiện nghiên cứu tiếp theo để đánh giá cơ chế tác dụng của Ocimarin, Ocimumosid A và B đối với những thay đổi do mô hình stress kiềm chế cấp tính gây ra (RS) trên hệ thần kinh trung ương ở chuột cống *Sprague Dawley*. Các vùng não được lựa chọn trong nghiên cứu là vỏ não trước, vùng vân và hồi hải mã, được đánh giá bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao – sắc ký rây phân tử (HPLC-EC, high performan liquid chromatography – exclusion chromatography) và phép đo quang phổ tương ứng; vì 3 vùng não này được kết nối phức tạp thông qua các hệ monoaminergic, đóng vai trò quan trọng trong các phản ứng stress. Ocimumosid A và B (40 mg/kg, đường uống) trong thời gian 3 ngày đã ngăn chặn các thay đổi do RS gây ra với hiệu quả tương tự như chất chống stress tiêu chuẩn (Nhân sâm Mỹ - *Panax quinquefolium*; 100 mg/kg, đường uống) và chất chống oxy hóa (Melatonin; 20 mg/kg

ip), trong khi, Ocimarin không có tác dụng điều chỉnh những thay đổi này. Như vậy, những phát hiện này cho thấy tiềm năng chống stress của Ocimumosid A và B liên quan đến tác dụng đồng thời của chúng trên hệ monoaminergic và chống oxy hóa thần kinh trung ương [141]. Hai nghiên cứu đã chỉ ra tác dụng chống stress của OS và chất phân lập tương đương với thuốc chứng dương là một dược liệu khác.

Trong nghiên cứu của Machado và cộng sự, acid ursolic – một thành phần có trong hương nhu tía, là một hợp chất triterpenoid đã thể hiện tác dụng chống trầm cảm ở chuột nhắt tương tự thuốc chứng dương trên hai thử nghiệm: treo đuôi (TST) với liều 0,01 và 0,1 mg/kg, thuốc chứng dương fluoxetin (10mg/kg, uống), imipramin (1mg/kg, uống); và bơi cưỡng bức (FST) với liều 10 mg/kg, thuốc chứng dương bupropion (10 mg/kg, uống). Tuy nhiên tác dụng này của acid ursolic (0,1 mg/kg, uống) trong TST bị mất đi khi sử dụng các chất sau đây trên chuột: SCH23390 (0,05 mg/kg, tiêm dưới da, chất đối kháng thụ thể dopamin D (1)) và sulpirid (50 mg/kg, tiêm phúc mạc, một chất đối kháng thụ thể dopamin D (2)). Hơn nữa, khi sử dụng một liều nhỏ của acid ursolic (0,001 mg/kg, uống) kết hợp với liều nhỏ SKF38393 (0,1 mg/kg, tiêm dưới da, một chất chủ vận thụ thể dopamin D (1)), apomorphin (0,5 μg/kg, tiêm phúc mạc, một chất chủ vận thụ thể ưu tiên dopamin D (2)) hoặc bupropion (1 mg/kg, tiêm phúc mạc, một chất ức chế tái hấp thu kép dopamin/norepinephrin) vẫn có tác dụng làm giảm thời gian bất động trong TST so với chỉ dùng thuốc đơn lẻ. Những kết quả này chỉ ra rằng tác dụng chống trầm cảm của acid ursolic trong TST có khả năng thông qua mối tương tác với hệ dopaminergic bằng cách kích hoạt thụ thể dopamine D (1) và D (2) [142]. Nghiên cứu chỉ dùng mô hình stress cấp tính, các lô chuột điều trị bằng acid ursolic không được tiến hành thử nghiệm TST đồng thời với chứng dương. Ngược lại, trong một công bố khác, acid ursolic được phân lập từ cây *Salvia elegans* Vahl ở Mexico không thể hiện tác dụng làm giảm thời gian bất động khi cũng được đánh giá bằng mô hình FST trên chuột nhắt đực chủng ICR,với liều 15 – 30 mg/kg thể trọng. Dường như trong nghiên cứu này, acid ursolic không chịu trách nhiệm cho tác dụng chống trầm cảm của cây *Salvia elegans* Vahl [143].

Như vậy, có thể thấy tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía cần được đánh giá thêm trên mô hình trầm cảm mạn tính với chứng dương là một thuốc chống trầm cảm thực sự; cũng như thành phần hóa học đóng vai trò quan trọng trong tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía vẫn còn nhiều tranh cãi và cần được làm sáng tỏ.

Tóm lại, những nghiên cứu về tác dụng của hương nhu tía trên nhận thức, trí nhớ và chứng trầm cảm này là cơ sở cho việc nghiên cứu một cách hệ thống tác dụng dược lý của hương nhu tía với liều dùng thích hợp, tìm ra phân đoạn cao chiết chiếm ưu thế và các thành phần hoạt chất chính có tác dụng, đồng thời làm sáng tỏ cơ chế cải thiện trí nhớ và chống trầm cảm của hương nhu tía.

1.3.8. Một số tác dụng sinh học khác

1.3.8.1. Tác dụng bảo vệ cơ thể, thải độc và chống oxy hóa

Nhiều lợi ích sinh học của hương nhu tía có thể được quy cho khả năng hỗ trợ quá trình thải độc của cơ thể và bảo vệ cơ thể khỏi tác hại của độc tố, do thành phần chiếm tỷ lệ cao các hợp chất phenolic và đặc tính chống oxy hóa. Các nghiên cứu tiền lâm sàng đã chỉ ra rằng hương nhu tía bảo vệ cơ thể chống lại hóa chất độc hại gây tổn thương bằng cách tăng mức độ các phân tử chống oxy hóa như glutathion và tăng cường hoạt động của các enzym chống oxy hóa như superoxid dismutase và catalase, bảo vệ các bào quan và màng tế bào bằng cách làm sạch các gốc tự do có hại do các tác nhân độc hại sinh ra [144, 145].

Shah và Verma (2012) đã chỉ ra tiềm năng bảo vệ gan của chiết xuất nước hương nhu tía (liều 100, 200 và 300 mg/kg/ngày) chống lại độc tính của butyl p-hydroxybenzoic (butylparaben) gây ra ở chuột, thông qua cải thiện tình trạng suy giảm nồng độ các chất chống oxy hóa không phải enzym (glutathion, acid ascorbic) và các enzym chống oxy hóa (superoxid dismutase, catalase, glutathion peroxidase, glutathion reductase và glutathion transferase) [146]. Ngoài ra, hương nhu tía còn tăng cường hoạt động của các enzym giải độc gan chẳng hạn như các enzym cytochrom P450, làm mất hoạt tính hóa chất độc hại và cho phép chúng được bài tiết một cách an toàn [147].

Những tác dụng tiềm năng này của hương nhu tía là rất hữu ích để bảo vệ cơ thể chống lại các độc tố tự nhiên tự sản xuất cũng như chống lại hàng loạt các chất ô nhiễm, thuốc trừ sâu, dược phẩm, kim loại nặng, phóng xạ và các loại chất độc công nghiệp khác được tạo ra từ hoạt động của con người [148].

1.3.8.2. Tác dụng hạ đường huyết

Trong nghiên cứu của Narendhirakannan và cộng sự, chuột bị gây bệnh đái tháo đường bằng cách tiêm streptozocin (STZ - 55 mg/kg thể trọng, i.p.) để phá hủy tế bào β đảo tụy. Sau 1 tuần gây bệnh, đường huyết của chuột trên 250 mg/dL được coi là bị bệnh đái tháo đường và được sử dụng để thử nghiệm. Kết quả cho thấy dịch chiết ethanol của

lá hương nhu tía với liều 200 mg/kg mỗi ngày, trong 30 ngày, làm giảm đáng kể đường huyết, quá trình glycosyl hóa (tạo HbA1c) và urê; cùng với sự gia tăng đồng thời glycogen, hemoglobin và protein ở chuột bị tiểu đường. Dịch chiết này cũng dẫn đến sự gia tăng nồng độ insulin và tăng dung nạp glucose [149].

Hannan và cộng sự đã chứng minh rằng dịch chiết ethanol OS làm tăng đáng kể việc bài tiết insulin của tuyến tụy, có thể do hoạt động nội bào như kích thích adenylate cyclase/cAMP hoặc con đường phosphatidylinositol, hoặc tác động trực tiếp lên quá trình xuất bào [150]. Ghosap và cộng sự làm sáng tỏ cơ chế có thể đối với tác dụng hạ glucose máu của hương nhu tía ở chuột đực bị đái tháo đường gây bởi corticosteroid bao gồm làm giảm nồng độ trong huyết thanh của cả cortisol và glucose, cũng như tác dụng chống oxy hóa [151]. Hương nhu tía 200 mg/kg uống trong 30 ngày đã làm giảm nồng độ glucose huyết tương bằng cách điều chỉnh một phần hoạt động của đối với ba loại enzym chuyển hóa carbohydrat quan trọng là glucokinase (gk), hexokinase (hk) và phosphofructokinase (PFK); cùng với hàm lượng glycogen phụ thuộc insulin (cơ xương và gan) và insulin trong các mô độc lập (thận và não) trong nghiên cứu của Vats và cộng sự, trên mô hình bệnh đái tháo đường gây bởi streptozotocin (STZ, 65 mg/kg) trong 30 ngày ở chuột [135].

1.3.8.3. Tác dụng trên hệ tim mạch

Sharma và cộng sự đã báo cáo hương nhu tía 50 mg/kg có tác dụng trị liệu và phòng ngừa trong điều trị nhồi máu cơ tim (MI) trên mô hình chuột tiêm dưới da (sc) isoproterenol (ISO) liều 200 mg/kg; thông qua giảm đáng kể mức glutathion (GSH), superoxid dismutase (SOD) và LDH, ức chế quá trình peroxy hóa lipid do làm giảm các chất phản ứng acid thiobarbituric (TBARS) và hạn chế tổn thương mô bệnh học cơ tim [152]. Trong một nghiên cứu khác, hương nhu tía ở cả 2 liều 50 mg/kg và 100 mg/kg cho thấy tác dụng bảo vệ đáng kể chống lại hoại tử cơ tim do isoproterenol gây ra thông qua tăng cường chất chống oxy hóa SOD, GSH, GPx và catalase nội sinh [153].

Stress tâm lý gần đây đã được xác định là một yếu tố nguy cơ chính của các bệnh lý tim mạch. Tình trạng stress dẫn đến tăng giải phóng catecholamin và glucocorticoid bằng cách kích hoạt trục dưới đồi - thượng thận - tuyến yên (HPA) cũng như tăng giải phóng amino acid kích thích (excitatory amino acid - EAA) trong não. Do đó, trong nghiên cứu năm 2006 của Sood và cộng sự, chuột Wister đực bị gây stress kiềm chế mạn tính (chronic-resistant stress) 6 giờ/ngày trong 21 ngày; khi được uống dịch chiết

cồn hương nhu tía (100 mg/kg) đã ngăn chặn đáng kể tình trạng stress mạn tính, tăng mức độ cAMP huyết tương, làm gia tăng hoạt động của các chất chống oxy hóa như superoxid dismutase (SOD) và catalase của cơ tim. Ở lô chuột bệnh lý, hình ảnh trên kính hiển vi cho thấy sự phù cơ tim nhẹ trong khi lô chuột được điều trị bằng hương nhu tía cho hình ảnh cơ tim hoàn toàn bình thường [154].

1.3.8.4. Tác dụng chống ung thư và điều hòa miễn dịch

Nghiên cứu của Dhandayuthapani và cộng sự tập trung vào khả năng gây ra sự chết theo chu trình (apoptosis) của chiết xuất hương nhu tía trên tế bào ung thư tuyến tiền liệt. Với mục đích này, tế bào biểu mô tuyến tiền liệt bình thường của con người (Human normal prostate epithelial cells, HPrEC) và các tế bào ung thư tuyến tiền liệt (LN carcinoma of prostate, LNCaP) đã được điều trị với nồng độ khác nhau 50, 100, 150 và 200 µg/mL của chiết xuất ethanol 70% của hương nhu tía, sau 24 và 48 giờ thì thu mẫu tế bào. Kết quả thu được cho thấy, hương nhu tía có hiệu quả trong việc giảm khả năng sống của các tế bào LNCaP phụ thuộc vào liều lượng và thời gian trong khi các tế bào biểu mô tuyến tiền liệt bình thường của con người (HPrEC) được điều trị với hương nhu tía cùng liều lượng và thời gian hoàn toàn không bị ảnh hưởng. Hiệu quả của hương nhu tía gây ra apoptosis các tế bào LNCaP có thể thông qua kích hoạt caspase-9 và caspase-3 cuối cùng có thể dẫn đến phân mảnh DNA và chết tế bào [155].

1.3.8.5. Tác dụng cải thiện rối loạn lipid máu, thừa cân béo phì

Satapathy và cộng sự đã tiến hành thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên, có nhóm chứng, để nghiên cứu ảnh hưởng của hương nhu tía đến các thông số trao đổi chất và sinh hóa ở ba mươi đối tượng thừa cân/béo phì, được chia thành hai nhóm A và B. Nhóm A (n = 16) nhận được 250 mg viên nang hương nhu tía, ngày hai lần lúc đói trong 8 tuần và nhóm B (n = 14) không được can thiệp. Kết quả thu được cho thấy có sự cải thiện đáng kể các giá trị của triglycerid huyết thanh; LDL - lipoprotein (low density lipoprotein); HDL – lipoprotein (high density lipoprotein); VLDL- lipoprotein (very low density lipoprotein); chỉ số khối cơ thể (Body mass index, BMI); insulin huyết tương và kháng insulin đã được quan sát sau 8 tuần trong nhóm can thiệp điều trị bằng hương nhu tía nhưng không ảnh hưởng đến enzym gan SGOT và SGPT trong cả nhóm can thiệp và nhóm không can thiệp. Những quan sát này chỉ ra tác dụng có lợi của hương nhu tía đối với các thông số sinh hóa khác nhau ở những người trẻ thừa cân/béo phì [156].

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

2.1. Nguyên liệu, phương tiện nghiên cứu, địa điểm 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) *(Phụ lục 1)*.

2.1.2. Động vật thí nghiệm

- Chuột nhắt trắng *Swiss albino* 7-8 tuần tuổi, trọng lượng trung bình 28-30g (với mô hình chuột loại bỏ thùy khứu giác) và 5-6 tuần tuổi, trọng lượng trung bình 23-25g (với mô hình chuột gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước), giống đực, khỏe mạnh được cung cấp bởi Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

- Chuột sau khi mua về được làm quen với phòng chăn nuôi ít nhất 1 tuần trước khi bắt đầu thí nghiệm, trong điều kiện nhiệt độ 25 ± 1^{o}C, độ ẩm 65-75%, độ thông khí và ánh sáng thích hợp, chu kì sáng tối được duy trì 12 giờ (pha sáng: 7:00 – 19:00), được nuôi bằng thức ăn tiêu chuẩn do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp, thức ăn và nước uống tự do theo nhu cầu của chuột. Các thử nghiệm hành vi được tiến hành trong chu kỳ sáng từ 9:00 – 18:00.

- 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.

2.1.3. Hóa chất, thuốc thử

Một số hóa chất, thuốc thử chính sử dụng trong luận án được trình bày ở Bảng 2.1.

***Bảng 2.1.** Một số hóa chất, thuốc thử chính sử dụng trong luận án*

STT	Hóa chất	Nguồn gốc
1	Imipramin	Sigma St.louis, MO, USA
2	Donepezil	Tokyo C. Industry Co., Ltd, Japan
3	Acid ursolic (độ tinh khiết > 98%)	Chengdu Biopurify Phytochemicals, Trung Quốc

STT	Hóa chất	Nguồn gốc
4	Acid oleanolic (độ tinh khiết > 98%)	Chengdu Biopurify Phytochemicals, Trung Quốc
5	α-methyl-p-tyrosin (AMPT)	Sigma St.louis, MO, USA
6	ρ-chlorophenylalanin (PCPA)	Sigma St.louis, MO, USA
7	dimethyl sulfoxid (DMSO)	Wako, Nhật Bản
8	acid 5,5´-dithiobis-2-nitrobenzoic	Sigma, St. Louis, MO, USA
9	acetylthiocholin iodide	Nacalai Tesque, Kyoto, Nhật Bản
10	Natri pentobarbital	Wako, Nhật Bản
11	Dung dịch hoạt hóa kháng nguyên (Target retrieval solution)	Dako, Nhật Bản
12	Kháng thể anti- DCX rabbit	Abcam, Anh
13	Kháng thể gắn HRP anti-rabbit IgG	Cell Signaling Technology, Mỹ
14	Kháng thể anti-ChAT goat	Millipore, CA, USA
15	Kháng thể bovin anti-goat IgG	Santa Cruz Bio. Inc., Dallas, TX
16	Kháng thể anti-VEGF rabbit	Santa Cruz Bio. Inc., Dallas, TX
17	Kháng thể anti β-actin rabbit	Thermo scientific
18	Target Retrieval Solution	Dako, Japan
19	Sepazol	Nacalai Tesque, Nhật Bản
20	Gel SDS-PAGE	
21	Triton-X-100	Sigma, St. Louis, MO, USA
22	Các dung môi chiết xuất đạt tiêu chuẩn công nghiệp	
23	Các dung môi, hệ đệm đạt tiêu chuẩn phân tích	
24	Các hóa chất, dung môi khác đạt tiêu chuẩn dược dụng	

2.1.4. Trang thiết bị, dụng cụ

Một số trang thiết bị, dụng cụ chính sử dụng trong luận án được trình bày ở Bảng 2.2.

2.1.5. Địa điểm nghiên cứu

- Gây mô hình, các thử nghiệm hành vi, mô học, Western blot, xác định hoạt độ acetylcholinesterase, sử dụng chất đối kháng: Khoa Dược lý – Sinh hóa, Viện Dược liệu.

- Kỹ thuật Real-time PCR: Khoa Dược lý – Viện thuốc từ hợp chất thiên nhiên, Đại học Toyama, Nhật Bản.

Bảng 2.2. *Một số trang thiết bị, dụng cụ chính sử dụng trong luận án*

STT	Thiết bị	Nguồn gốc
1	Hệ thống định vị hộp sọ chuột	Muromachi, Kilai Co., Ltd, Nhật Bản
2	Vật thể O1, O2, O3	Tự thiết kế theo cấu trúc của hãng Ugo Basile (Ý)
3	Mê lộ chữ Y cải tiến	
4	Mệ lộ nước Morris	Tự thiết kế
5	Bể nước hình trụ	Tự thiết kế
6	Thanh treo đuôi chuột	Tự thiết kế
7	Môi trường mở Plexiglas gắn tế bào quang điện Digiscan	Omnitech Electronics, Columbus, OH
8	Phần mềm phân tích kết quả	ANY MAZE, Stoeling, Mỹ
9	Phần mềm Image J	phiên bản 1.41; NIH, MD, USA
10	Hệ thống StepOne Real-time PCR System®	Applied BioSystem, USA
11	Tủ âm 80^{o}C Sanyo	Nhật Bản
12	Máy đọc ELISA Thermo Labsystem	Thermo, Đức
13	Kính hiển vi Olympus PROVIS®	Olympus Inc., Tokyo, Nhật Bản
14	Máy Amersham ™ ECL ™ Prime	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
15	Máy quang phổ UV-VIS	HumaReader HS; Human Diagnostics, Wiesbaden, Đức
16	Bộ điện di omniPAGE	Cleaver Scientific – Anh
17	Bộ chuyển màng	Cleaver Scientific – Anh
18	Máy li tâm lạnh	Satorius
19	Thiết bị nghiền đồng thể	IKA
20	Máy siêu âm Power sonic 405	Human lab – Hàn Quốc

STT	Thiết bị	Nguồn gốc
21	Cân phân tích Precisab XT 220A, độ chính xác 0,0001g.	Precisa – Thụy Sĩ
22	Máy cắt tiêu bản chuyên dụng	Nhật Bản
23	Màng PVDF	Bio-rad, CA, Hoa Kỳ
24	Giấy lọc Whatnam® qualitative filter paper, Grade 93, 580×580 cm	Merck, Darmstadt, Germany
25	Các máy móc, dụng cụ khác: dụng cụ thủy tinh, micropipet tự động, lam kính, kim tiêm các cỡ…	

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng thể

Nghiên cứu được tiến hành theo sơ đồ tổng thể ở *Hình 2.1*.

2.2.2. Phương pháp chiết xuất dược liệu

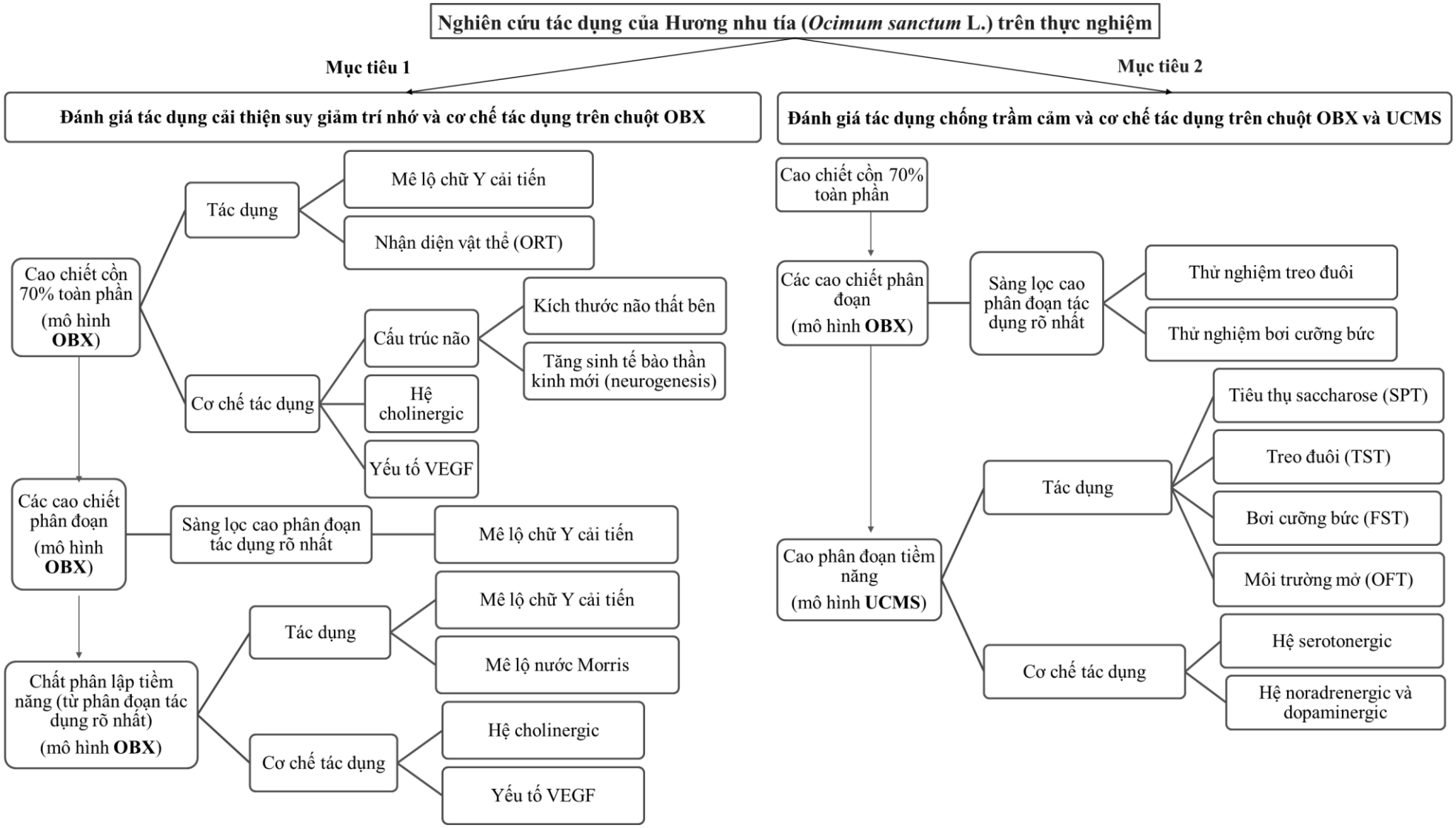
Cao chiết cồn (OS), các cao chiết phân đoạn gồm n-hexan (OS-H), ethyl acetat (OS-E), n-butanol (OS-B) dùng cho thí nghiệm được cung cấp bởi Khoa Hóa Thực vật, Viện Dược liệu. Quá trình chuẩn bị mẫu được tóm tắt như sau:

2.2.2.1. Cao chiết cồn toàn phần

Cao OS được chuẩn bị như sau: cắt nhỏ phần trên mặt đất của hương nhu tía (356 g), làm khô trong tủ sấy nóng ở 50°C và nghiền mịn. Bột dược liệu được chiết hồi lưu với ethanol 70% theo tỷ lệ 1:7 (kl/tt) trong 2 giờ, lặp lại 3 lần. Sau đó, dịch chiết gộp được lọc và cô đặc ở 50°C trong chân không thành cao khô (58,74 g) và bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng. Hiệu suất chiết tính trên dược liệu khô ban đầu là 16,5% (kl/kl).

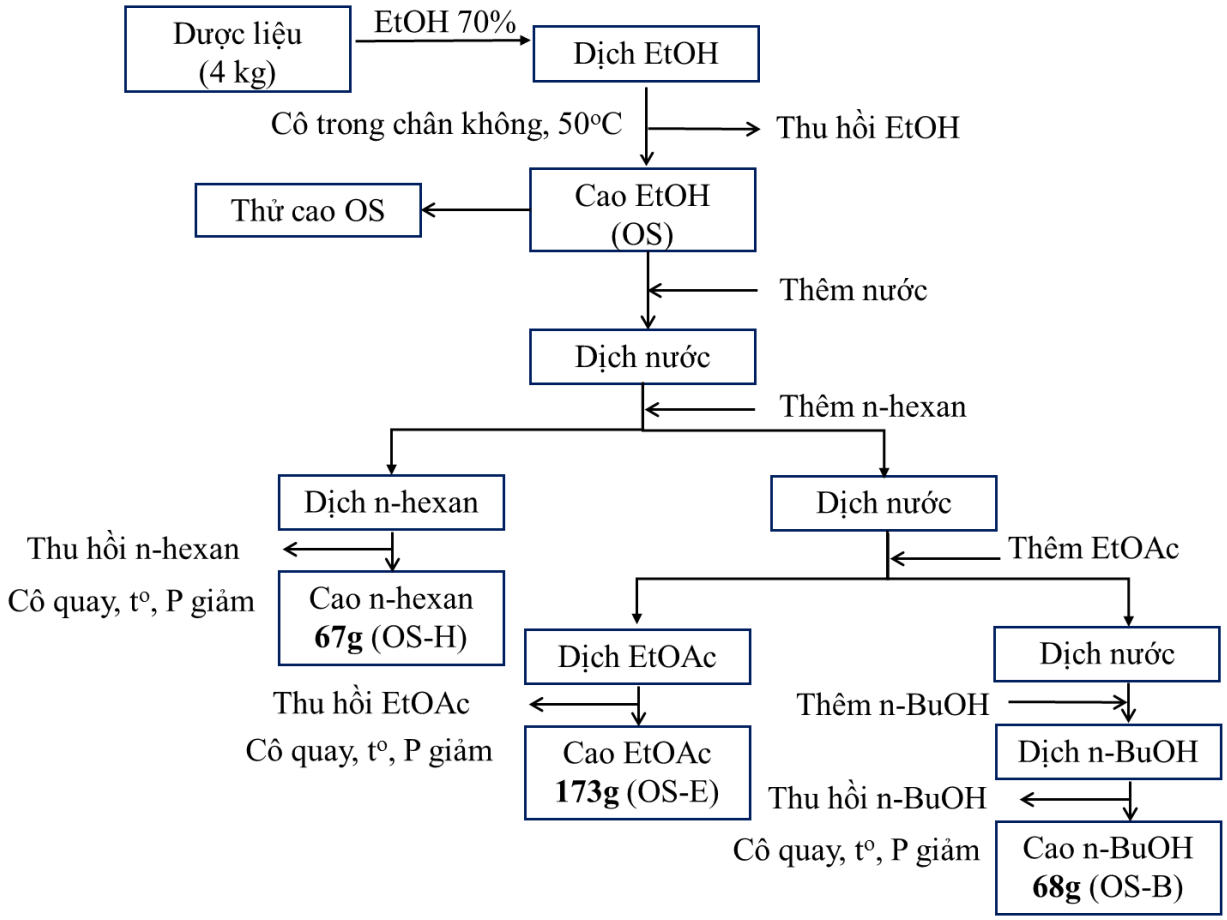
2.2.2.2. Các cao chiết phân đoạn

Các cao chiết phân đoạn hương nhu tía được chuẩn bị như sau: 4kg phần trên mặt đất của hương nhu tía được chiết xuất bằng ethanol 70% trong điều kiện hồi lưu trong hai giờ, ba lần. Dịch chiết gộp được lọc và cô đặc ở 50^{o}C trong chân không, thu được 2 lít dịch chiết cô đặc. Sau đó, dịch chiết này được lắc phân đoạn với các dung môi có độ phân cực tăng dần: n-hexan, ethyl acetat, n-butanol, H_2O. Cất quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao khô với khối lượng lần lượt: OS-H (67 g), OS-E (173 g), và OS-B (68 g), và pha nước còn lại (289 g) *(Hình 2.2.)*.



Hình 2.1. *Sơ đồ nghiên cứu tổng thể*

Ngay sau khi điều chế, các loại cao chiết tổng và cao phân đoạn thu được (dạng cao khô, độ ẩm 3-5%) được chia nhỏ theo khối lượng thành từng ống nghiệm riêng, nút kín và bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng.



Hình 2.2. *Sơ đồ chiết xuất dược liệu*

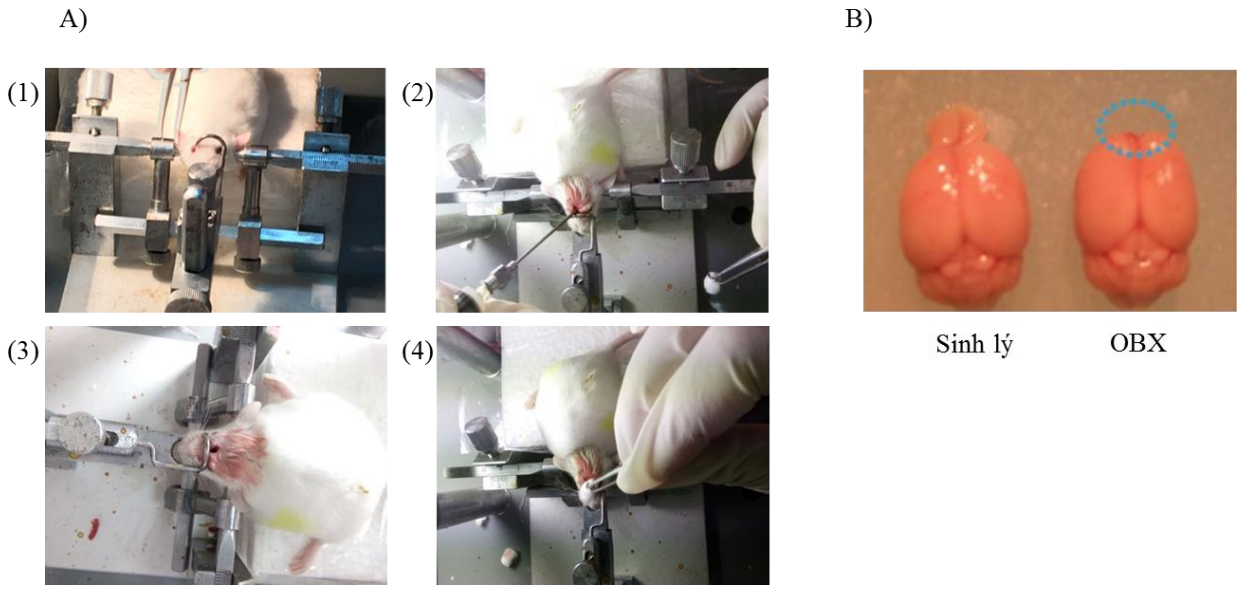
2.2.3. Gây mô hình dược lý

2.2.3.1. Mô hình chuột nhắt bị loại bỏ thùy khứu giác (Olfactory bulbectomy - OBX)

Mô hình chuột nhắt bị loại bỏ thùy khứu giác (OBX) được dùng để nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ và tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía, được tiến hành theo công bố của Xoan Le và cộng sự [107], Mizuki và cộng sự [108]:

Chuột bị gây mê bằng sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p). Hộp sọ của chuột được cố định bằng dụng cụ chuyên dụng. Dùng kéo cắt một đường để bộc lộ phần hộp sọ bao bên ngoài của thùy khứu giác. Tại phần sọ này, sử dụng máy khoan để tạo một lỗ đường kính 1mm. Sử dụng kim để phá hủy thùy khứu giác và sử dụng xi lanh để hút toàn bộ phần mảnh não này ra khỏi hộp sọ của chuột. Chuột được cầm máu bằng bọt gelatin *(Hình 2.3.)*. 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. Số liệu hành vi của những con chuột có

thùy khứu giác bị lấy đi dưới 70% sẽ bị loại bỏ khi phân tích kết quả (phần thùy khứu giác chưa được loại bỏ hết có thể gây ảnh hưởng đến hành vi của chuột). Đối chứng sinh lý (sham operation) được tiến hành theo cách tương tự nhưng bỏ qua bước loại bỏ thùy khứu giác.



Hình 2.3. *Phẫu thuật loại bỏ thùy khứu giác (OBX)*

(A) Hình ảnh qui trình thực hiện: (1) cố định hộp sọ chuột; (2) khoan và dùng kim phá bỏ thùy khứu giác; (3) hút sạch mảnh não; (4) cầm máu bằng bọt gelatin; (B) Hình ảnh não chuột sinh lý và não chuột đã bị loại bỏ thùy khứu giác.

2.2.3.2. Mô hình chuột nhắt gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (unpredictable chronic mild stress - UCMS)

Mô hình gây trầm cảm bằng stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS) được dùng để nghiên cứu tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của cao phân đoạn hương nhu tía có tác dụng rõ nhất. UCMS được tiến hành dựa vào công bố của Daishu Mizuki và cộng sự, có cải tiến nhỏ [73]. Chuột phải chịu các loại tác nhân gây stress nhẹ không dự đoán trước như:

- Gò bó chuột vào lọ nhỏ trong 3 giờ, 1 lần/tuần *(Hình 2.4.)*;
- Nghiêng chuồng 45° trong 24 giờ, 2 lần/tuần;
- Bình không có nước trong 24 giờ, 2 lần/tuần;
- Ướt chuồng (200ml nước/50g trấu) trong 24 giờ, 1 lần/tuần;
- Chiếu sáng liên tục 36 giờ, 2 lần/tuần;
- Tiếng chuột cống kêu 3 giờ liên tục (phát băng ghi âm sẵn có), 3 lần/tuần;
- Nhồi 2 chuồng với nhau trong 24 giờ, 2 lần/tuần;

- Cô lập chuột và bỏ thức ăn, nước uống trong 18 giờ, 1 lần/tuần (để chuẩn bị cho thử nghiệm tiêu thụ saccharose).

Hai trong số các tác nhân gây stress này được áp dụng hàng ngày vào các thời điểm khác nhau và tuân theo lịch trình 1 tuần bán ngẫu nhiên (Mô phỏng lịch trình 1 tuần theo *Bảng 2.3*).

Bảng 2.3. *Mô phỏng lịch trình gây stress nhẹ không dự đoán trước trong 1 tuần*

STT	Tác nhân	Thứ 2	Thứ 3	Thứ 4	Thứ 5	Thứ 6	Thứ 7	Chủ nhật
1	Tiếng chuột cống (3)	13h-16h			15h-18h		9h-12h	
2	Cô lập 18 giờ (1)	16h thứ 2 đến 12h thứ 3						
3	Gò bó (1)					10h-13h		
4	Nghiêng chuồng (2)		15h thứ 3 đến 14h thứ 4					14h CN - 13h thứ 2 tuần sau
5	Ướt chuồng (1)							16h CN-15h thứ 2 tuần sau
6	Bình không có nước (2)				18h thứ 5 đến 17h thứ 6		14h thứ 7 đến 13h chủ nhật	
7	Chiếu sáng liên tục 36 giờ (1)	7h thứ 2 đến 19h thứ 3						
8	Nhồi chuồng (2)			7h thứ 4 đến 19h thứ 5		14h thứ 6 đến 13h thứ 7		

Quá trình UCMS kéo dài 6 tuần trước khi kiểm tra hành vi. Các tác nhân gây stress tiếp tục được áp dụng trong suốt giai đoạn thử nghiệm hành vi, trừ những ngày thử nghiệm để tránh ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm. Lô chứng sinh lý được nuôi trong điều kiện bình thường.

Hình 2.4. *Gò bó chuột vào lọ nhỏ - một trong các tác nhân gây stress của mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS)*

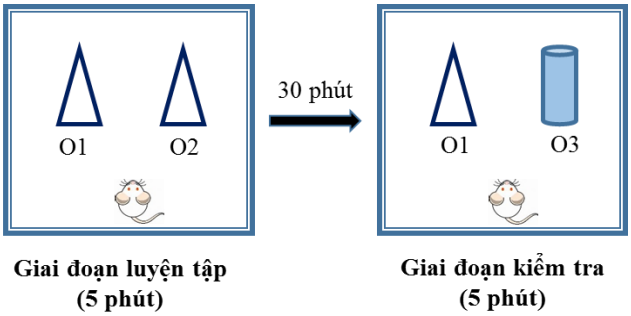
2.2.4. Các thử nghiệm hành vi

Các thử nghiệm hành vi trong nghiên cứu này được phân tích bằng phần mềm ANY MAZE (ver. 4.99, Stoelting Co., IL, Mỹ) – là hệ thống theo dõi trực tiếp video ghi bằng camera kết nối với máy tính và phân tích hành vi tự động tiên tiến nhất hiện nay.

2.2.4.1. Thử nghiệm hành vi đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ

(1) Thử nghiệm nhận diện vật thể (object recognition test - ORT)

Thử nghiệm nhận diện vật thể (ORT) dựa vào đặc tính tự nhiên ưa khám phá cái mới của loài gặm nhấm và được sử dụng để kiểm tra trí nhớ ngắn hạn, không liên quan đến không gian, được thực hiện vào ngày thứ 17 của thí nghiệm theo công bố của các tác giả Xoan Le và cộng sự [107], Yamada và cộng sự [106] *(Hình 2.5.)*.



Hình 2.5. *Thử nghiệm nhận diện vật thể*

Hệ thống ORT gồm 1 hình hộp kích thước 35 x 35 x 50 cm và các vật thể bao gồm O1, O2 giống hệt nhau, O3 có hình dạng và kích thước khác O1, O2. 24 giờ trước khi tiến hành thử nghiệm ORT, chuột được đặt vào hình hộp, cho phép tự do khám phá không gian mở trong 10 phút (open field). Ngày thử nghiệm gồm có 2 giai đoạn: giai đoạn luyện tập và giai đoạn kiểm tra. Ở giai đoạn luyện tập, mỗi chuột được đặt vào hộp hình trụ ngày hôm trước, có bổ sung thêm 2 đồ vật giống nhau O1 và O2. Chuột được

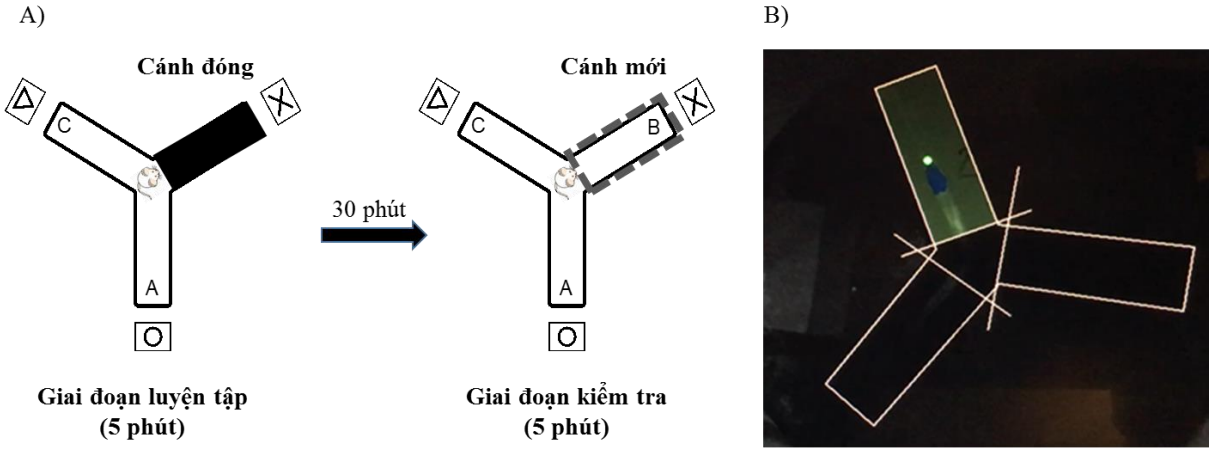
phép tự do khám phá 2 đồ vật này trong 5 phút. Giai đoạn kiểm tra được tiến hành sau giai đoạn luyện tập 30 phút, trong đó O1 giữ nguyên, O2 được thay bằng O3. Chuột cũng được phép tự do khám phá những đồ vật này trong 5 phút giống ở giai đoạn luyện tập. Sau mỗi lần nhấc chuột ra, các đồ vật và không gian trong hộp được làm sạch bằng ethanol 70% để loại bỏ sự nhận biết mùi.

Thông số đánh giá: Thời gian chuột khám phá vật thể (giây): là khoảng thời gian chuột hướng mũi về phía vật thể trong bán kính 2cm quanh chân vật thể.

Hoạt động khám phá đồ vật của chuột sẽ được ghi lại bằng camera và thời gian khám phá từng đồ vật (giây) được phân tích bằng phần mềm ANY MAZE (ver. 4.99, Stoelting Co., IL, Mỹ)**.**

(2) Thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến (modified Y maze test)

Thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến cũng dựa vào đặc tính tự nhiên ưa khám phá cái mới của loài gặm nhấm và được sử dụng để kiểm tra trí nhớ ngắn hạn liên quan đến không gian, được tiến hành vào ngày thứ 24 sau OBX.



Hình 2.6. *Thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến*

(A) Thiết kế thí nghiệm; (B) Hình ảnh ghi lại bằng phần mềm ANYMAZE

Phương pháp tiến hành theo công bố trước đây [107] *(Hình 2.6.)*. Thiết bị được sử dụng là một mê lộ hình chữ Y bằng gỗ, có 3 cánh tay (A, B, C), mỗi cánh tay dài 40 cm, rộng 12 cm ở phía trên và rộng 3 cm ở phía đáy, chiều cao 18 cm, có gắn bảng hiệu chỉ đường (kí hiệu ●, **X**, ▲, như *Hình 2.6*) phía trên mỗi cánh để chuột quan sát và định hướng. Thí nghiệm này bao gồm 2 giai đoạn, giai đoạn luyện tập và giai đoạn kiểm tra, cách nhau 30 phút. Ở mỗi giai đoạn chuột được khám phá mê lộ trong 5 phút. Ở giai đoạn luyện tập, chuột chỉ được phép khám phá 2 cánh tay của mê lộ chữ Y (A, C), còn

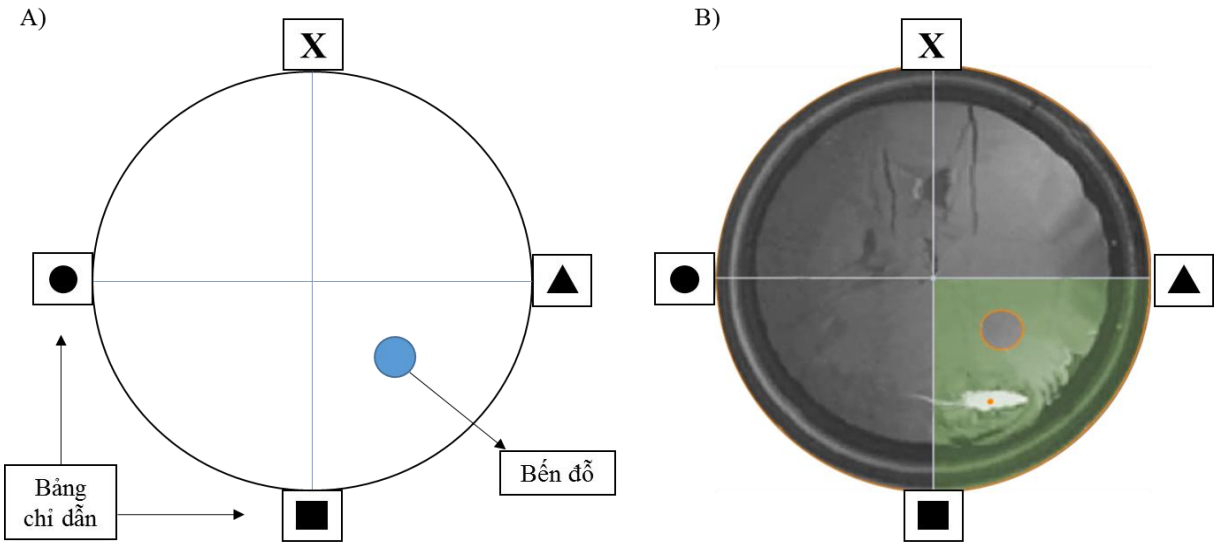
một cánh tay (B) sẽ bị đóng lại. Đến giai đoạn kiểm tra, chuột được khám phá 3 cánh tay của mê lộ chữ Y. Cánh tay đóng trước đây đã được mở trong giai đoạn kiểm tra được gọi là cánh mới (B). Sau mỗi lần thử nghiệm, sàn và tường của mê lộ được làm sạch bằng ethanol 70% để loại bỏ sự nhận biết mùi.

Thông số đánh giá: Tỷ lệ % thời gian khám phá cánh mới = 100 x thời gian khám phá cánh mới/tổng thời gian khám phá cả 3 cánh (%).

Hoạt động của chuột ghi lại bằng camera, thời gian và số lần chuột khám phá các cánh được phân tích bằng ANY MAZE (ver. 4.99, Stoelting Co., IL, Mỹ). Chuột được xác định là khám phá một cánh khi phần đầu hoặc toàn bộ cơ thể chuột ở cánh đó.

(3) Thử nghiệm mê lộ nước Morris (Morris water maze test – MWM)

Thử nghiệm mê lộ nước Morris dùng để kiểm tra trí nhớ dài hạn liên quan đến không gian thông qua quá trình học nhớ, được thực hiện vào ngày thứ 24 đến ngày thứ 29 của thí nghiệm, theo phương pháp của Morris đã được sửa đổi [157, 158].



Hình 2.7. *Thử nghiệm mê lộ nước Morris*

(A) Thiết kế thí nghiệm; (B) Hình ảnh ghi lại bằng phần mềm ANYMAZE

Mê lộ là một bể nước (nước trong suốt, không màu) hình trụ bằng inox sơn đen, đường kính 120 cm, cao 60 cm với 4 bảng hiệu chỉ đường gắn trên thành bể cách đều nhau (kí hiệu ●, **X**, ▲, ■ như *Hình 2.7*), đặt trong buồng tối (cường độ ánh sáng 8-9 lux, đảm bảo chuột có thể quan sát dễ dàng các bảng chỉ đường treo ở thành bể), nhiệt độ nước duy trì 20 ± 1°C (lạnh hơn nhiệt độ phòng 1 chút để thúc đẩy nhu cầu thoát khỏi tình trạng ngập nước của chuột). Một bến đỗ (platform) bằng nhựa trong suốt, bề mặt sơn đen cùng màu với nền đen của bể nước (khi bến đỗ chìm dưới mặt nước, chuột

không nhìn thấy bến đỗ). Khu vực bể cần treo rèm quây kín xung quanh để ngăn sự tương tác của chuột với môi trường bên ngoài. Chuột được để ổn định trong phòng thí nghiệm ít nhất 30 phút trước khi thử nghiệm bắt đầu. Đầu chuột hướng vào thành bể, thả nhẹ tay trên mặt nước để chuột bơi và tránh sợ hãi, làm khô và làm ấm chuột sau mỗi lượt bơi, tránh gây căng thẳng cho chuột. Cần thay đổi vị trí thả chuột vào mê lộ ở các ngày khác nhau, tránh trường hợp chuột ngẫu nhiên tìm thấy bến đỗ.

Quy trình thử nghiệm gồm 3 bài tập như sau:

- *Chuẩn bị luyện tập (pre-training): bài tập nhìn thấy bến đỗ (1 ngày)*

Ngày 1, bến đỗ được đặt cao hơn mặt nước 1 cm. Chuột được thả ở vị trí góc phần tư không có bến đỗ và bơi tự do trong vòng 1 phút để tìm bến đỗ. Nếu chuột tự tìm được bến đỗ thì cho ở đó 20 giây. Nếu sau 1 phút chuột không thấy bến đỗ thì dẫn đường để chuột tìm được bến đỗ và ở đó 20 giây. Nếu thời gian vượt quá 1 phút mà chuột chưa lên được bến đỗ, thời gian được ghi nhận là 1 phút.

- *Luyện tập (training): bài tập không nhìn thấy bến đỗ (4 ngày)*

Từ ngày 2 đến ngày 5, bến đỗ đặt dưới mặt nước 1 cm, chuột được luyện tập bài tập không nhìn thấy bến đỗ 4 lần/ngày, mỗi lần cách nhau 1 phút. Giữa các lần chuột được lau và sấy khô lông. Vị trí thả mỗi lần là ở 4 điểm khác nhau trong mê lộ, từ đó chuột được tự do bơi tìm bến đỗ dựa vào việc quan sát các bảng chỉ dẫn, trong vòng 1 phút. Chuột sẽ được hướng dẫn để tìm bến đỗ nếu như nó không tự tìm được bến đỗ sau 1 phút. Khi lên được bến đỗ, chuột sẽ được ở đó 20 giây.

Thông số đánh giá: tiềm thời (giây) (giá trị trung bình thời gian tìm thấy bến đỗ của 4 lần tập trong ngày), ***quãng đường bơi (m)*** (giá trị trung bình quãng đường bơi đến khi tìm thấy bến đỗ của 4 lần tập trong ngày) ***và tốc độ bơi (m/s)*** (giá trị trung bình tốc độ bơi của 4 lần tập trong ngày 5).

- *Kiểm tra thăm dò (probe test): bài tập không có bến đỗ (1 ngày)*

Ngày 6, bến đỗ được bỏ ra khỏi mê lộ, trí nhớ của chuột được kiểm tra bằng bài tập không có bến đỗ. Chuột bơi trong mê lộ 1 lần duy nhất trong 1 phút. Chuột dựa vào các bảng chỉ dẫn ở thành bể để tìm bến đỗ và có xu hướng bơi lâu tại góc phần tư mê lộ đặt bến đỗ những ngày tập trước (cung phần tư đích).

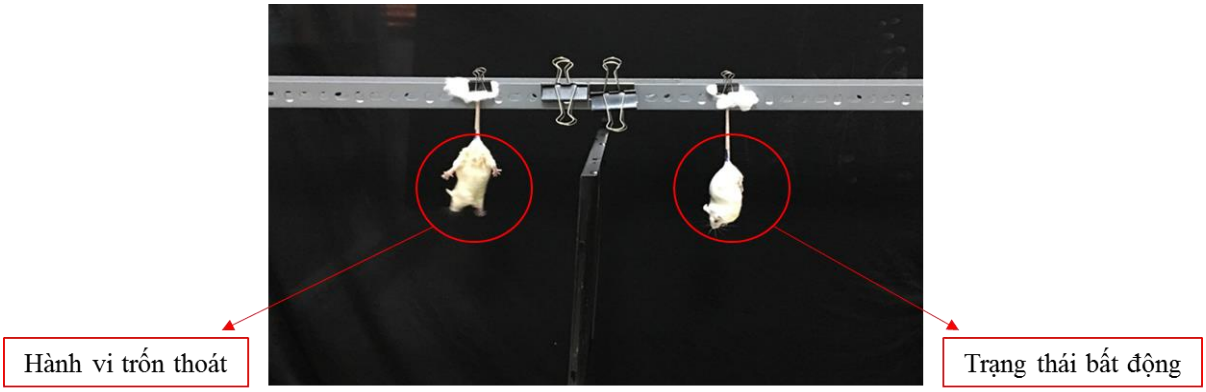
Thông số đánh giá: thời gian chuột bơi ở cung phần tư đích (giây).

Tất cả số liệu và hành vi trong thử nghiệm mê lộ nước Morris được phân tích bằng phần mềm ANY MAZE (ver. 4.99, Stoelting Co., IL, Mỹ).

2.2.4.2. Thử nghiệm hành vi đánh giá tác dụng chống trầm cảm

(1) Thử nghiệm treo đuôi (tail suspension test, TST)

Thử nghiệm treo đuôi được thực hiện nhằm phân tích hành vi tuyệt vọng của chuột, được thực hiện theo phương pháp của Steru và cộng sự [159]. Dụng cụ thí nghiệm là một giá treo bằng kim loại đặt trong một không gian kín, tách biệt với bên ngoài để tránh chuột có quan sát hoặc tương tác với môi trường xung quanh. Chuột bị treo đuôi trong khoảng thời gian 6 phút ở độ cao 40 cm so với mặt sàn, tính từ đầu chuột *(Hình 2.8.)*.



Hình 2.8. *Thử nghiệm treo đuôi*

Trạng thái stress không thể trốn thoát do bị treo đuôi sẽ tiến triển thành tư thế bất động trên chuột thử nghiệm. Trạng thái bất động được định nghĩa là trạng thái chuột không có bất cứ hoạt động nào khác ngoài các cử động hô hấp thông thường. Các thuốc chống trầm cảm có xu hướng làm giảm thời gian bất động trên chuột và làm tăng hành vi theo xu hướng trốn thoát.

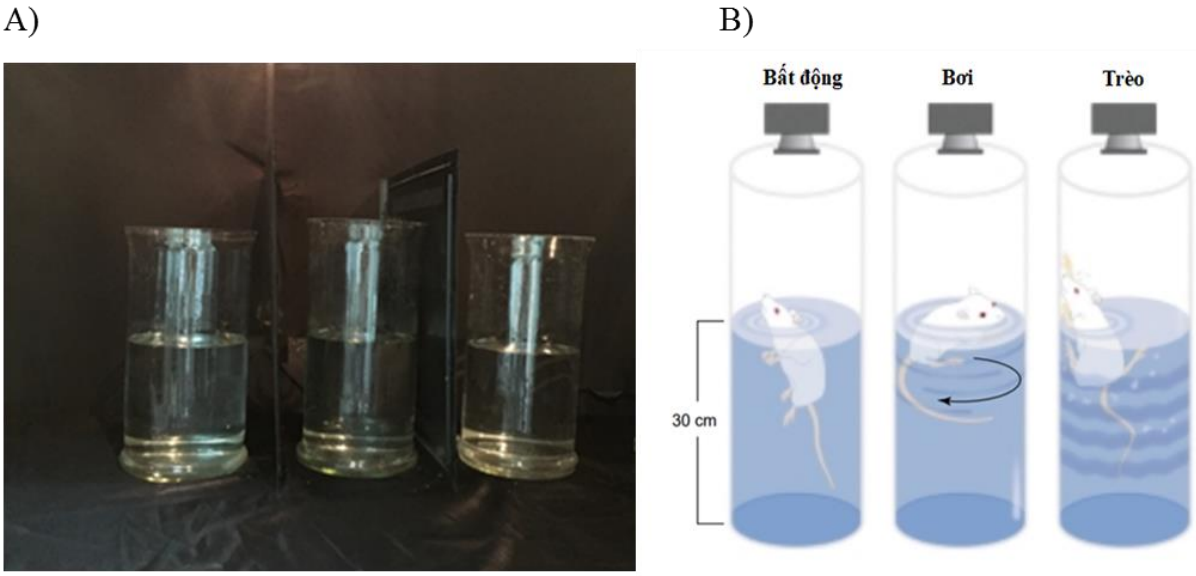
Thông số đánh giá: thời gian bất động của chuột (giây): được ghi nhận trong 5 phút sau của thử nghiệm.

Hoạt động của chuột ghi lại bằng camera, thời gian bất động của chuột được tính toán bằng phần mềm ANY MAZE, Stoeling, Mỹ. Trạng thái bất động của chuột, bao gồm cả Immobility và Freezing, được ghi nhận trên phần mềm theo thông số cài đặt khoảng thời gian không có chuyển động của động vật tương ứng là 500 mili giây (minimum immobility period, cùng với immobility sensibility 90%) và 250 mili giây (minimum freeze duration).

(2) Thử nghiệm bơi cưỡng bức (forced swimming test, FST)

Thử nghiệm bơi cưỡng bức được thực hiện theo phương pháp đã được công bố trước đây [160, 161]. Dụng cụ là 1 bể hình trụ bằng thủy tinh trong suốt (cao 60 cm ×

12 cm đường kính), được đổ nước 20 ± 1°C) có độ cao từ 28-30 cm đủ để đuôi chuột không chạm vào đáy bình và chuột không thể trèo ra khỏi bình. Trạng thái stress không thể trốn thoát do bị đặt trong bể nước sẽ tiến triển thành tư thế bất động trên chuột thử nghiệm. Trước thử nghiệm 24h, chuột được luyện tập trong bể nước 6 phút. Giai đoạn thử nghiệm được tiến hành với việc thả chuột vào trong bể với thời gian 6 phút. Sau thí nghiệm, chuột được lau và sấy khô lông trước khi thả về chuồng *(Hình 2.9.)*.



Hình 2.9. *Thử nghiệm bơi cưỡng bức*

(A) Bố trí dụng cụ thí nghiệm; (B) Các trạng thái hoạt động của chuột trong FST

Thông số đánh giá: Thời gian bất động của chuột (giây) và thời gian trèo của chuột (giây): được tính trong 5 phút sau của thử nghiệm.

Trong đó, trạng thái bất động được định nghĩa là trạng thái chuột không có bất cứ hoạt động nào khác ngoài các hoạt động nhằm giữ đầu/mũi ở trên mặt nước; hành vi trèo được định nghĩa là những chuyển động dọc, mạnh mẽ của chuột sử dụng 2 chân trước hướng vào thành bể nước.

Hoạt động của chuột ghi lại bằng camera, thời gian bất động của chuột được tính toán bằng phần mềm ANY MAZE, Stoeling, Mỹ; thời gian trèo được ghi nhận bằng đồng hồ bấm giây bởi hai quan sát viên có kinh nghiệm trong điều kiện mù, lấy giá trị trung bình. Trạng thái bất động của chuột, bao gồm cả Immobility và Freezing, được ghi nhận trên phần mềm theo thông số cài đặt khoảng thời gian không có chuyển động của động vật tương ứng là 500 mili giây (minimum immobility period, cùng với immobility sensibility 90%) và 250 mili giây (minimum freeze duration).

(3) Thử nghiệm tiêu thụ saccharose (sucrose preference test - SPT) trên mô hình UCMS

Thử nghiệm tiêu thụ saccharose được sử dụng để đánh giá trạng thái giống "anhedonia" (tình trạng thiếu hoàn toàn niềm vui hoặc mất nhu cầu trải nghiệm và tận hưởng cuộc sống). Thử nghiệm được tiến hành mỗi tuần một lần trong suốt thời gian gây mô hình UCMS (tổng cộng 5 lần) theo Mizuki và cộng sự [73], Daodee và cộng sự [162]. Trước khi thử nghiệm, mỗi chuột được cô lập trong một lồng riêng lẻ và không được cho thức ăn, nước uống trong 18 giờ. Trong thử nghiệm, hai vòi uống được đặt tại lồng qua đó chuột có thể uống nước máy hoặc dung dịch saccharose 2% (kl/tt) trong 1 giờ. Vị trí của 2 vòi uống được đổi chỗ ngẫu nhiên. Thể tích dung dịch saccharose 2% được tiêu thụ trong khoảng thời gian 1 giờ được ghi lại. Cân nặng chuột cũng được theo dõi 1 lần/tuần vào ngày thử nghiệm saccharose.

Thông số đánh giá: Lượng saccharose tiêu thụ (g/kg thể trọng): được tính trên trọng lượng cơ thể chuột theo công thức như sau:

Lượng saccharose (g/kg thể trọng) = (0,02 x V)/ (0,001 x m)

Trong đó: V: thể tích dung dịch saccharose chuột uống trong 1 giờ (ml)

m: khối lượng chuột (g)

(4) Thử nghiệm môi trường mở (open field test, OFT) trên mô hình UCMS

Thử nghiệm môi trường mở để đánh giá vận động tự nhiên *(locomotor activity)* của chuột từ đó loại trừ kết quả dương tính giả từ việc tăng vận động do thuốc gây ra. Ngoài ra hành vi chải lông trong môi trường mở để đánh giá mức độ căng thẳng do UCMS gây ra. Dụng cụ là một buồng plexiglass trong suốt, sàn đen, kích thước 40 cm x 40 cm x 50 cm, được gắn với bộ phát quang và tế bào quang điện Digiscan (Omnitech Electronics, Columbus, OH) tạo thành lưới x-y gồm các chùm tia hồng ngoại vô hình chia buồng thành 16 ô vuông nhỏ *(Hình 2.10.)*. Thử nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ phòng 25 ± 1^{o}C, ánh sáng 9-10 lux. Chuột được thả vào buồng trong vòng 10 phút, khi di chuyển sẽ chạm lưới hồng ngoại. Máy phân tích ghi lại và phân tích thông tin khi lưới hồng ngoại bị chạm. Sau đó, phần mềm máy tính sẽ tính toán các thông số đo lường hoạt động của chuột trong thời gian thử nghiệm. Sau mỗi lần thử nghiệm, sàn và tường buồng được làm sạch bằng ethanol 70% để loại bỏ sự nhận biết mùi.

Hoạt động theo chiều ngang được định nghĩa là tổng số lần ngắt chùm tia xảy ra trong cảm biến ngang và hoạt động theo chiều dọc được xác định là tổng số lần ngắt

chùm tia xảy ra theo phương thẳng đứng.

Hành vi chải lông được định nghĩa là khi chuột dùng 2 chân trước gãi vào đầu, mặt, cổ hoặc quay hẳn đầu ra sau để liếm lông.

Thông số đánh giá: hoạt động theo chiều ngang (horizontal activity - units), ***hoạt động theo chiều dọc*** (vertical activity - units) và ***thời gian chải lông (giây).***

Hoạt động của chuột được ghi lại bằng camera; hoạt động theo chiều ngang và hoạt động theo chiều dọc được ghi nhận tự động bằng máy; thời gian chải lông được ghi nhận bằng đồng hồ bấm giây bởi hai quan sát viên có kinh nghiệm trong điều kiện mù, lấy giá trị trung bình.

A) B)

Hình 2.10. *Thử nghiệm môi trường mở*

A, Buồng plexiglass có hệ thống Digiscan; B, Hành vi chải lông của chuột

2.2.5. Phương pháp nghiên cứu cơ chế tác dụng

2.2.5.1. Phương pháp nghiên cứu mô học (histochemical study)

Sau khi hoàn thành thử nghiệm hành vi, chuột được truyền rửa tim mạch (cadiac perfusion) bằng nước muối sinh lý và sau đó bằng 4% paraformaldehyd (PFA) pha trong đệm muối phosphat (phosphate buffer saline - PBS). Não chuột sau đó được thu thập và được cố định bằng phương pháp thích hợp sau đó được đúc trong paraffin. Não chuột sau đó được cắt thành các lát cắt kích thước 5 μm trên máy cắt paraffin và bảo quản ở 4^{o}C đến khi sử dụng *(Hình 2.11.)*

(1) Phân tích sự thay đổi kích thước não thất bên

Các tiêu bản não ở ≈ -1,46 mm tính từ vùng bregma được nhuộm bằng tím cresyl và được dùng để tính toán kích thước của não thất bên. Vùng não thất bên được quan sát trên kính hiển vi Olympus PROVIS® (Olympus Inc., Tokyo, Nhật Bản) dưới độ

phóng đại vật thể × 1,25. Kích thước của vùng não thất bên được tính toán bằng phần mềm Image J (phiên bản 1.41; NIH, MD, USA) [107].

Thông số đánh giá: so sánh sự thay đổi tỷ lệ % giữa diện tích não thất bên trên tổng diện tích của lát cắt não.

A) B)

Hình 2.11. *(A) Dụng cụ cắt lát não; (B) Phần não đem đúc parafin*

(2) Nhuộm hóa mô miễn dịch

Các tế bào thần kinh cholinergic trong vách giữa và các tế bào thần kinh mới sinh trong vùng hồi răng hồi hải mã được phân tích tương ứng bằng cách nhuộm hóa mô miễn dịch với chỉ dấu cholin acetyltransferase (ChAT, vị trí bregma≈ +0.98mm) và doublecortin (DCX, bregma ≈ −1.70mm) trên tiêu bản lát cắt não chuột. Lát cắt não được loại bỏ paraffin bằng xylen và rehydrat hóa bằng các dung dịch ethanol với các nồng độ giảm dần (100%, 95%, 75%, 50%) và cuối cùng là nước cất. Sau khi ngâm rửa trong dung dịch đệm PBS, lát cắt não được ủ trong dung dịch hoạt hóa kháng nguyên (Target retrieval solution, Dako, Nhật Bản) ở nhiệt độ 95^{o}C trong 30 phút. Sau khi rửa lại với nước cất, lát cắt được ủ với dung dịch H_2O_2 0,1% trong 30 phút để loại bỏ peroxidase nội sinh trong tế bào, sau đó ủ lát cắt não với dung dịch 5% albumin huyết thanh bò (BSA) trong PBS, thời gian 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Ủ lát cắt trong kháng thể sơ cấp đa dòng anti-ChAT (AB-144P; Millipore, CA, USA, độ pha loãng 1:200) hoặc anti-DCX (ab18723, Abcam, Cambridge, UK, độ pha loãng 1:200) ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ rồi để qua đêm ở 4^{o}C. Sau khi rửa với đệm PBS, lát cắt được ủ trong kháng thể thứ 2 tương ứng (anti-goat hoặc anti-rabbit) ở nhiệt độ phòng 1 giờ rồi nhuộm màu với dung dịch DAB (3,3'-diaminobenzidin), hematoxylin và loại nước để quan sát [163].

Tiêu bản não chuột được quan sát dưới kính hiển vi Olympus PROVIS® vật kính 10x và đếm số lượng tế bào dương tính (bắt màu nâu của DAB) với ChAT ở vách ngăn giữa và DCX (trên vùng cận tế bào hạt của vùng hồi răng).

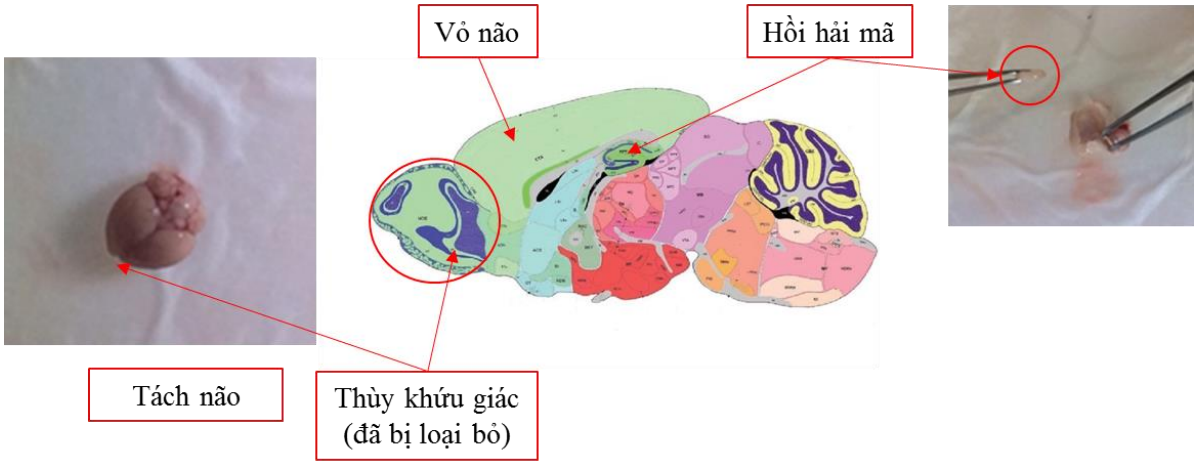
Thông số đánh giá:

- Số lượng tế bào dương tính với ChAT trong 1 lát cắt của mỗi não chuột (trung bình của 2-3 lát cắt/não) ở vị trí bregma ≈ +0.98 mm

- Số lượng tế bào dương tính với DCX trong 1 lát cắt của mỗi não chuột (trung bình của 2-3 lát cắt/não) ở vị trí bregma ≈ −1.70 mm

2.2.5.2. Phương pháp nghiên cứu hóa thần kinh (neurochemical study)

Sau khi kết thúc thử nghiệm hành vi, dùng pentobarbital gây mê và giết chuột, tách vùng vỏ não và hồi hải mã đặt ngay vào trong nitơ lỏng để bảo quản tạm thời, sau đó cất trong tủ âm 80^{o}C để bảo quản đến khi tiến hành thí nghiệm tiếp theo *(Hình 2.12.)*



Hình 2.12. *Lấy não chuột tách vùng hồi hải mã và vỏ não*

(1) Kỹ thuật Real-time PCR (Polymerase chain reaction)

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 của chuột được phân tích bằng kỹ thuật nhân bản DNA (deoxyribonucleic acid) dựa vào các chu kỳ nhiệt (qRT-PCR) với trình tự đích là mRNA (message ribonucleic acid, RNA thông tin), được tiến hành theo phương pháp đã công bố trước đây [107].

Chiết tách mRNA tổng số và tổng hợp cDNA (complementary DNA, DNA bổ sung)

mRNA tổng số được tách từ hồi hải mã chuột sử dụng Sepazol (Nacalai Tesque, Nhật Bản) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi kiểm tra nồng độ và độ tinh khiết trên máy Nanodrop (Thermo Scientific, Mỹ), mRNA tổng số được hòa loãng về nồng độ 0,33 µg/ml và bảo quản ở 20^{o}C trước khi sử dụng để tổng hợp cDNA (chuỗi mạch đơn DNA được tổng hợp từ phân tử mRNA).

Quá trình tổng hợp cDNA từ khuôn mRNA tổng số sử dụng enzym phiên mã ngược (enzyme reverse transcriptase, M-MLV) và mồi oligo dT, được tiến hành trên

máy PCR (Eppendorf, Mỹ). Hỗn hợp mỗi phản ứng PCR gồm: 3 µl mẫu mRNA (0,33 µg/ml), 1µl mồi oligo dT, 0,8 µl M-MLV, 0,2µl RNase inhibitor (chất ức chế ribonuclease), 4 µl dNTP (4 nucleotid cơ bản gồm dATP, dCTP, dGTP và dTTP - 2,5 mM), 4 µl SF buffer (5x) và 5 µl nước DEPC (nước bất hoạt nuclease). Chu trình nhiệt của máy PCR được thiết lập như sau: 25^{o}C trong 10 phút, 37^{o}C trong 60 phút, 98^{o}C trong 5 phút rồi duy trì ở 4^{o}C. Sản phẩm cDNA được bảo quản ở -20^{o}C đến khi sử dụng cho phản ứng realtime PCR.

Phản ứng Real-time PCR

Phản ứng Real-time PCR được tiến hành sử dụng Fast SYBR Green Master Mix và hệ thống StepOne Real-time PCR System® (Applied BioSystem, USA). β-actin được sử dụng làm đối chứng nội chuẩn. Trình tự các cặp mồi cho VEGF, VEGFR2 và β-actin được trình bày trong *Bảng 2.4*. Hỗn hợp phản ứng PCR của mỗi gen đích bao gồm: 2 µl cDNA, 0,4 µl mồi xuôi (10 µM), 0,4µl mồi ngược (10 µM), 10 µl Fast SYBR Green Master Mix và 7,2 µl DEPC. Chu trình nhiệt của máy PCR được thiết lập như sau: 40 chu kỳ với chu trình nhiệt 95^{o}C trong 5 giây, 58^{o}C trong 30 giây, 72^{o}C trong 10 giây và kết thúc ở 4^{o}C. Phân tích đường cong tín hiệu khuếch đại của mỗi gen được thực hiện sau mỗi chu kỳ nhiệt. Đường chuẩn của các gen (hệ số tương quan $R^2 > 0,99$) được tạo ra bằng cách vẽ biểu đồ nồng độ log của mỗi gen so với chu kỳ ngưỡng (C_t).

Bảng 2.4. *Cặp mồi cho các gen mục tiêu trong Real-time PCR.*

Gen	Vị trí	Trình tự mồi
VEGF	mồi xuôi	5'- AGGAGAGATGAGCTTCCTACAG-3'
	mồi ngược	5'-TCACCGCCTTGGCTTGTCACAT-3'
VEGFR2	mồi xuôi	5'-GGGATGGTCCTTGACTACAG-3'
	mồi ngược	5'-ACTGGTAGCCACTGGTCTGG-3'
β-actin	mồi xuôi	5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'
	mồi ngược	5'-ATGGAGCCACCGATCC ACA-3'

Thông số đánh giá: Tỷ lệ biểu hiện gen VEGF/β-actin và tỷ lệ biểu hiện gen VEGFR2/β-actin.

(2) Kỹ thuật Western blot

Biểu hiện protein VEGF và ChAT trong hồi hải mã chuột được đánh giá sử dụng kỹ thuật western blot theo phương pháp đã được mô tả trong công bố trước đây của

Xoan Le và cộng sự [107]. Vùng hồi hải mã chuột được nghiền đồng thể trong đệm ly giải protein. Protein tổng số (20 µg) của mỗi mẫu được tách trên gel SDS-PAGE 12% và chuyển sang màng PVDF (Bio-rad, CA, Hoa Kỳ). Các màng được khóa trong sữa gầy 5% (skim milk) trong 1 giờ ở nhiệt độ thường và sau đó ủ bằng kháng thể đa dòng rabbit VEGF (A-20: sc-152, độ pha loãng 1: 1000, Santa Cruz) hoặc kháng thể đa dòng goat ChAT (AB144P, độ pha loãng 1: 3000, Millipore) và kháng thể đa dòng rabbit β-actin (PA1-183, độ pha loãng 1: 2000, Thermo scientific) ở 4˚C qua đêm. Màng được rửa 3 lần trong dung dịch TBS-T (Tris buffer saline-Tween) 0,1% và sau đó được ủ với kháng thể thứ cấp anti-rabbit hoặc anti-goat tương ứng, được liên kết với horseradish peroxidase (Cell Signalling) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Băng được phát hiện bằng cách sử dụng Amersham ™ ECL ™ Prime (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Phức hợp phản ứng miễn dịch được phát hiện bằng phương pháp chemiluminescence. Các băng phản ứng miễn dịch được phân tích sử dụng phần mềm Image J ver.1.41(NIH).

Thông số đánh giá: Tỷ lệ biểu hiện protein VEGF/ β-actin và tỷ lệ biểu hiện protein ChAT/β-actin.

(3) Xác định hoạt độ acetylcholinesterase (AChE) vỏ não chuột *ex vivo* và *in vitro*

Hoạt độ của acetylcholinesterase (AChE) trong vỏ não chuột được xác định trên cơ sở phương pháp của Ellman và cộng sự, có cải tiến [164], bằng cách sử dụng acetylthiocholin iodid (ATCI, 30 mM; Nacalai Tesque, Kyoto, Nhật Bản) làm chất nền. ATCI tạo phức với acid 5,5´-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB, 10 mM; Sigma, St. Louis, MO, Hoa Kỳ), giáng hóa DTNB thành acid 5-thio-2-nitro-benzoic (TNB). TNB có màu hơi vàng tỷ lệ với hoạt độ AChE và có thể đọc được trong máy quang phổ UV-VIS (HumaReader HS; Human Diagnostics, Wiesbaden, Đức) ở bước sóng 405 nm.

- Trên *ex vivo*

Nguồn enzym được chuẩn bị như sau: Vỏ não chuột được nghiền đồng thể trong 10 lần thể tích dung dịch đệm phosphat lạnh 4ºC (0,1 M, pH 7,4) có chứa 1% Triton-X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA), sau đó ly tâm ở 15.000 × g ở 4ºC trong 20 phút. Hút lấy dịch nổi của các mẫu não (là nguồn enzym), giữ ở nhiệt độ 4ºC.

Chuẩn bị trộn hỗn hợp vào đĩa 96 giếng: Thêm 50 µl dịch nổi hoặc dung dịch PBS chứa 1% Triton-X-100 vào từng giếng (lặp lại trên 2 giếng), dùng pipet 8 kênh để thêm cùng lúc 200 µl dung dịch hỗn hợp (master mix, gồm 20 µl DTNB 10 mM, 20 µl ATCI 30 mM, 160 µl PBS) vào mỗi giếng và trộn đều. Tốc độ thủy phân AChE được đo

kinetic (lắc ở tốc độ cao và đo sau mỗi khoảng thời gian 15 giây) ở bước sóng 405 nm bằng máy Humareader HS trong vòng 3 phút ngay sau khi bổ sung cơ chất, được ước tính bằng sự hình thành dianion thiolat của DTNB ở 25^{o}C [100].

Hoạt độ AChE được biểu thị dưới dạng nmol AChE thủy phân/mg mô/phút. Mỗi mẫu não chuột được tiến hành lặp lại 3 lần.

Thông số đánh giá: Hoạt độ AChE được tính bằng công thức sau:

Hoạt độ AChE (mOD / phút) = (A_{sample} - A_{blank}) x (8/13,6) x 1,5 x 32/100

- Trên *in vitro*

Nguồn enzym: Vỏ não của chuột đực chủng *Swiss albino* được cân và đồng nhất trong 10 lần thể tích dung dịch đệm phosphat 0,1M (pH 7,4) chứa 1% Triton-X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Sau khi ly tâm ở 15.000 × g trong 20 phút, phần dịch nổi được thu thập và dùng làm nguồn enzym AChE. Tất cả các bước được thực hiện ở 4^{o}C.

Thêm 25µl thuốc thử / nước (mẫu trắng) / dung dịch DMSO vào các giếng của đĩa phẳng 96 giếng, thêm tiếp 25µl dung dịch enzym gốc pha loãng 2 lần bằng pipet 8 kênh. Sau đó ủ 20 phút ở 25^{o}C. Phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm 200µl hỗn hợp (bao gồm ATCI, DTNB, PBS).

Phần trăm ức chế hoạt động AChE (I%) được tính bằng công thức sau:

$$I\% = 100 \times (A_c - A_s)/(A_c - A_b)$$

Trong đó A_b, A_s và A_c lần lượt là độ hấp thụ của mẫu trắng (dung môi không có enzym), mẫu thử và mẫu chứng (dung môi có enzym).

Thông số đánh giá: Nồng độ ức chế 50% (IC_{50}): thu được từ đường cong Prism (Graph Pad 5.0, ức chế phụ thuộc liều) [100].

2.2.5.3. Phương pháp sử dụng các chất đối kháng

Để tìm hiểu xem cơ chế chống trầm cảm của cao chiết phân đoạn hương nhu tía tác dụng rõ nhất có liên quan đến hệ noradrenergic và dopaminergic hay không, vào tuần thứ 9 gây mô hình UCMS, chuột được tiêm phúc mạc α-methyl-ρ-tyrosin (AMPT, 100 mg/kg), 1 liều duy nhất 4 giờ trước khi uống mẫu thử. Sau 60 phút, thử nghiệm treo đuôi được thực hiện [165].

Để tìm hiểu xem cơ chế chống trầm cảm của cao chiết phân đoạn hương nhu tía tác dụng rõ nhất có liên quan đến hệ serotonergic hay không, vào tuần thứ 11 gây mô hình UCMS, chuột được tiêm phúc mạc DL-ρ-chlorophenylalanin (PCPA, 80 mg/kg/ngày, 4 ngày liên tiếp trước thử nghiệm treo đuôi - TST). Trong ngày thử nghiệm,

sau tiêm PCPA 30 phút, chuột uống mẫu thử và sau 60 phút tiến hành TST [165].

2.3. Thiết kế nghiên cứu

2.3.1. Nghiên cứu tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của hương nhu tía

2.3.1.1. Nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ của cao chiết cồn hương nhu tía (OS) trên mô hình chuột nhắt loại bỏ thùy khứu giác (Olfactory bulbectomy - OBX)

Chuột nhắt trắng được nuôi ổn định ít nhất một tuần trong phòng chăn nuôi với điều kiện nghiên cứu, chia ngẫu nhiên thành 5 lô:

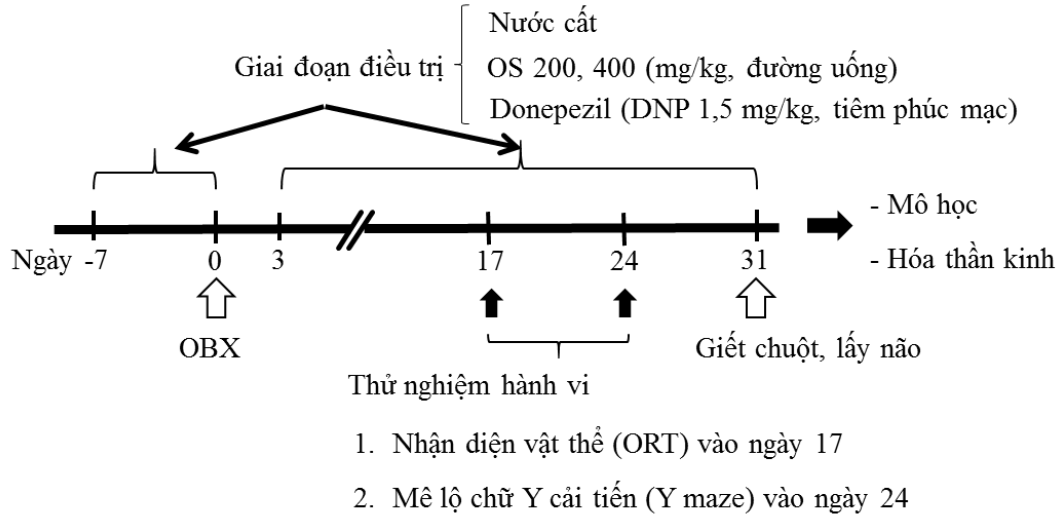
+ Lô chứng sinh lý: uống nước cất.

+ Lô chứng bệnh lý (OBX): gây mô hình OBX không được điều trị, uống nước cất.

+ Các lô thử: gây mô hình OBX, uống cao toàn phần (OS) được phân tán đồng nhất trong nước cất, với hai mức liều thử 200 mg/kg (OS 200) và 400 mg/kg (OS 400).

+ Lô chứng dương (DNP): gây mô hình OBX, tiêm phúc mạc donepezil hòa tan trong NaCl 0,9% với liều 1,5 mg/kg.

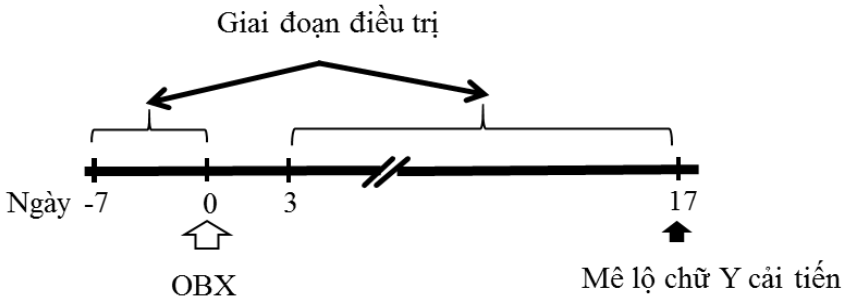
Chuột được dùng thuốc 1 lần/ngày từ trước phẫu thuật OBX 7 ngày cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Trong vòng 3 ngày sau phẫu thuật OBX chuột được tạm ngừng thuốc. Lượng thuốc dùng cho chuột là 0,1 ml/10 g thể trọng. Các thử nghiệm hành vi đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ bao gồm thử nghiệm nhận diện vật thể và mê lộ chữ Y cải tiến được tiến hành lần lượt vào ngày thứ 17 và 24 sau phẫu thuật. Sau khi kết thúc thử nghiệm hành vi, thu não chuột để đánh giá mô bệnh học và hóa học thần kinh *(Hình 2.13.)*.



Hình 2.13. *Sơ đồ thiết kế nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ của cao chiết cồn toàn phần hương nhu tía (OS)*

2.3.1.2. Đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ của các cao chiết phân đoạn hương nhu tía trên mô hình OBX

Tương tự, thí nghiệm đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ của các cao chiết phân đoạn hương nhu tía được thiết kế theo sơ đồ sau *(Hình 2.14.)*:



Hình 2.14. *Sơ đồ thiết kế thí nghiệm đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ của các cao chiết phân đoạn hương nhu tía*

Trong đó:

- Đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ của cao OS và các cao chiết phân đoạn n-hexan (OS-H), ethyl acetat (OS-E) và n-butanol (OS-B) của hương nhu tía

Thí nghiệm được thiết kế tương tự giai đoạn trước, mẫu thử là cao OS và các cao chiết phân đoạn (OS-H, OS-E, OS-B), được phân tán đồng nhất trong nước cất, cho chuột uống liều 400 mg/kg.

Từ đó, tìm được phân đoạn cao chiết có tác dụng cải thiện trí nhớ rõ nhất.

- Đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ với 2 mức liều của cao OS-E (phân đoạn có tác dụng rõ nhất)

Thí nghiệm được thiết kế tương tự giai đoạn trước, mẫu thử là cao OS-E được phân tán đồng nhất trong nước, cho chuột uống với 2 mức liều 200 mg/kg (OS-E 200) và 400 mg/kg (OS-E 400).

2.3.1.3. Nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ của các hoạt chất tiềm năng trong hương nhu tía (acid ursolic và acid oleanolic) trên mô hình OBX

Các hoạt chất tiềm năng (có hàm lượng cao trong phân đoạn có tác dụng rõ nhất) được tiếp tục nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ. Thí nghiệm được thiết kế như sau *(Hình 2.15.)*:

Trong đó:

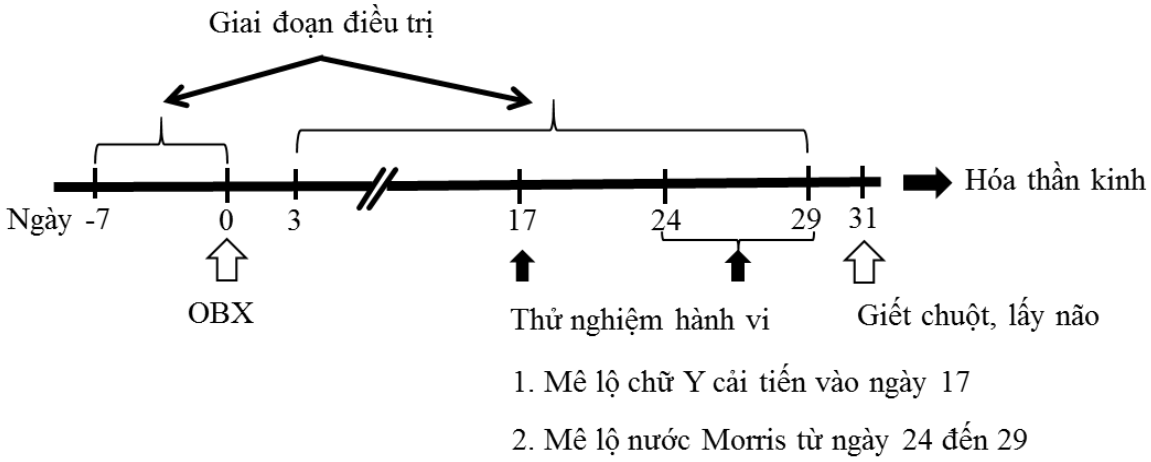
- Nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ của acid ursolic

Mẫu thử là acid ursolic được phân tán đồng nhất trong nước cất chứa 0,1% (tt/tt)

Tween 80, cho chuột uống với 2 mức liều 6 mg/kg (UA 6) và 12 mg/kg (UA 12).

- Nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ của acid oleanolic

Mẫu thử là acid oleanolic được được phân tán đồng nhất trong nước cất chứa 0,1 % (tt/tt) Tween 80, cho chuột uống với 3 mức liều 6 mg/kg (OA 6); 12 mg/kg (OA 12) và 24 mg/kg (OA 24).



Hình 2.15. *Sơ đồ thiết kế nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ của các chất phân lập tiềm năng từ hương nhu tía*

2.3.2. Nghiên cứu tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía

2.3.2.1. Đánh giá tác dụng chống trầm cảm của cao OS và các cao chiết phân đoạn (n-hexan, OS-H; ethyl acetat, OS-E; n-butanol, OS-B) của hương nhu tía trên mô hình chuột nhắt loại bỏ thùy khứu giác (OBX)

Tiếp tục sử dụng mô hình OBX, thí nghiệm đánh giá tác dụng chống trầm cảm của cao OS và các cao chiết phân đoạn được thiết kế theo sơ đồ sau *(Hình 2.16.)*:

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 7 lô như sau:

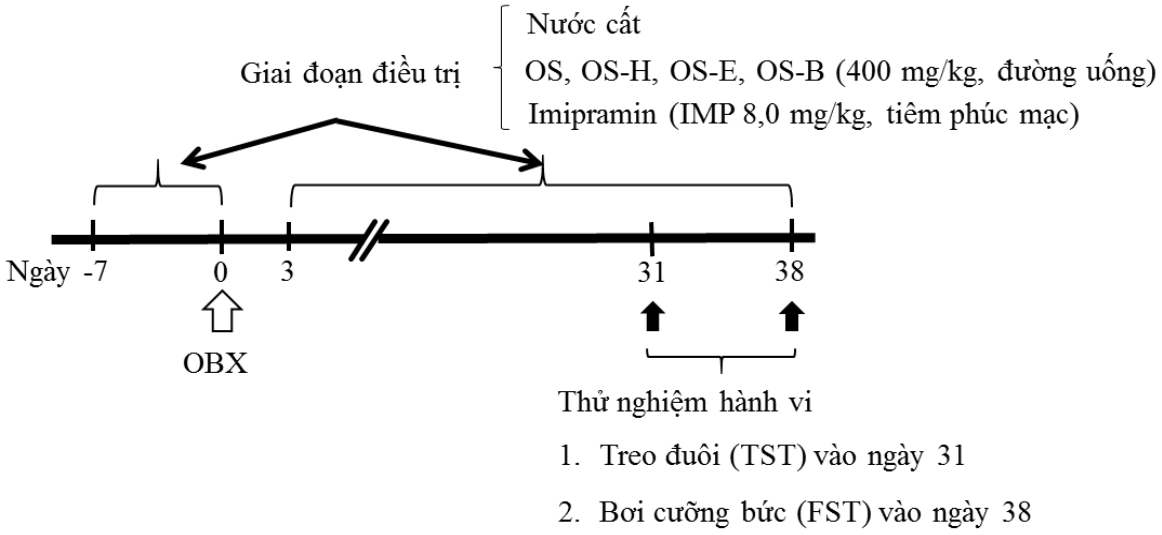
+ Lô chứng sinh lý

+ Lô chứng bệnh lý (OBX)

+ Các lô thử: gây mô hình OBX, uống cao OS và các cao chiết phân đoạn (OS-H, OS-E, OS-B), được phân tán đồng nhất trong nước cất, với liều 400 mg/kg.

+ Lô chứng dương (IMP): gây mô hình OBX, tiêm phúc mạc imipramin hòa tan trong NaCl 0,9%, với liều 8,0 mg/kg.

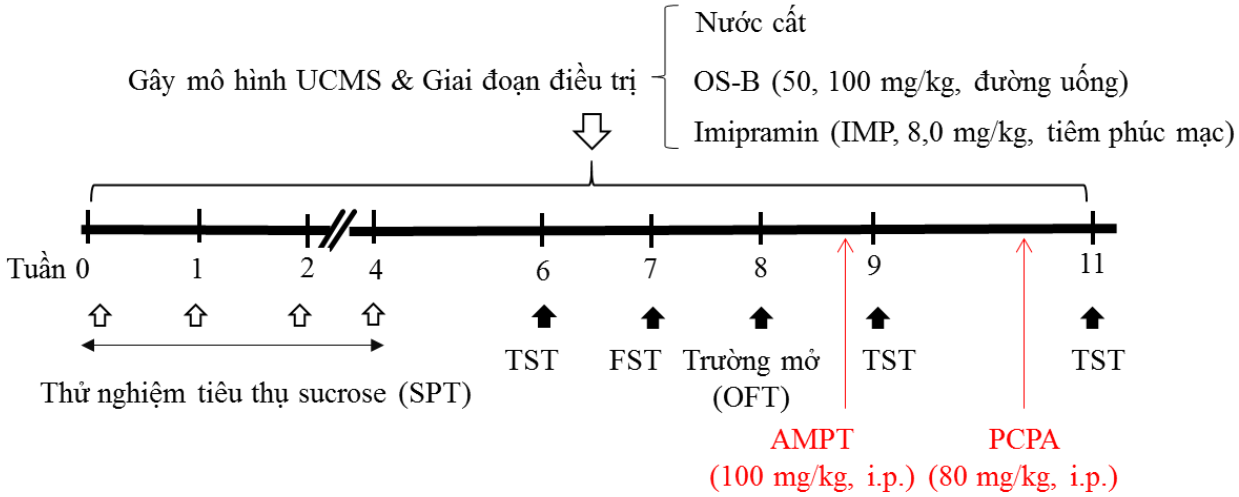
Lượng thuốc dùng cho chuột là 0,1 ml/10 g thể trọng.



Hình 2.16. *Sơ đồ thiết kế thí nghiệm đánh giá tác dụng chống trầm cảm của các cao chiết phân đoạn hương nhu tía trên mô hình OBX*

2.3.2.2. Nghiên cứu tác dụng chống trầm cảm của cao chiết phân đoạn tiềm năng (OS-B) trên mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS)

Sử dụng mô hình UCMS để nghiên cứu tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm ở 2 mức liều thấp hơn của cao OS-B (cao chiết phân đoạn có tác dụng rõ nhất). Thí nghiệm được thiết kế theo sơ đồ sau *(Hình 2.17.)*:



Hình 2.17. *Sơ đồ thiết kế nghiên cứu tác dụng chống trầm cảm của cao chiết phân đoạn n-butanol hương nhu tía (OS-B) trên mô hình UCMS*

Thí nghiệm được thiết kế tương tự giai đoạn trước, mẫu thử là cao OS-B được phân tán đồng nhất trong nước cất, cho chuột uống với 2 mức liều 50 mg/kg (OS-B 50) và 100 mg/kg (OS-B 100).

Thử nghiệm tiêu thụ saccharose được tiến hành hàng tuần từ tuần 0 đến tuần 4; tuần 6, 7, 8 thực hiện các thử nghiệm hành vi; tuần 9 và tuần 11 thực hiện thử nghiệm dược lý sử dụng chất đối kháng.

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu thu được từ thử nghiệm nhận diện vật thể được phân tích sử dụng phương pháp paired Student's t-test. Số liệu của các thử nghiệm hành vi mê lộ chữ Y cải tiến, treo đuôi, bơi cưỡng bức, môi trường mở, tiêu thụ saccharose và các thí nghiệm mô, hóa học thần kinh được phân tích sử dụng phương pháp phân tích phương sai một nhân tố (one-way analysis of variance, one-way ANOVA), hậu kiểm (*post hoc* test) bằng Student-Newman-Keul's method. Số liệu của thử nghiệm mê lộ nước Morris được phân tích sử dụng phương pháp phân tích phương sai hai nhân tố (two-way analysis of variance, two-way ANOVA), hậu kiểm (*post hoc* test) bằng Student-Newman-Keul's method. Giá trị $p < 0,05$ thì sự khác biệt giữa các mẫu so sánh được coi là đạt ý nghĩa thống kê. Các phép phân tích thống kê này được thực hiện trên phần mềm phân tích chuyên dụng Sigma Plot 14.0.

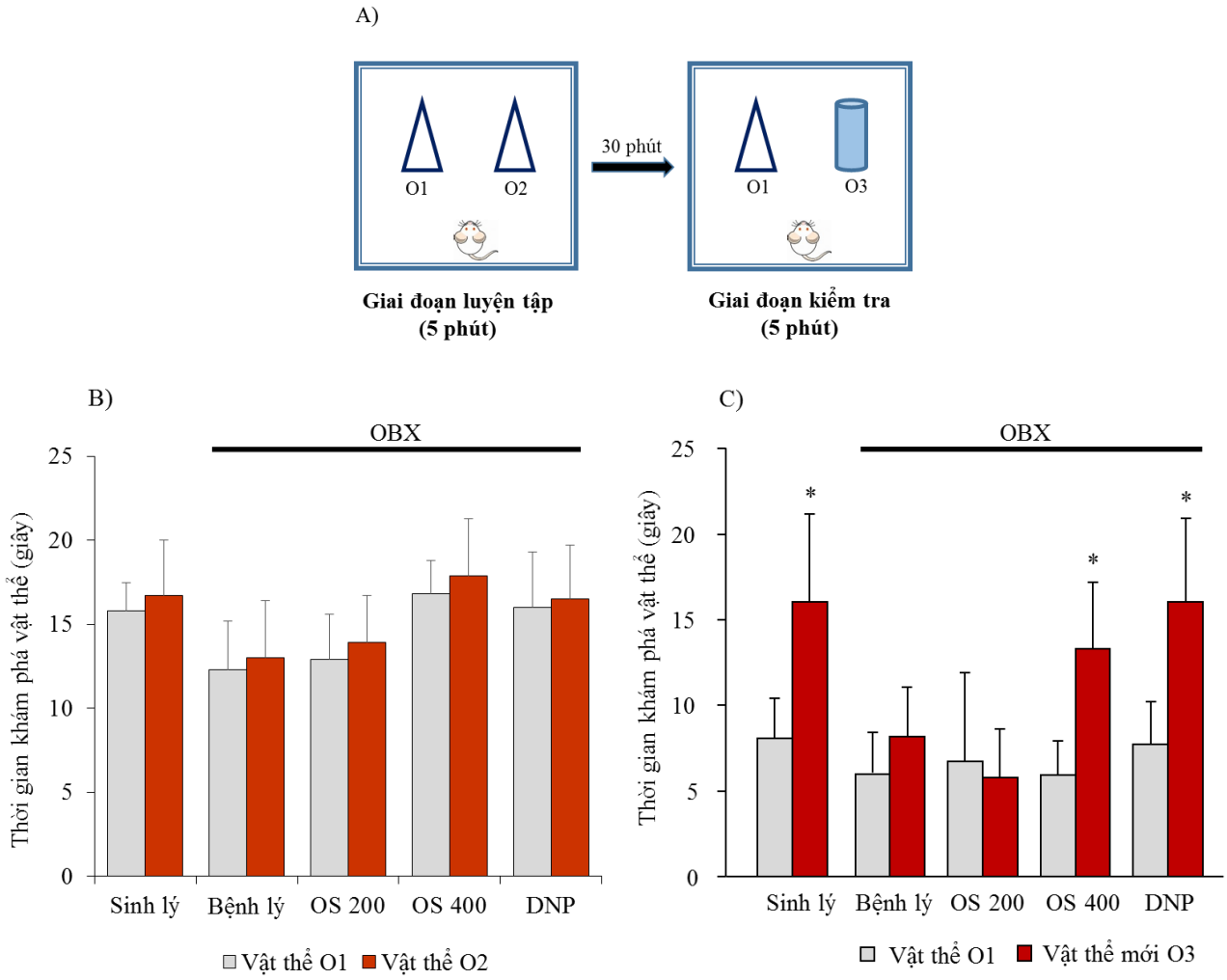
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

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 nhận diện vật thể của chuột OBX

Thử nghiệm nhận diện đồ vật (ORT) đã được sử dụng để làm sáng tỏ tác động của OS đối với trí nhớ nhận diện vật thể, một loại trí nhớ làm việc không liên quan đến không gian (non-spacial working memory) trên chuột OBX *(Hình 3.1.)*.



Hình 3.1. *Ảnh hưởng của cao OS lên trí nhớ làm việc của chuột OBX trong thử nghiệm thử nghiệm nhận diện vật thể (ORT).*

*(A) Sơ đồ thử nghiệm ORT; (B) Thời gian khám phá vật thể O1, O2 giai đoạn luyện tập; (C) Thời gian khám phá vật thể O1, O3 giai đoạn kiểm tra (*p < 0,05 khi so sánh với thời gian khám phá vật thể tương tự O1, n = 9-12) (so sánh giá trị trung bình ± SEM, kiểm định paired Student's t-test)*

Ở giai đoạn luyện tập, thời gian khám phá hai vật thể tương tự O1 và O2 của các lô chuột sinh lý, bệnh lý và các lô chuột điều trị bằng cao OS và DNP là không có sự

khác biệt ($p > 0,05$) *(Hình 3.1B.).*

Ở giai đoạn kiểm tra, kết quả được trình bày ở *Hình 3.1C.* như sau:

- Lô chứng sinh lý có thời gian khám phá vật thể mới O3 dài hơn đáng kể so với thời gian khám phá vật thể tương tự O1 ($p = 0,011 < 0,05$).

- Lô chuột OBX không được điều trị có thời gian khám phá vật thể mới và vật thể tương tự không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê, chứng tỏ chuột OBX đã bị suy giảm trí nhớ nhận diện vật thể ($p = 0,291 > 0,05$).

- Chuột OBX được điều trị bằng DNP (1,5 mg/kg/ngày, i.p) đã dành nhiều thời gian hơn đáng kể để khám phá đối tượng mới O3 so với đối tượng quen thuộc O1 ($p = 0,016 < 0,05$), chứng tỏ DNP có tác dụng cải thiện suy suy giảm trí nhớ nhận diện vật thể trên chuột OBX.

- Điều trị hàng ngày bằng OS (liều 200 và 400 mg/kg/ngày, p.o) cho tác dụng cải thiện trí nhớ nhận diện vật thể trên chuột OBX phụ thuộc liều. Ở liều thấp 200 mg/kg, tác dụng kéo dài thời gian khám phá vật thể mới của OS trên chuột OBX không đạt ý nghĩa thống kê ($p = 0,507 > 0,05$). Trong khi OS 400 mg/kg làm tăng rõ rệt thời gian khám phá vật thể mới O3 so với vật thể tương tự O1 ($p = 0,013 < 0,05$).

Như vậy, kết quả này cho thấy OS ở mức liều 400 mg/kg/ngày có tác dụng cải thiện sự suy giảm trí nhớ làm việc không liên quan đến không gian do OBX gây ra, tương tự với tác dụng của chứng dương DNP ở liều 1,5 mg/kg/ngày.

3.1.1.2. Tác dụng của OS lên trí nhớ không gian ngắn hạn của chuột OBX

Thử nghiệm mê lộ chữ Y nhằm mục đích đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ làm việc liên quan đến không gian (spatial working memory) của cao OS trên chuột OBX. Kết quả được biểu diễn dưới dạng biểu đồ cột trong *Hình 3.2*.

Trong giai đoạn kiểm tra, kết quả thể hiện ở *Hình 3.2B* như sau:

- Tỷ lệ thời gian mà lô sinh lý dành để khám phá cánh mới B ở giai đoạn kiểm tra so với thời gian khám phá hai cánh quen thuộc A, C chiếm xấp xỉ 50%, cao hơn mức cơ hội (xác suất để chuột vào 1 trong 3 cánh ngẫu nhiên là 33,3%), chỉ ra sở thích ưa mới lạ hơn là quen thuộc của loài gặm nhấm.

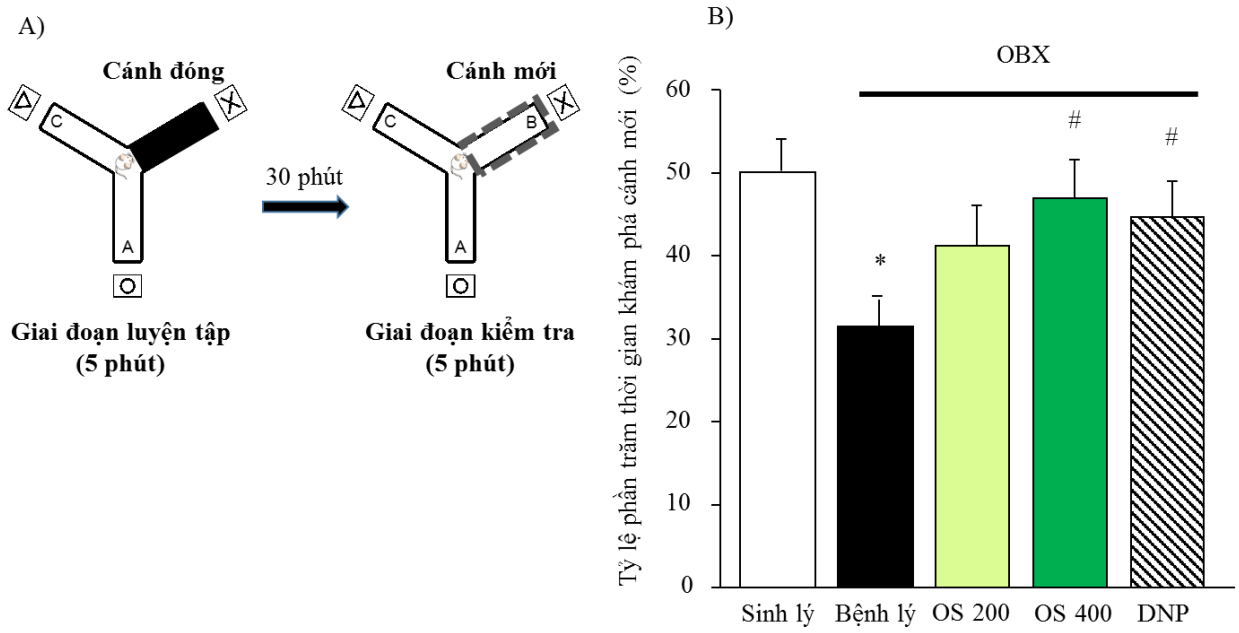
- Chuột OBX không được điều trị có tỷ lệ thời gian khám phá cánh mới chỉ ngang mức cơ hội, ngắn hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p = 0,013 < 0,05$), cho thấy mất đi thùy khứu giác làm chuột bị suy giảm trí nhớ làm việc liên quan đến không gian.

- Điều trị bằng DNP (1,5 mg/kg/ngày) đã kéo dài đáng kể thời gian khám phá

cánh mới của chuột OBX so với lô bệnh lý không được điều trị ($p = 0,034 < 0,05$), chứng tỏ DNP có tác dụng ngăn chặn sự suy giảm trí nhớ không gian ngắn hạn trên chuột OBX.

- Điều trị hàng ngày bằng OS (liều 200 và 400 mg/kg/ngày, p.o) cho tác dụng cải thiện trí nhớ không gian ngắn hạn trên chuột OBX phụ thuộc liều. Thời gian khám giá cánh mới của chuột được điều trị bằng OS liều 200 mg/kg có xu hướng kéo dài hơn nhưng chưa đạt ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý ($p = 0,085 > 0,05$). OS liều 400 mg/kg đã làm tăng thời gian khám phá cánh mới trên chuột OBX cao hơn rõ rệt so với lô bệnh lý ($p = 0,038 < 0,05$)

- Như vậy, OS ở mức liều 400 mg/kg/ngày có tác dụng cải thiện trí nhớ làm việc liên quan đến không gian của chuột OBX, tương tự với DNP ở liều 1,5 mg/kg/ngày.

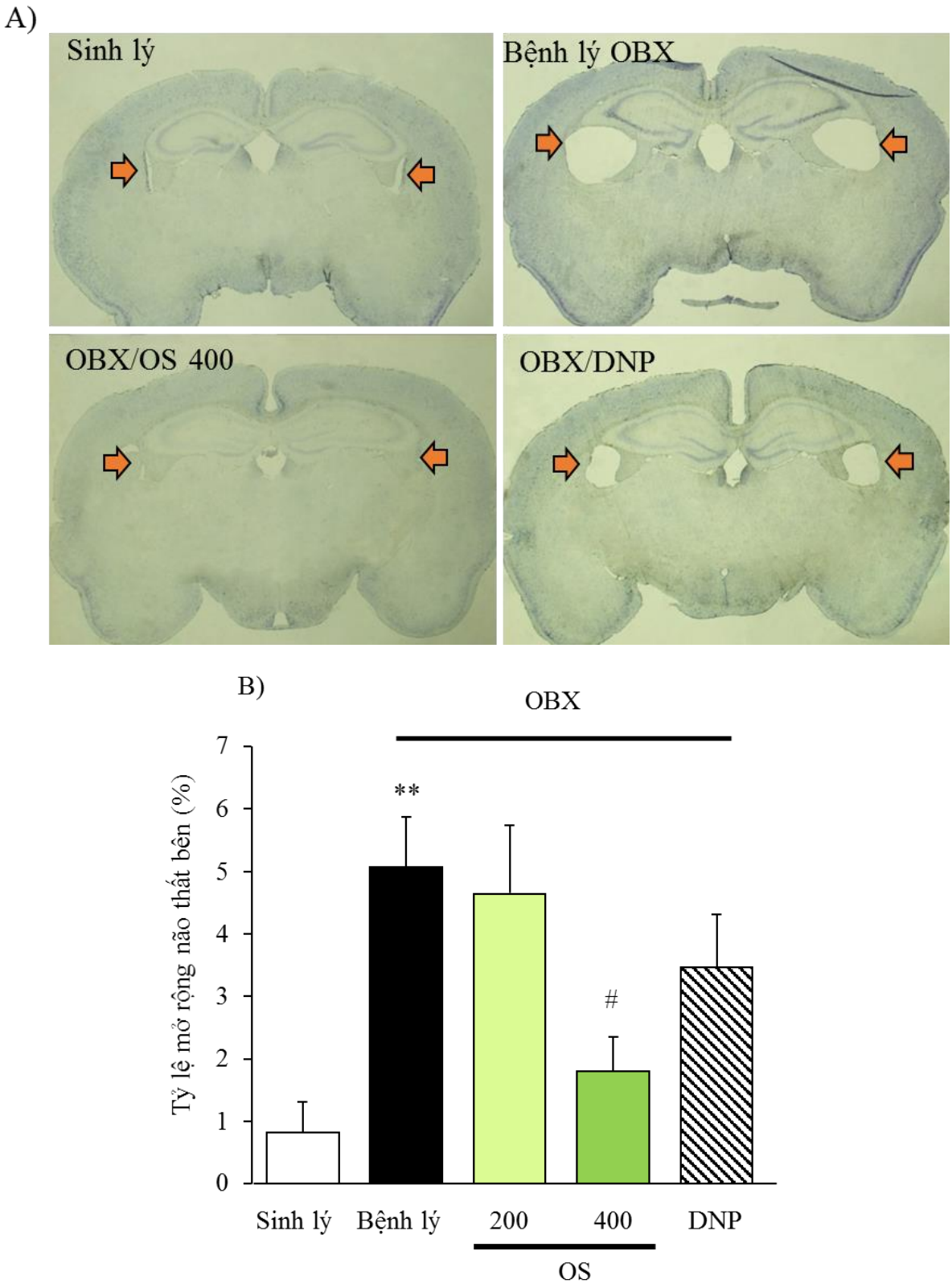


Hình 3.2. *Ảnh hưởng của cao OS lên trí nhớ không gian ngắn hạn của chuột OBX trong thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến.*

*(A) Sơ đồ thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến; (B) Tỷ lệ phần trăm khám phá cánh mới B của các lô trong giai đoạn kiểm tra (*p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý OBX, n = 9-12). (one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).*

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

Nghiên cứu tiến hành khảo sát tác động của OBX đến tình trạng của não thất bên cũng như ảnh hưởng của việc sử dụng lâu dài OS và chất ức chế cholinesterase DNP trên chuột OBX. Kết quả được chỉ ra trong *Hình 3.3.*



Hình 3.3. *Tỷ lệ mở rộng não thất bên của các lô*

*(A) Hình ảnh chụp tiêu bản não chuột ở vị trí ≈−1.46 mm so với vùng bregma quan sát dưới kính hiển vi, mũi tên chỉ khoảng rỗng ở não thất; (B) Đồ thị biểu diễn tỷ lệ diện tích não thất bên trên tổng diện tích não (*p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n=3-5). (one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).*

- Chuột OBX có kích thước não thất bên tăng rõ rệt so với chuột sinh lý (p = 0,006 < 0,01), chứng tỏ việc loại bỏ thùy khứu giác đã gây ra hiện tượng giãn não thất bên ở chuột.

- Lô chuột OBX được điều trị bằng DNP 1,5 mg/kg/ngày có tỷ lệ giãn não thất bên ít hơn lô bệnh lý nhưng chưa đạt ý nghĩa thống kê (p = 0,693 > 0,05).

- Ở liều thấp 200 mg/kg/ngày, cao OS không ảnh hưởng đáng kể đến kích thước não thất bên của chuột OBX (p = 0,693 > 0,05). Tuy nhiên, ở mức liều 400 mg/kg, cao OS đã làm giảm hơn 50% kích thước não thất bên so với chuột OBX không được điều trị (p = 0,023 < 0,05).

Như vậy, OBX gây giãn rộng não thất bên ở chuột và điều trị lâu dài bằng OS liều 400 mg/kg/ngày cho thấy tác dụng ngăn chặn đáng kể tình trạng mở rộng não thất bên do OBX gây ra, trong khi thuốc ức chế cholinesterase DNP liều 1,5 mg/kg/ngày không thể hiện rõ tác dụng này.

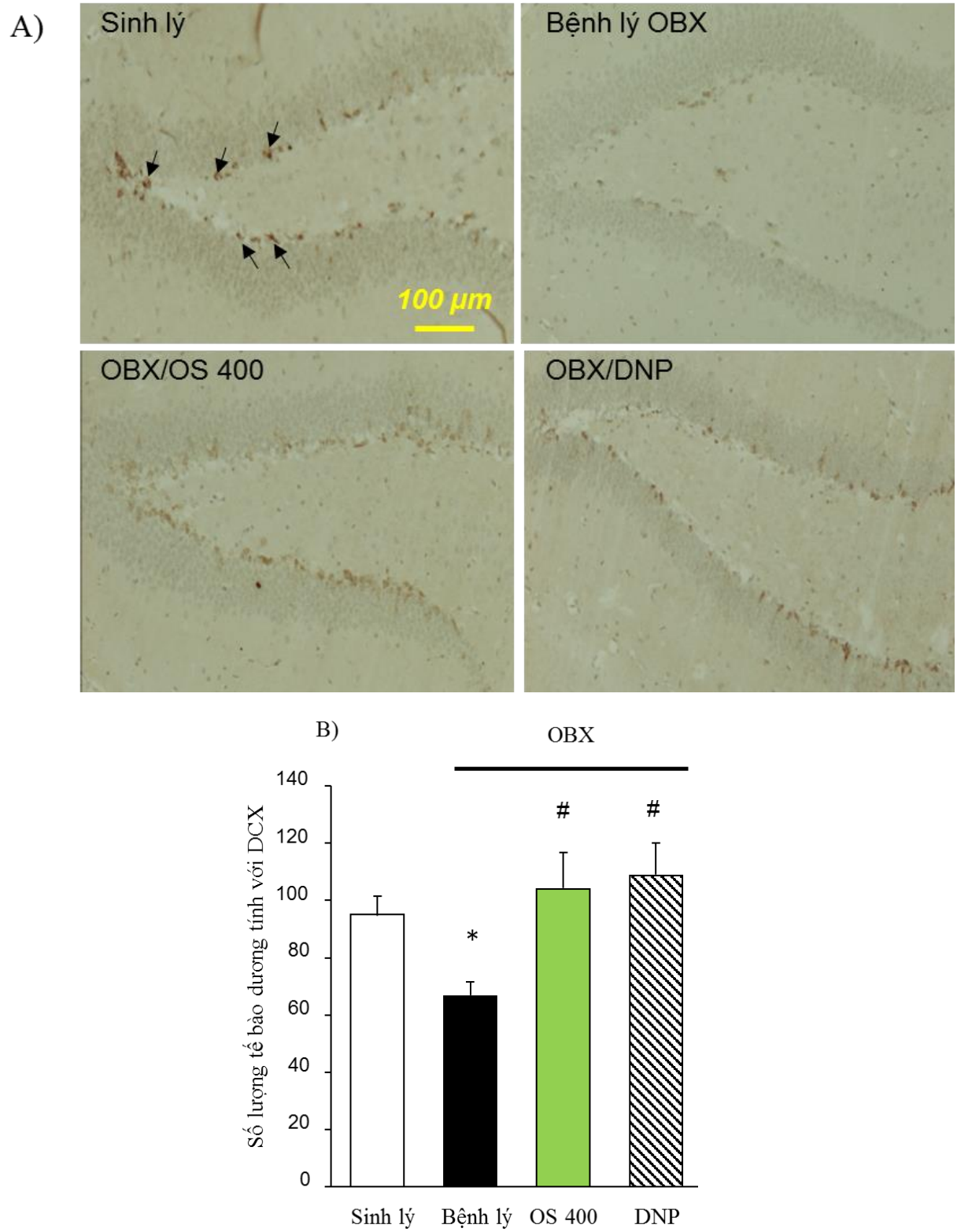
3.1.1.4. Ảnh hưởng của cao OS đến sự tăng sinh tế bào thần kinh mới vùng hồi hải mã trên chuột OBX

Nghiên cứu đánh giá mức độ ảnh hưởng của OBX đến quá trình hình thành thần kinh mới ở hồi hải mã, cũng như tác động của cao OS và DNP lên quá trình này đã được tiến hành, sử dụng chỉ dấu doublecortin (DCX) - chỉ dấu của tế bào thần kinh mới sinh. Bằng phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch với kháng thể kháng DCX, số lượng tế bào dương tính với DCX (tế bào DCX – bắt màu nâu) trong vùng hồi răng (dentate gyrus) của hồi hải mã trong các lô chuột nghiên cứu được đếm và so sánh. Kết quả được trình bày ở *Hình 3.4* như sau:

- Số lượng tế bào DCX đã giảm đáng kể ở lô chuột OBX so với lô sinh lý (p = 0,044 < 0,05), chứng tỏ có sự suy giảm quá trình hình thành tế bào thần kinh hồi hải mã ở chuột OBX.

- Trong khi đó, lô chuột OBX sử dụng DNP (1,5 mg/kg/ngày) có số lượng tế bào DCX cao hơn rõ rệt so với lô chuột OBX không được điều trị (p = 0,035 < 0,05). Tương tự, lô chuột OBX được uống OS liều 400 mg/kg/ngày có số lượng tế bào DCX cao hơn đáng kể so với lô chuột OBX không được điều trị (p = 0,019 < 0,05).

Như vậy, điều trị bằng OS 400 mg/kg/ngày và DNP 1,5 mg/kg/ngày đã cải thiện rõ rệt tình trạng suy giảm hình thành tế bào thần kinh mới ở hồi hải mã chuột do OBX gây ra.



Hình 3.4. *Số lượng tế bào dương tính với doublecortin (DCX) ở vùng hồi răng hồi hải mã của các lô*

*(A) Hình ảnh chụp tiêu bản não chuột quan sát dưới kính hiển vi, Scale bar = 100 µm, bregma ≈ −1.70 mm, mũi tên chỉ các tế bào dương tính DCX bắt màu nâu; (B) Đồ thị biểu diễn số lượng tế bào dương tính với DCX (*p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n=4-5). (one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).*

3.1.1.5. Ảnh hưởng của cao OS lên số lượng tế bào dương tính với cholin acetyltransferase (ChAT) của vùng vách giữa (media septum) trong não chuột OBX

Nhằm tìm hiểu cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của cao OS thông qua hệ cholinergic, bằng phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch sử dụng kháng thể ChAT (enzym tổng hợp chất dẫn truyền thần kinh acetylcholin), số lượng tế bào dương tính với ChAT (tế bào ChAT – bắt màu nâu) vùng vách giữa của chuột OBX đã được đếm và so sánh giữa các lô nghiên cứu. Kết quả được trình bày ở *Hình 3.5*.

- Chuột OBX không được điều trị có số lượng tế bào ChAT giảm gần 50% so với chứng sinh lý ($p = 0,002 < 0,01$), chứng tỏ có sự suy giảm rõ rệt tế bào cholinergic trong não chuột.

- Chuột OBX được điều trị bằng DNP liều 1,5 mg/kg/ngày có số lượng tế bào ChAT nhiều hơn đáng kể so với lô bệnh lý không được điều trị ($p = 0,017 < 0,05$).

- Chuột OBX được điều trị bằng OS liều 200 mg/kg/ngày có số lượng tế bào ChAT cao hơn chuột OBX không được điều trị, tuy nhiên sự khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p = 0,103 > 0,05$). OS với mức liều cao 400 mg/kg/ngày đã làm tăng rõ rệt số lượng tế bào ChAT trên chuột OBX ($p = 0,022 < 0,05$).

Như vậy, OBX đã gây suy giảm số lượng tế bào ChAT vùng vách giữa và OS ở mức liều 400 mg/kg/ngày cũng như DNP liều 1,5 mg/kg/ngày có tác dụng cải thiện tình trạng suy giảm chức năng hệ cholinergic này trên chuột OBX.

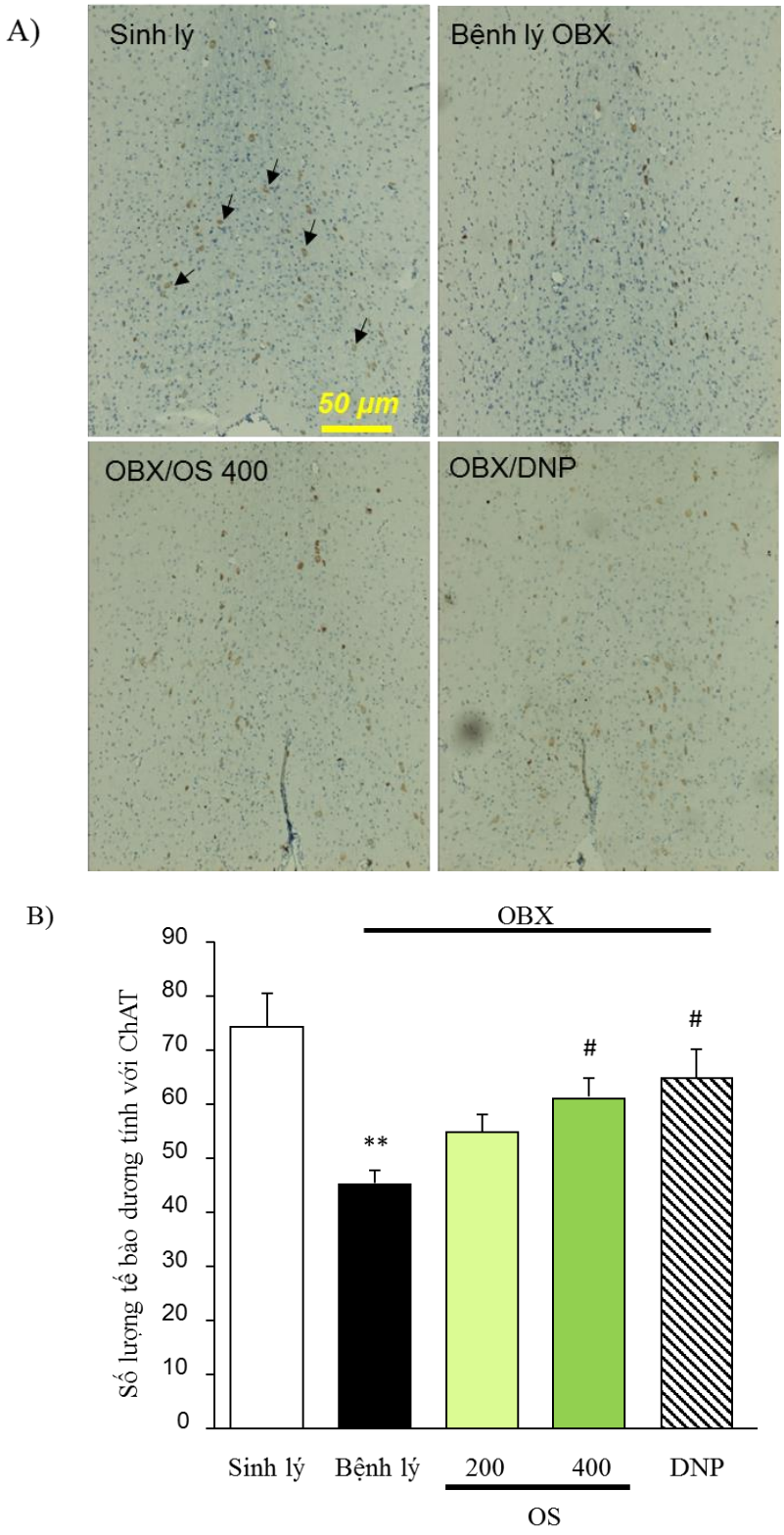
3.1.1.6. Ảnh hưởng của cao OS đến hoạt độ của acetylcholinesterase (AChE) ở vỏ não chuột OBX

Cũng trên hệ cholinergic, để tìm hiểu cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của OS có thông qua việc ức chế hoạt độ AChE (enzym thủy phân acetylcholin), từ đó làm tăng acetylcholin nội sinh não tương tự DNP hay không, hoạt độ AChE trong vỏ não chuột đã được đánh giá trên *ex vivo*. Kết quả ở *Hình 3.6.* chỉ ra rằng:

- Hoạt độ AChE vỏ não của lô sinh lý và lô OBX không được điều trị không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê ($p = 0,152 > 0,05$).

- Hoạt độ AChE vỏ não của các lô chuột OBX được điều trị bằng DNP thấp hơn đáng kể so với lô bệnh lý không được điều trị ($p = 0,046 < 0,05$).

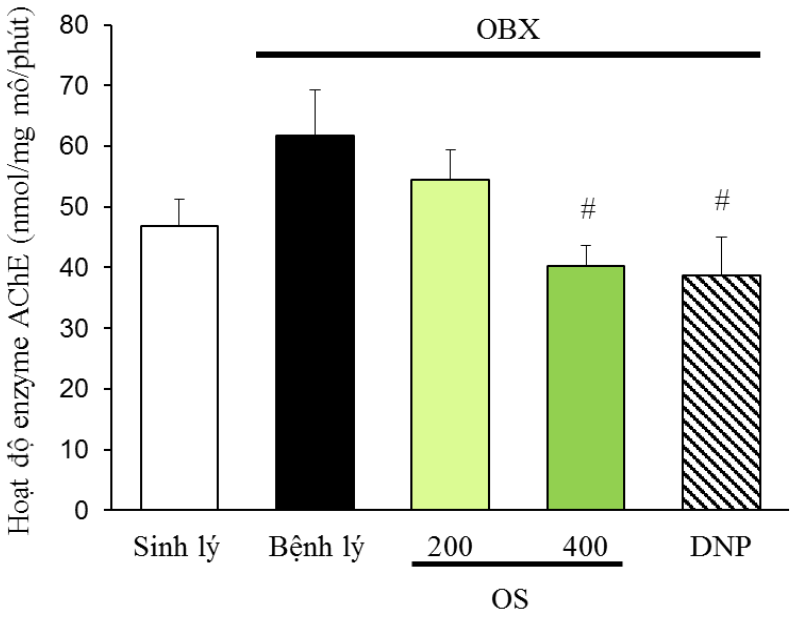
- OS ở mức liều thấp 200 mg/kg có xu hướng làm giảm hoạt độ AChE trong não chuột nhưng chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tuy nhiên, ở mức liều OS 400 mg/kg, hoạt độ AChE trong não chuột đã thấp hơn rõ rệt so với lô bệnh lý ($p = 0, 037 < 0,05$).



Hình 3.5. *Số lượng tế bào dương tính với cholin acetyltransferase (ChAT) ở vách giữa của các lô*

*(A) Hình ảnh chụp tiêu bản não chuột quan sát dưới kính hiển vi, Scale bar = 50µm, bregma ≈ +0.98mm (2-3 lát cắt não/1 chuột), mũi tên chỉ các tế bào dương tính với ChAT bắt màu nâu; (B) Đồ thị biểu diễn số lượng tế bào dương tính với ChAT (**p < 0,01 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n = 3-4). (one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).*

Như vậy, OS liều 400 mg/kg/ngày, đường uống cho thấy tác dụng ức chế AChE *ex vivo* hiệu quả tương tự với thuốc chứng dương DNP liều 1,5 mg/kg/ngày.



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

(#p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n=5-7).

(one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).

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

Nghiên cứu cho thấy, có mối liên kết chặt chẽ giữa hệ cholinergic và tín hiệu VEGF trong não, góp phần bảo vệ thần kinh và chống lại chứng sa sút trí tuệ [26, 166]. Do đó, nghiên cứu tiến hành đánh giá ảnh hưởng của OS lên biểu hiện gen VEGF và VEGFR2 vùng hồi hải mã của chuột OBX, sử dụng kỹ thuật Real time PCR.

Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện gen VEGF được chỉ ra trong *Hình 3.7A.* như sau:

- Mức độ biểu hiện gen của VEGF trong hồi hải mã chuột OBX bị giảm rõ rệt so với lô sinh lý ($p = 0,047 < 0,05$).

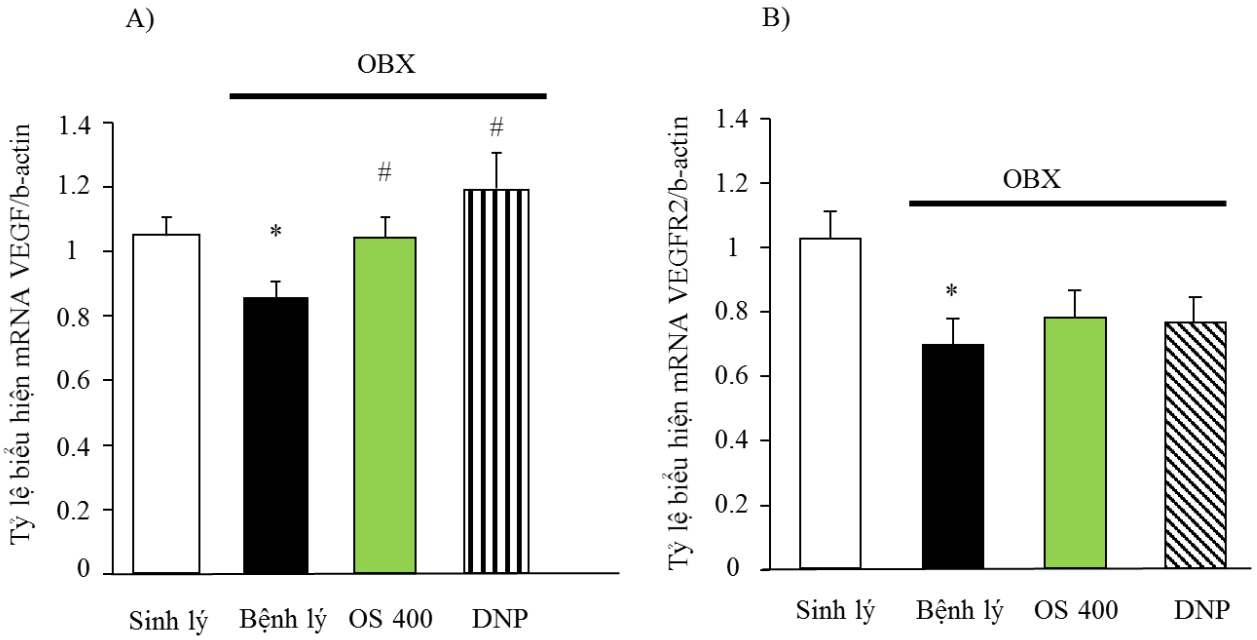
- Chuột OBX được điều trị bằng DNP (1,5 mg/kg/ngày, i.p) có biểu hiện gen VEGF cao hơn đáng kể so với chuột OBX không được điều trị ($p = 0,018 < 0,05$)

- Chuột OBX được uống OS liều 400 mg/kg/ngày có biểu hiện gen VEGF tăng lên rõ rệt so với lô bệnh lý ($p = 0,033 < 0,05$).

Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện gen VEGFR2 được chỉ ra trong *Hình 3.7B.* như sau:

- Mức độ biểu hiện gen của thụ thể VEGFR2 trong hồi hải mã chuột OBX bị giảm đáng kể so với lô sinh lý ($p = 0,029 < 0,05$).

- Chuột OBX được điều trị bằng OS 400 mg/kg/ngày và DNP 1,5 mg/kg/ngày đều không làm thay đổi đáng kể biểu hiện của VEGFR2 so với lô bệnh lý ($p = 0,239 > 0,05$).



Hình 3.7. *Ảnh hưởng của OS lên mức độ biểu hiện gen VEGF và VEGFR2 trong hồi hải mã chuột OBX sử dụng kỹ thuật Real time PCR: (A) biểu hiện gen VEGF; (B) biểu hiện gen VEGFR2*

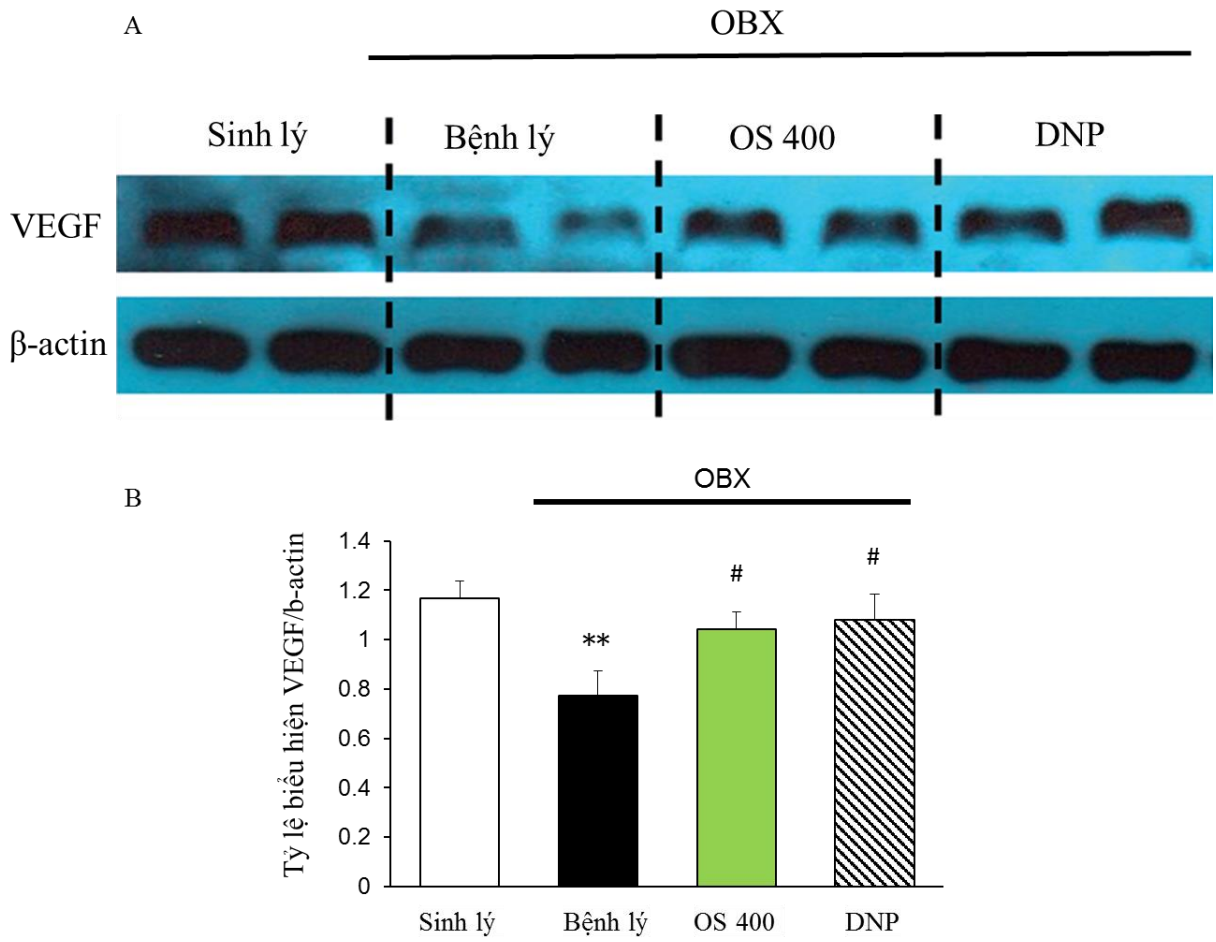
*Mức độ biểu hiện của các gen đích được hiệu chuẩn (normalization) theo mức độ biểu hiện của β-actin trước khi đem so sánh giữa các lô chuột (*p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý OBX, n=6-7). (one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).*

Để tìm hiểu mức độ biểu hiện gen VEGF có tương đồng với mức độ biểu hiện protein hay không, biểu hiện của protein VEGF trong hồi hải mã đã được xác định bằng kỹ thuật Western blot (WB).

Kết quả ở *Hình 3.8.* cho thấy:

- Lô bệnh lý OBX đã giảm đáng kể biểu hiện protein VEGF trong hồi hải mã khi so sánh với lô chứng sinh lý ($p = 0,007 < 0,01$).

- Ở chuột OBX được điều trị bằng OS (400 mg/kg/ngày) cũng như DNP (1,5 mg/kg/ngày), biểu hiện protein VEGF đã tăng lên đáng kể so với chuột OBX không được điều trị (tương ứng $p = 0,019$; $p = 0,022 < 0,05$).



Hình 3.8. *Ảnh hưởng của OS lên biểu hiện protein VEGF trong hồi hải mã chuột dùng phương pháp Western blot*

*(A) Hình ảnh đại diện của phân tích dữ liệu WB; (B) Đồ thị phân tích so sánh mức độ biểu hiện protein VEGF. Mức độ biểu hiện của các protein đích được hiệu chuẩn (normalization) theo mức độ biểu hiện của β-actin trước khi đem so sánh giữa các nhóm chuột nghiên cứu (**p < 0,01 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý OBX, n=5).*

(one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).

Như vậy, 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

Để làm rõ các thành phần hóa học đóng góp vai trò chính trong tác dụng cải thiện trí nhớ của OS, trước tiên nghiên cứu sàng lọc tác dụng cải thiện trí nhớ của các cao

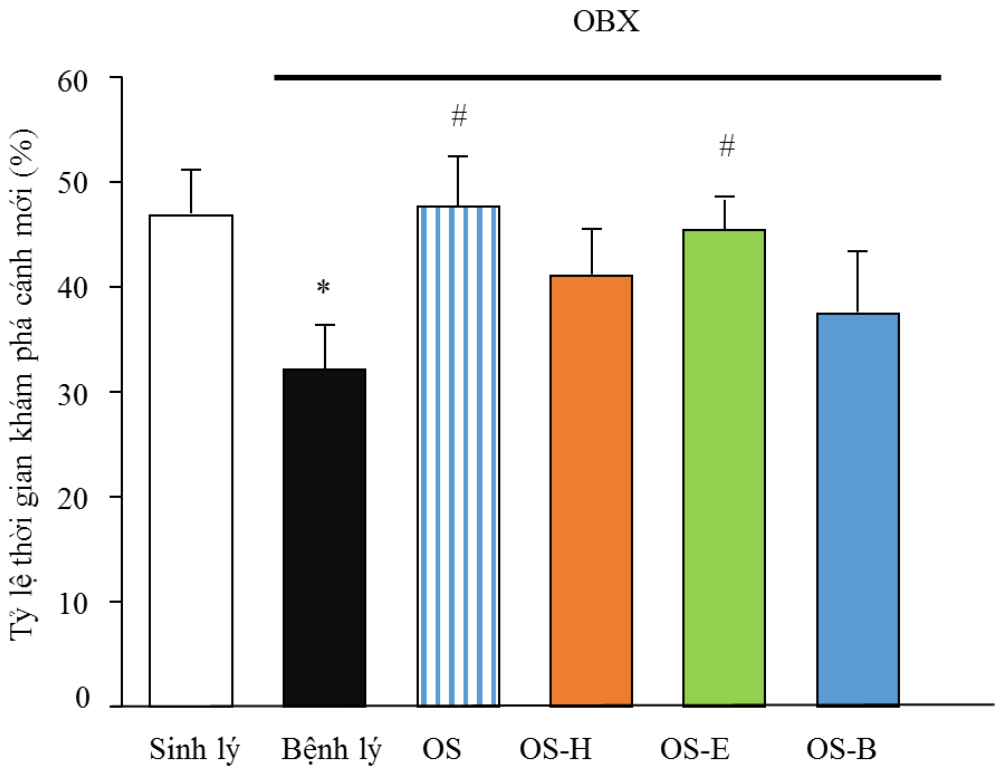
chiết phân đoạn OS bao gồm: n-hexan (OS-H), ethyl acetat (OS-E), n-butanol (OS-B) trên mô hình chuột OBX bằng thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến.

Kết quả đánh giá thời gian khám phá cánh mới của các lô chuột ở giai đoạn kiểm tra được chỉ ra trong *Hình 3.9*. như sau:

- Tỷ lệ thời gian dành cho khám phá cánh mới của lô bệnh lý ngắn hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p = 0,018 < 0,05$), chứng tỏ chuột OBX đã bị suy giảm trí nhớ không gian làm việc.

- Lô chuột OBX được điều trị bằng OS 400 có thời gian khám phá cánh mới tăng lên rõ rệt so với lô bệnh lý ($p = 0,032 < 0,05$), điều này nhất quán với kết quả thu được trong giai đoạn nghiên cứu trước đó *(mục 3.1.1.2)*.

- Điều trị bằng OS-E (400 mg/kg) đã cải thiện đáng kể trí nhớ không gian ngắn hạn của chuột OBX ($p = 0,04 < 0,05$), trong khi 2 cao chiết phân đoạn còn lại OS-H và OS-B với mức liều tương tự không cho thấy rõ rệt tác dụng này (tương ứng $p = 0,168$; $p = 0,348 > 0,05$).



Hình 3.9. *Ảnh hưởng của các cao phân đoạn từ OS lên trí nhớ không gian làm việc của chuột OBX trong thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến.*

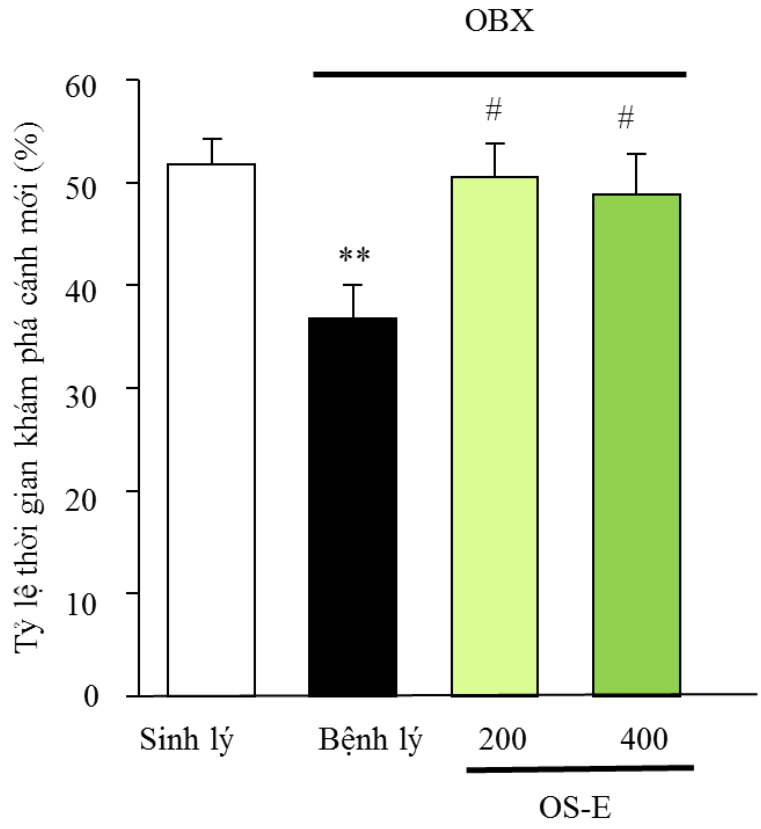
*Đồ thị biểu diễn tỷ lệ phần trăm thời gian khám phá cánh mới B của các lô chuột trong giai đoạn kiểm tra (*p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n = 8-10). (one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).*

Để khẳng định tác dụng cải thiện trí nhớ của OS-E, phân đoạn này ở mức liều thấp hơn (200 mg/kg) tiếp tục được đánh giá tác dụng trên mô hình OBX, vẫn sử dụng mê lộ chữ Y cải tiến.

Tỷ lệ thời gian khám phá cánh mới của các lô chuột ở giai đoạn kiểm tra được trình bày trong *Hình 3.10.*, cho thấy:

- OS-E đã cải thiện rõ rệt sự suy giảm trí nhớ không gian làm việc trên chuột OBX ngay cả ở mức liều thấp 200 mg/kg (p = 0,014 < 0,05), tương tự như ở mức liều cao 400 mg/kg (p = 0,023 < 0,05).

Như vậy, kết quả chỉ ra rằng trong số các phân đoạn cao chiết của OS, phân đoạn ethyl acetat của OS có tác dụng cải thiện trí nhớ không gian ngắn hạn rõ rệt nhất, có thể do OS-E giàu các thành phần hóa học đóng vai trò quan trọng với tác dụng cải thiện trí nhớ của OS.



Hình 3.10. *Ảnh hưởng cao chiết phân đoạn ethyl acetat hương nhu tía (OS-E) ở 2 mức liều 200 và 400 mg/kg trên trí nhớ không gian ngắn hạn của chuột OBX trong thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến.*

*Đồ thị biểu diễn tỷ lệ phần trăm thời gian khám phá cánh mới B của các lô chuột trong giai đoạn kiểm tra (*p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n = 8-10). (one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).*

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

Kết quả nghiên cứu trên đã chứng minh thành phần hóa học đóng vai trò quan trọng với tác dụng cải thiện trí nhớ của OS có thể nằm trong phân đoạn ethyl acetat của cao chiết này. Kết quả phân lập các thành phần chính trong cao OS-E thu được 5 chất bao gồm: acid ursolic, acid oleanolic, luteolin, apigenin và luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid. Đồng thời, kết quả phân tích HPLC cho thấy OS-E có hàm lượng acid ursolic và acid oleanolic rất cao, lần lượt là 11% và 10,27% *(Phụ lục 2)*. Điều này định hướng cho nghiên cứu tiếp tục với tác dụng cải thiện trí nhớ tiềm năng của acid ursolic và acid oleanolic.

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

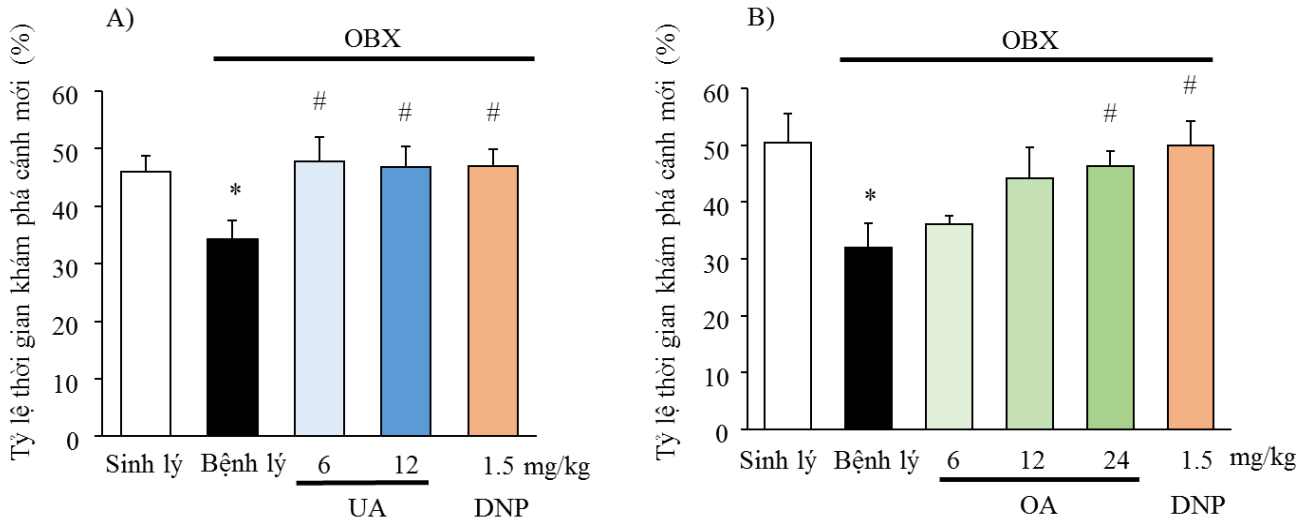
Ảnh hưởng của acid ursolic (UA) và acid oleanolic (OA) lên trí nhớ không gian ngắn hạn của chuột OBX được đánh giá thông qua thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến. Kết quả được thể hiện ở *Hình 3.11*., như sau:

- Chuột OBX có tỷ lệ thời gian khám phá cánh mới chỉ xấp xỉ 33%, thấp hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,05$).

- Điều trị bằng DNP 1,5 mg/kg/ngày làm tăng đáng kể tỷ lệ thời gian khám phá cánh mới so với lô chuột OBX không được điều trị ($p < 0,05$), tương đồng với kết quả giai đoạn nghiên cứu trước đó *(mục 3.1.1.2)*.

- Lô chuột OBX được điều trị bằng UA liều 6 và 12 mg/kg/ngày đều cho thấy tỷ lệ thời gian khám phá cánh mới cao hơn rõ rệt so với lô bệnh lý (tương ứng $p = 0,022$; $p = 0,019 < 0,05$) *(Hình 3.11A)*.

- Chuột OBX được điều trị bằng OA ở mức liều thấp (cả 6 và 12 mg/kg) có tỷ lệ thời gian khám phá cánh mới không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý (tương ứng $p = 0,131$; $p = 0,235 > 0,05$). Trong khi đó, OA liều 24 mg/kg/ngày đã cải thiện đáng kể trí nhớ không gian ngắn hạn của chuột OBX, thể hiện bằng sự tăng lên đáng kể thời gian khám phá cánh mới so với chuột bệnh lý ($p = 0,016 < 0,05$) *(Hình 3.11B)*.



Hình 3.11. *Ảnh hưởng của acid ursolic (UA) và acid oleanolic (OA) đến trí nhớ không gian ngắn hạn của chuột OBX trong mê lộ chữ Y cải tiến.*

*Đồ thị biểu diễn: (A) Tác dụng của UA (6, 12 mg/kg, p.o.); (B) Tác dụng của OA (6, 12, 24 mg/kg, p.o.) đến tỷ lệ phần trăm thời gian khám phá cánh mới của chuột OBX trong giai đoạn kiểm tra (*p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n = 9-11). (one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).*

Như vậy, UA dùng đường uống với cả 2 mức liều 6 và 12 mg/kg/ngày và DNP 1,5 mg/kg/ngày, tiêm phúc mạc đều có tác dụng cải thiện trí nhớ làm việc liên quan đến không gian của chuột OBX. Trong khi OA chỉ có tác dụng cải thiện trí nhớ không gian ngắn hạn rõ rệt trên chuột OBX ở mức liều 24 mg/kg/ngày, mà 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 acid ursolic và acid oleanolic trong thử nghiệm mê lộ nước Morris (MWM)

Mê lộ nước Morris được dùng để đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ không gian dài hạn (được hình thành qua quá trình học tập và ghi nhớ) của UA ở 2 mức liều 6 và 12 mg/kg. Do OA ở liều 6 mg/kg không thể hiện tác dụng cải thiện trí nhớ ngắn hạn đáng kể trong mê lộ chữ Y cải tiến nên ở thử nghiệm này chỉ 2 mức liều OA là 12 và 24 mg/kg được tiếp tục đánh giá tác dụng.

+ Giai đoạn luyện tập

Kết quả được trình bày ở *Hình 3.12.* (tiềm thời); *Hình 3.13.* (quãng đường bơi) và *Hình 3.14.* (tốc độ bơi) như sau:

- Chuột thử nghiệm được tham gia bài tập nhìn thấy bến đỗ (Ngày 1) để làm quen với mê lộ. Tiềm thời (thời gian tìm thấy bến đỗ) trung bình của các lô chuột và quãng đường bơi trung bình của các lô chuột không có sự khác biệt trong bài tập này ($p > 0,05$).

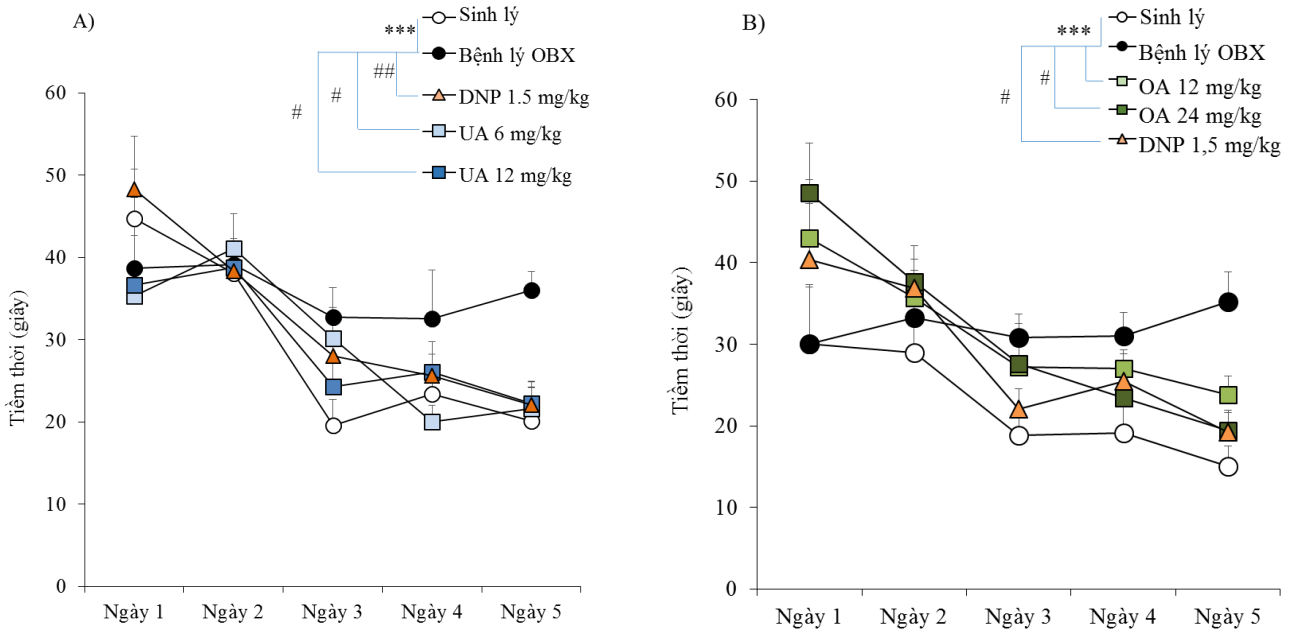
- Trong bài tập không nhìn thấy bến đỗ (từ ngày 2 đến ngày 5), phân tích bằng phương pháp so sánh phương sai hai nhân tố (two-way ANOVA), hậu kiểm (*post hoc*) bằng Student-Newman-Keul's cho thấy thông số tiềm thời và quãng đường bơi trung bình của lô chuột sinh lý và các lô chuột OBX được điều trị có xu hướng giảm dần qua các ngày luyện tập, trong khi lô bệnh lý không có xu hướng này. Lô sinh lý có tiềm thời và quãng đường bơi rút ngắn đáng kể so với lô bệnh lý OBX trong cả 2 thử nghiệm tác dụng của UA và OA, thể hiện khả năng học nhớ không gian đã mất đi khi chuột bị loại bỏ thùy khứu giác (lần lượt là $p < 0,001$; $p = 0,002 < 0,01$ (UA) và $p < 0,001$; $p = 0,03 < 0,05$ (OA)).

- Chuột OBX được điều trị bằng DNP 1,5 mg/kg/ngày đã giảm đáng kể cả 2 thông số tiềm thời và quãng đường bơi so với lô bệnh lý (tương ứng $p = 0,008 < 0,01$; $p < 0,001$ (UA) và $p = 0,016$; $p = 0,042$ (OA) $< 0,05$), chứng tỏ DNP đã cải thiện khả năng học và ghi nhớ không gian của chuột OBX.

- Điều trị chuột OBX bằng UA ở 2 mức liều 6 và 12 mg/kg đều làm giảm rõ rệt thông số tiềm thời và quãng đường bơi so với lô chuột OBX không được điều trị (tương ứng $p = 0,013$; $p = 0,014 < 0,05$ và $p = 0,001$; $p = 0,002 < 0,01$), chỉ ra tác dụng cải thiện rõ ràng của acid ursolic đối với sự thiếu hụt trí nhớ không gian dài hạn ở chuột OBX.

- Điều trị chuột OBX bằng OA mức liều 24 mg/kg/ngày cũng làm giảm rõ rệt tiềm thời và quãng đường bơi trung bình để chuột tìm thấy bến đỗ so với lô bệnh lý (tương ứng $p = 0,048 < 0,05$; $p = 0,005 < 0,01$), chứng tỏ OA ở liều 24 mg/kg/ngày đã cải thiện sự thiếu hụt khả năng học nhớ không gian của chuột bị loại bỏ thùy khứu giác. Trong khi đó, OA mức liều thấp hơn (12 mg/kg/ngày) chưa cho thấy rõ tác dụng cải thiện khả năng học nhớ không gian khi không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê về thông số tiềm thời và quãng đường bơi trung bình so với lô bệnh lý không được điều trị (tương ứng $p = 0,085$; $p = 0,058 > 0,05$).

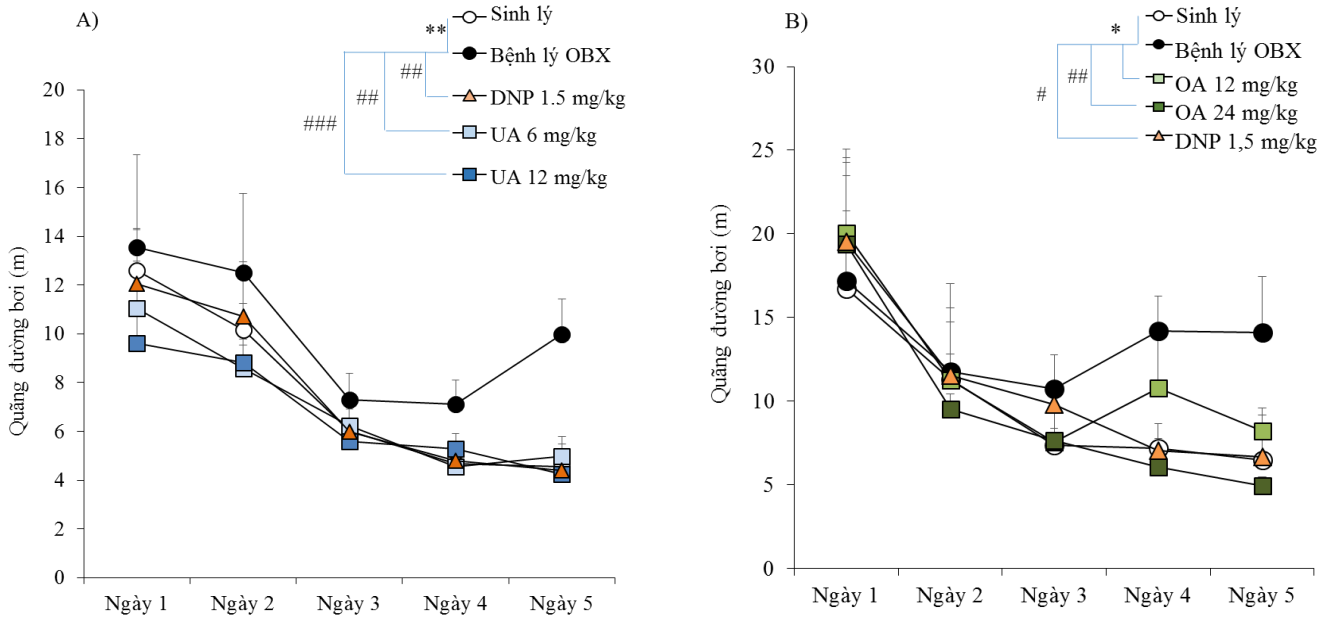
- Tốc độ bơi không có sự khác nhau giữa các lô chuột trong các ngày luyện tập ($p > 0,05$), cho thấy chuột OBX và chuột OBX được điều trị bằng thuốc không bị ảnh hưởng đến vận động tự nhiên. Kết quả này cũng giúp loại bỏ giả thuyết thời gian tìm thấy bến đỗ khác biệt giữa các lô chuột là do khác biệt trong tốc độ bơi.



Hình 3.12. *Ảnh hưởng của UA và OA lên thông số tiềm thời của chuột OBX giai đoạn luyện tập trong mê lộ nước Morris (MWM)*

*Đồ thị đường biểu diễn: (A) Acid ursolic; (B) Acid oleanolic (***p < 0,001, *p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,05, ##p < 0,01 khi so sánh với lô bệnh lý, n = 9-11).*

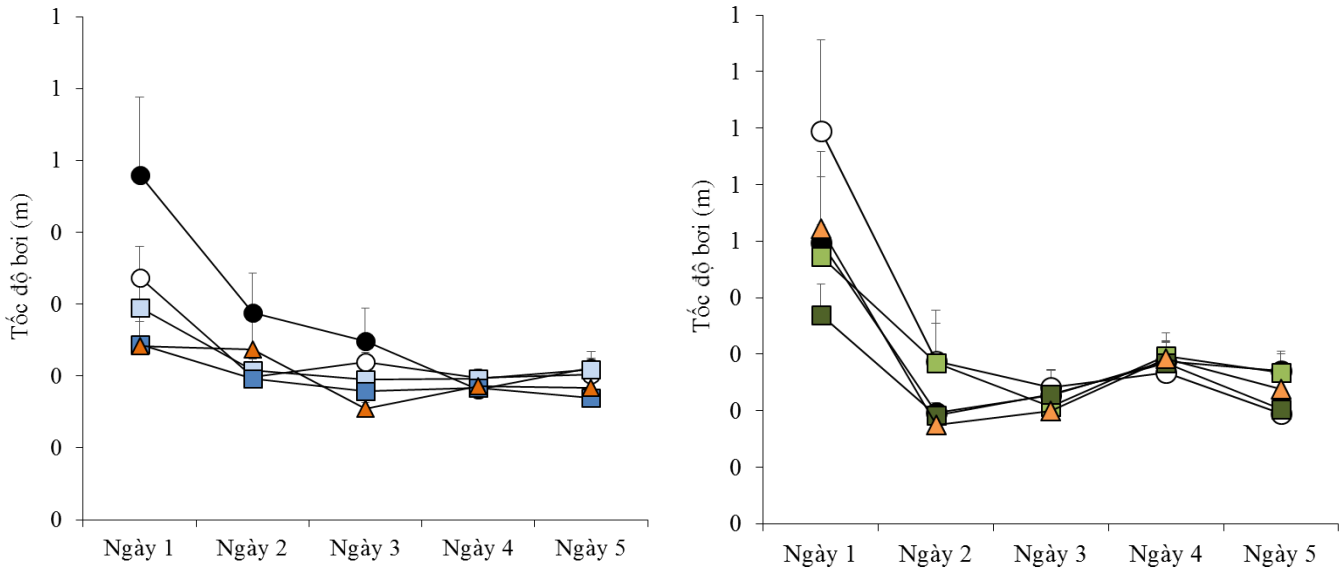
(two-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).



Hình 3.13. *Ảnh hưởng của UA và OA lên thông số quãng đường bơi của chuột OBX giai đoạn luyện tập trong MWM*

*Đồ thị đường biểu diễn: (A) Acid ursolic; (B) Acid oleanolic (*p < 0,05, **p < 0,01 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 khi so sánh với lô bệnh lý, n = 9-11).*

(two-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).



Hình 3.14. *Ảnh hưởng của UA và OA lên thông số tốc độ bơi của chuột OBX giai đoạn luyện tập trong MWM*

Đồ thị đường biểu diễn: (A) Acid ursolic; (B) Acid oleanolic (n = 9-11).

(two-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).

+ Giai đoạn probe test

Thử nghiệm probe test đã được tiến hành vào ngày thứ 6 để kiểm tra xem động vật có thực sự sử dụng các bảng chỉ dẫn không gian để tìm kiếm bến đỗ hay không. Chuột phải nhớ lại vị trí của bến đỗ dựa vào các bảng chỉ dẫn này, và có xu hướng bơi lâu hơn tại cung phần tư đích (nơi đã từng đặt bến đỗ trong những ngày luyện tập trước đó). Kết quả giai đoạn thử nghiệm (probe test) được trình bày ở *Hình 3.15*.

- Chuột OBX không được điều trị chỉ có xấp xỉ 1/4 thời gian chuột được tự do bơi trong MWM, tương đương với mức cơ hội, dành để bơi ở cung phần tư đích, thấp hơn đáng kể so với lô sinh lý (tương ứng $p = 0,004 < 0,01$ (UA) và $p = 0,02 < 0,05$(OA)), cho thấy sự thiếu hụt khả năng học nhớ không gian ở chuột bị loại bỏ thùy khứu giác.

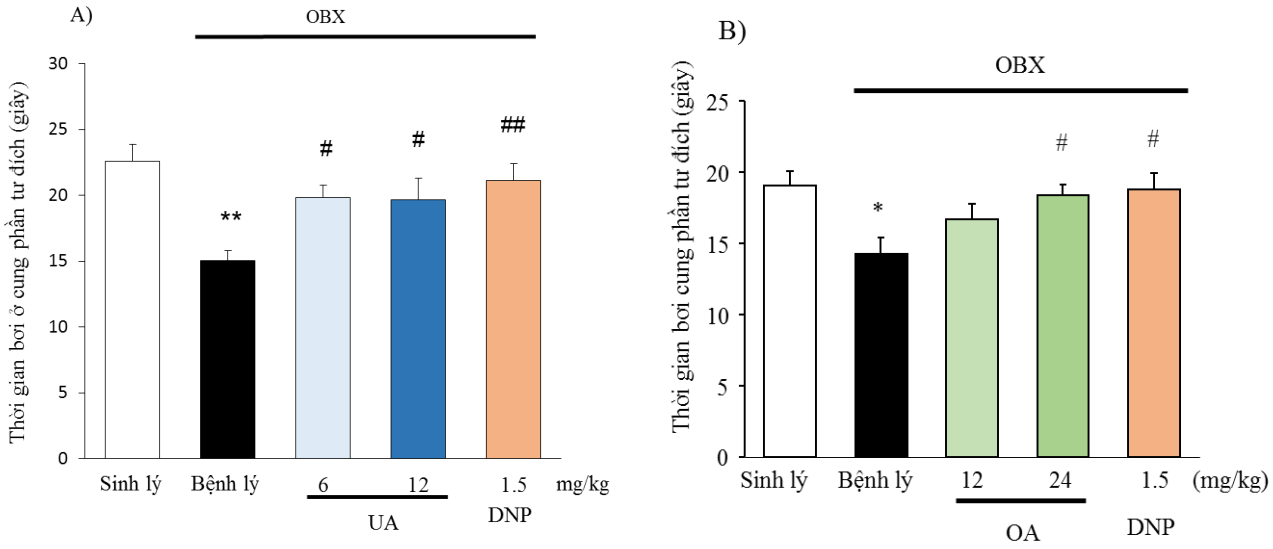
- Tiêm DNP 1,5 mg/kg hàng ngày đã làm tăng rõ rệt thời gian chuột bơi ở cung phần tư đích so với lô bệnh lý (tương ứng $p = 0,01$ (UA) và $p = 0,02$ (OA) $< 0,05$).

- Chuột OBX được điều trị bằng acid ursolic ở cả 2 liều 6 và 12 mg/kg/ngày đều có thời gian bơi ở cung phần tư đích cao hơn đáng kể so với chuột OBX không được điều trị (tương ứng $p = 0,042$; $p = 0,013 < 0,05$), chứng tỏ rằng acid ursolic có tác dụng cải thiện tình trạng suy giảm trí nhớ không gian dài hạn của chuột OBX.

- Điều trị với OA 24 mg/kg/ngày đường uống cũng làm tăng đáng kể thời gian chuột bơi ở cung phần tư đích so với lô OBX không được điều trị ($p = 0,02 < 0,05$).

- Phù hợp với kết quả ở giai đoạn luyện tập trước đó, mức liều OA 12 mg/kg/ngày không thể hiện tác dụng rõ rệt khi thời gian chuột bơi ở cung phần tư đích chỉ cao hơn một chút so với lô bệnh lý, khác biệt không đạt ý nghĩa thống kê (p = 0,13 > 0,05).

Như vậy, acid ursolic dùng đường uống hàng ngày với mức liều 6 và 12 mg/kg cho tác dụng cải thiện rõ rệt trí nhớ không gian dài hạn của chuột OBX, tương tự với thuốc chứng dương DNP với liều 1,5 mg/kg/ngày. Trong khi đó, tác dụng cải thiện sự thiếu hụt trí nhớ không gian dài hạn của OA trên chuột OBX là tác dụng phụ thuộc liều, và chỉ ở liều 24 mg/kg/ngày thì OA mới thể hiện đáng kể tác dụng này.



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.*

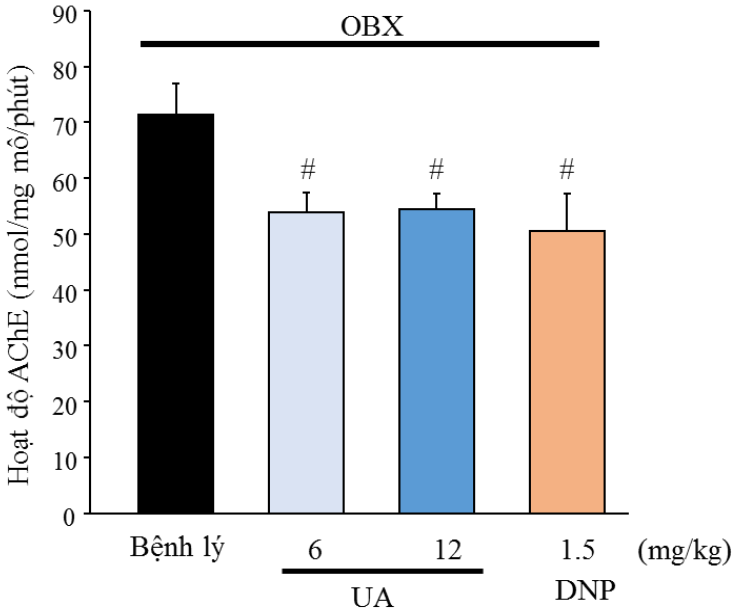
*Đồ thị biểu diễn: (A) Acid ursolic; (B) Acid oleanolic (**p < 0,01, *p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, ##p < 0,01, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n = 9-11).*

(one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).

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

Do acid ursolic cho thấy tác dụng cải thiện trí nhớ tiềm năng hơn acid oleanolic (acid ursolic tác dụng rõ rệt ở liều thấp 6 mg/kg, trong khi acid oleanolic chỉ thể hiện tác dụng ở liều cao 24 mg/kg) nên nghiên cứu chỉ tiếp tục tìm hiểu cơ chế tác dụng của acid ursolic.

Acetylcholin tồn tại càng lâu trong não thì các tế bào não gợi nhắc trí nhớ càng lâu. Vì thế các chất ức chế acetylcholinesterase (AChE, enzym xúc tác cho phản ứng phân hủy acetycholine thành cholin và acid acetic) có thể giúp cải thiện sự suy giảm trí nhớ của bệnh nhân Alzheimer [167]. Để tìm hiểu cơ chế tác dụng của acid ursolic có thông qua ức chế AChE, tương tự như donepezil hay không, hoạt độ AChE trong vỏ não chuột được đánh giá trên *ex vivo*.



Hình 3.16. *Ảnh hưởng của UA đến hoạt độ AChE trong vỏ não chuột OBX*

(#p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n = 8-10).

(one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).

Kết quả được thể hiện dưới dạng biểu đồ cột ở *Hình 3.16.* như sau:

- Hoạt độ AChE vỏ não của chuột OBX được điều trị bằng DNP 1,5 mg/kg/ngày thấp hơn đáng kể so với lô bệnh lý không được điều trị (p = 0,014 < 0,05), cho thấy tác dụng ức chế AChE rõ rệt của DNP.

- Chuột OBX điều trị bằng acid ursolic ở cả 2 mức liều 6 và 12 mg/kg/ngày cũng làm giảm đáng kể hoạt độ AChE vỏ não của chuột OBX so với lô bệnh lý không được điều trị (p lần lượt là 0,021; 0,022 < 0,05).

Như vậy, UA cho thấy tiềm năng ức chế AChE, và cả 2 mức liều 6 và 12 mg/kg, đều hiệu quả tương tự với thuốc chứng dương DNP.

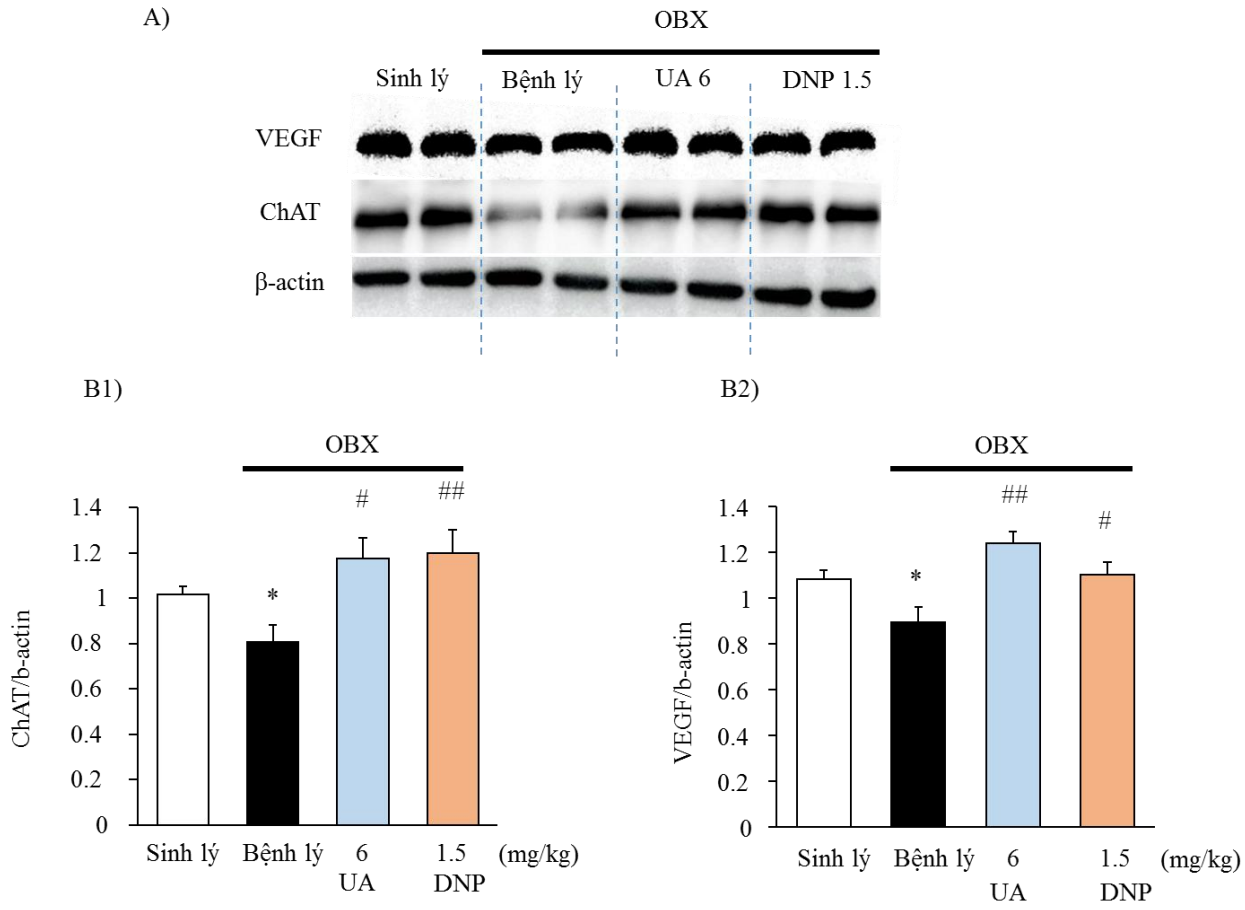
3.1.3.4. Ảnh hưởng của acid ursolic lên biểu hiện protein ChAT và VEGF vùng hồi hải mã

Mức độ biểu hiện của protein ChAT, VEGF vùng hồi hải mã đã được xác định bằng kỹ thuật Western blot (WB) *(Hình 3.17).*

Kết quả định lượng biểu hiện protein ChAT thể hiện ở *Hình 3.17B1* cho thấy:

- Lô bệnh lý OBX đã giảm rõ rệt biểu hiện protein ChAT trong hồi hải mã khi so sánh với lô chứng sinh lý (p = 0,028 < 0,05).

- Chuột OBX được điều trị bằng DNP liều 1,5 mg/kg/ngày có biểu hiện protein ChAT cao hơn rõ rệt so với chuột OBX không được điều trị (p = 0,004 < 0,01).



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

(A) Hình ảnh đại diện của phân tích dữ liệu WB; (B1) Đồ thị phân tích so sánh mức độ biểu hiện protein ChAT; (B2) Đồ thị phân tích so sánh mức độ biểu hiện protein VEGF. Mức độ biểu hiện của các protein đích được hiệu chuẩn (normalization) theo mức độ biểu hiện của β-actin trước khi đem so sánh giữa các nhóm chuột nghiên cứu.

*(*p < 0,01 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,01, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n=6).*

(one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).

- Chuột OBX được uống acid ursolic hàng ngày với liều 6 mg/kg có biểu hiện protein ChAT cao hơn đáng kể so với lô bệnh lý không được điều trị ($p = 0,029 < 0,05$).

Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện protein VEGF được chỉ ra trong *Hình 3.17B2* như sau:

- Mức độ biểu hiện protein của VEGF trong thùy hải mã chuột OBX bị giảm rõ rệt so với lô sinh lý ($p = 0,028 < 0,05$).

- Chuột OBX được điều trị bằng DNP liều 1,5 mg/kg/ngày có biểu hiện protein VEGF cao hơn đáng kể so với chuột OBX không được điều trị ($p = 0,027 < 0,05$), điều này tương đồng với kết quả thu được trong giai đoạn nghiên cứu trước đó *(mục 3.1.1.6)*.

- Chuột OBX được điều trị bằng acid ursolic 6 mg/kg/ngày có biểu hiện protein VEGF cao hơn rõ rệt so với chuột OBX không được điều trị (p = 0,001 < 0,01).

Như vậy, chuột OBX có sự suy giảm đáng kể hoạt động của hệ cholinergic, thể hiện thông qua tăng hoạt độ AChE trong vỏ não cũng như giảm biểu hiện marker protein của enzym tổng hợp acetylcholin ChAT. Đồng thời, yếu tố VEGF của chuột OBX cũng bị suy yếu, thể hiện thông qua giảm biểu hiện marker protein VEGF vùng hồi hải mã. Acid ursolic 6 mg/kg/ngày và DNP 1,5 mg/kg/ngày đều cho thấy tác dụng cải thiện rõ rệt cả hệ cholinergic và VEGF.

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

Để tìm hiểu tác dụng ức chế acetylcholinesterase trong vỏ não chuột của cao chiết cồn, phân đoạn ethyl acetat và tất cả các chất đã phân lập được từ OS-E, nghiên cứu tiến hành thử nghiệm ức chế hoạt độ AChE *in vitro*. Mỗi mẫu được thực hiện 3 lần để lấy giá trị trung bình.

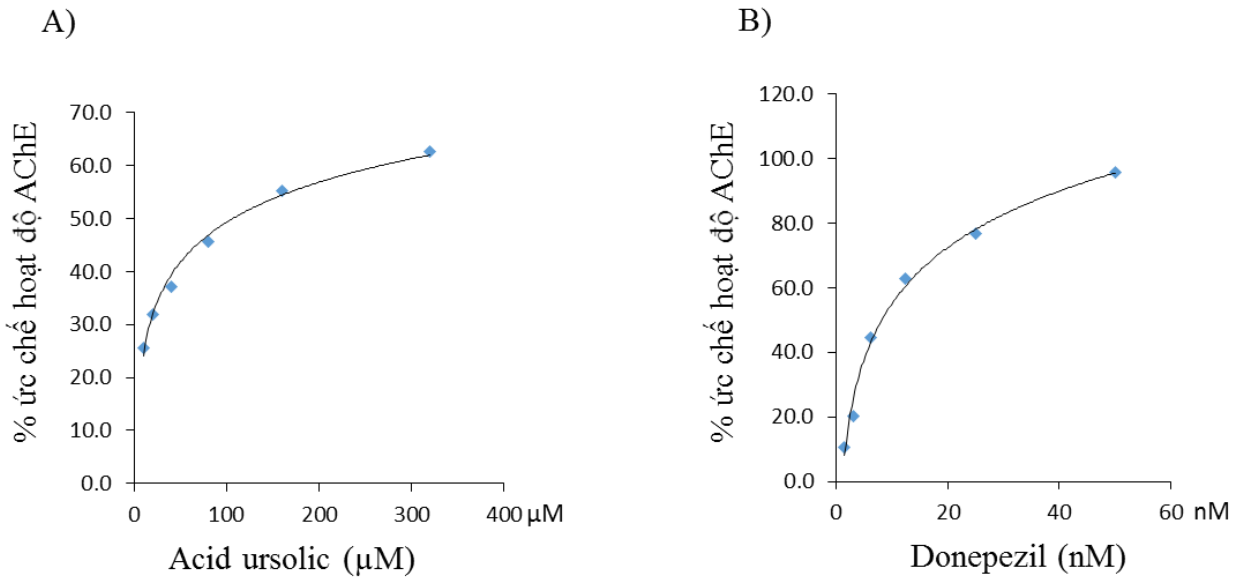
Kết quả được trình bày trong *Bảng 3.1.* và *Hình 3.18,* như sau:

- Giá trị ức chế 50% AChE (IC_{50}) của chứng dương DNP thu được là 8,23 nM.

- Cao chiết cồn OS và cao phân đoạn OS-E được đánh giá sàng lọc tác dụng ức chế AChE *in vitro* đến nồng độ tối đa là 200 µg/ml, tuy nhiên % ức chế ở nồng độ 200 µg/ml của các phân đoạn này đều nhỏ hơn 50%. Do đó, nghiên cứu không tiếp tục đánh giá các nồng độ cao hơn để tìm giá trị IC_{50}.

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



Hình 3.18. *Đồ thị biểu diễn phần trăm ức chế hoạt độ AChE in vitro của các chất: (A) Acid ursolic; (B) Donepezil*

- Các chất phân lập được từ OS-E ban đầu được sàng lọc tác dụng ức chế AChE ở nồng độ 160 µM. Tuy nhiên % ức chế của các chất ở nồng độ này đều nhỏ hơn 50%, *trừ acid ursolic*. Tiếp tục thử tác dụng ức chế AChE của acid ursolic ở các nồng độ 10, 20, 40, 80, 160 và 320 µM, giá trị IC_{50} của acid ursolic xác định được là 106,51 µM.

3.2. Tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía

3.2.1. Tác dụng chống trầm cảm của cao chiết cồn và các cao chiết phân đoạn hương nhu tía trên mô hình chuột OBX

3.2.1.1. Ảnh hưởng của OS và các cao chiết phân đoạn lên biểu hiện trầm cảm của chuột OBX trong thử nghiệm treo đuôi chuột (TST)

Khi chuột bị treo đuôi, đầu cách mặt sàn 40 cm, tình trạng tuyệt vọng của chuột sẽ tiến triển thành trạng thái bất động (immobility). Thời gian bất động của chuột càng dài càng biểu hiện dấu hiệu của trầm cảm. Kết quả được trình bày ở *Hình 3.19*.

- Chuột OBX đã gia tăng đáng kể thời gian bất động (89,8 ± 12,7 giây) so với lô chứng sinh lý (55,7 ± 7,6 giây) (p = 0,015 < 0,05), chứng tỏ chuột OBX có xu hướng tăng biểu hiện hành vi tuyệt vọng trong thử nghiệm treo đuôi chuột.

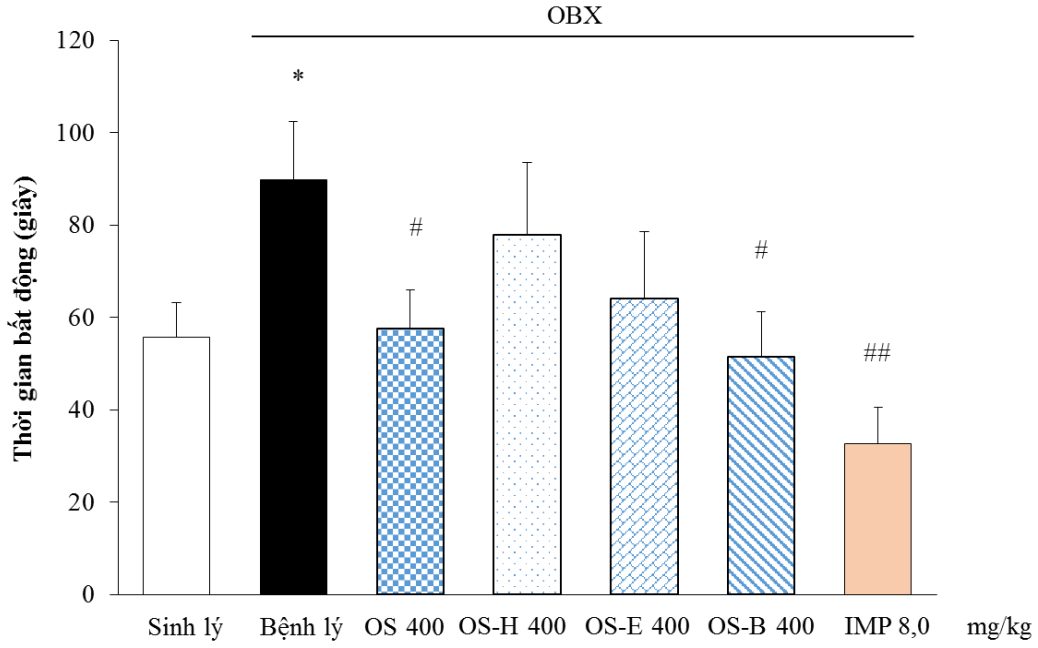
- Chuột OBX được điều trị bằng imipramin có thời gian bất động 32,6 ± 8,0 giây, thấp hơn gần 3 lần so với lô bệnh lý (p = 0,006 < 0,01). Điều này cho thấy imipramin đã thể hiện tác dụng chống trầm cảm rõ rệt trên mô hình OBX.

- Chuột OBX được điều trị bằng cao chiết cồn OS (400 mg/kg) làm giảm có ý

nghĩa thống kê thời gian bất động so với lô bệnh lý (p = 0,027 < 0,05).

- Chuột OBX được điều trị bằng cao OS-B (400 mg/kg) cũng thể hiện tác dụng chống trầm cảm đáng kể trên chuột OBX (p = 0,019 < 0,05) với thời gian bất động 51,6 ± 9,7 giây. Trong khi đó, ở cùng liều thử nghiệm, thời gian bất động của chuột OBX được điều trị bằng cao OS-H và OS-E không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý (p > 0,05).

Như vậy, OS và OS-B liều 400 mg/kg/ngày có tác dụng làm giảm hành vi tuyệt vọng trên chuột OBX trong thử nghiệm TST, trong khi các cao OS-H và OS-E ở mức liều tương tự lại không thể hiện tác dụng này.



Hình 3.19. *Ảnh hưởng của OS và các cao chiết phân đoạn lên thời gian bất động của chuột OBX trong thử nghiệm treo đuôi (TST)*

*(*p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, ##p < 0,01, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n = 12).*

(one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).

3.2.1.2. Ảnh hưởng của OS và các cao chiết phân đoạn lên biểu hiện trầm cảm của chuột OBX trong thử nghiệm chuột bơi cưỡng bức (FST)

Tương tự với thử nghiệm treo đuôi, trạng thái bất động trong thử nghiệm chuột bơi cưỡng bức (FST) phản ánh hành vi tuyệt vọng – một biểu hiện của trầm cảm. Ngược lại, hành vi trèo được coi là phản ứng cố gắng trốn thoát có mục đích của chuột khi rơi vào trạng thái stress như bị thả vào bể nước.

Kết quả đánh giá thời gian bất động của chuột OBX trong thử nghiệm FST ở *Hình 3.20A* cho thấy:

- Thời gian bất động của chuột ở lô OBX không được điều trị có xu hướng thấp hơn lô sinh lý, sự khác biệt này chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Không thấy sự khác biệt có ý nghĩa nào khi so sánh thời gian bất động của lô chuột bệnh lý OBX và lô OBX được điều trị bằng imipramin cũng như cả 4 cao chiết OS, OS-H, OS-E và OS-B ($p > 0,05$).

Như vậy, kết quả đánh giá thời gian bất động thực tế nằm ngoài dự đoán ban đầu của tác giả về ảnh hưởng của OBX đến trạng thái bất động của chuột trong FST.

Tiếp tục đánh giá thời gian trèo của các lô chuột trong thử nghiệm này thu được kết quả trình bày ở *Hình 3.20B*, như sau:

- Chuột OBX không được điều trị có thời gian trèo giảm đáng kể so với lô sinh lý, chứng tỏ chuột bị loại bỏ thùy khứu giác có biểu hiện triệu chứng trầm cảm rõ rệt ($p = 0,011 < 0,05$).

- Chuột OBX được điều trị bằng imipramin liều 8,0 mg/kg/ngày có thời gian trèo có xu hướng tăng lên so với lô chuột bệnh lý, tuy nhiên sự khác biệt này chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

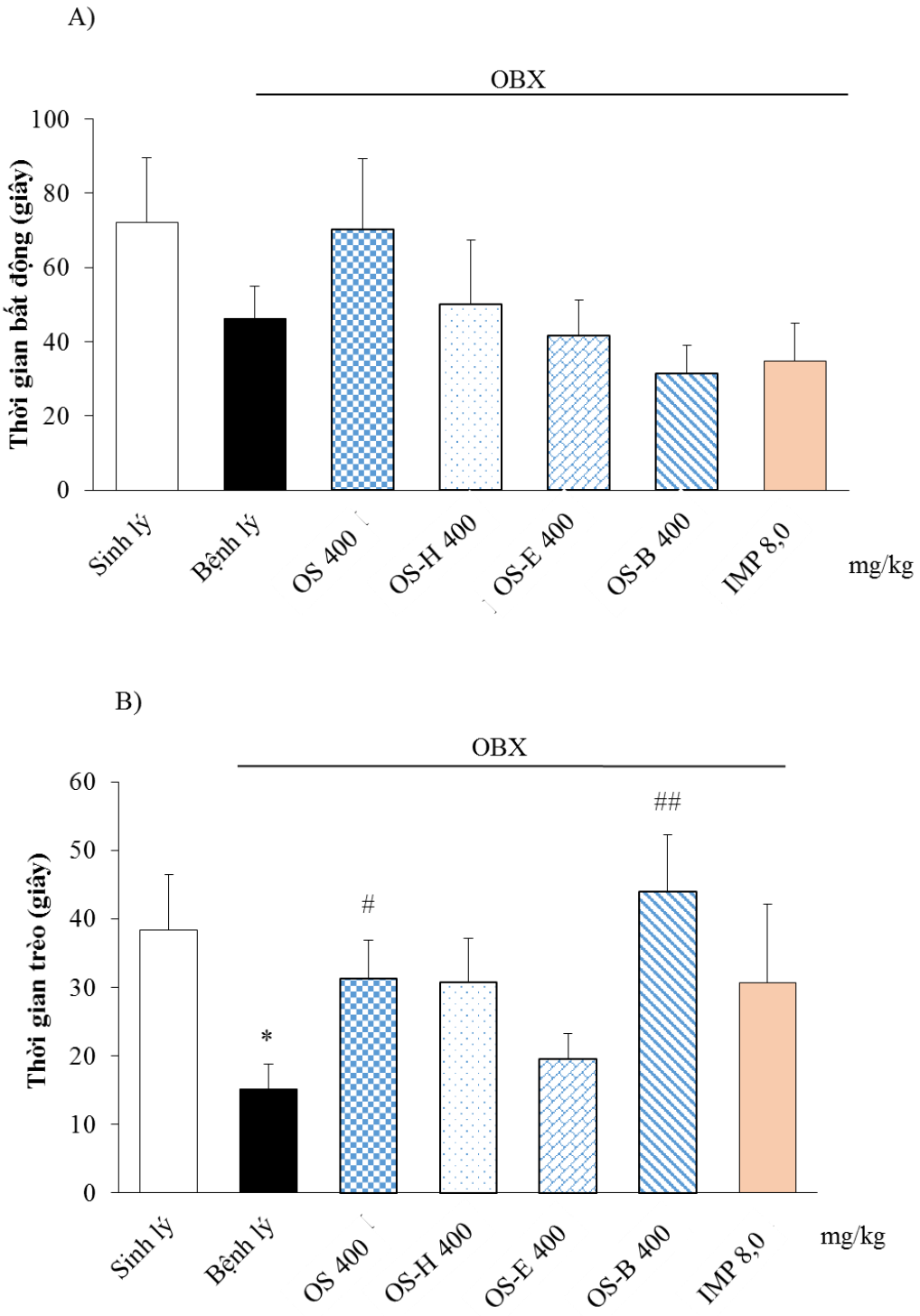
- Chuột OBX được điều trị bằng OS và cao chiết phân đoạn OS-B cho thấy thời gian trèo (lần lượt là 35,8 ± 6,1 giây; 48,2 ± 7,9 giây) tăng lên gấp hơn 2 - 3 lần khi so sánh với lô bệnh lý (15,2 ± 3,7 giây) (p lần lượt là $0,021 < 0,05$ và $0,007 < 0,01$). Trong khi đó, chuột OBX được điều trị bằng OS-H và OS-E, so sánh với lô bệnh lý, không có sự khác biệt đáng kể nào về thời gian trèo ($p > 0,05$).

Như vậy, mặc dù mô hình chuột OBX đã bộc lộ một số nhược điểm nhất định khi được sử dụng là mô hình đánh giá tác dụng chống trầm cảm của thuốc, nhưng kết quả trong thử nghiệm TST và thông số thời gian trèo trong thử nghiệm FST đã gợi ý rằng OS, đặc biệt là OS-B có tác dụng giảm biểu hiện trầm cảm trên chuột OBX.

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)

Mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS) trên động vật gặm nhấm cũng là một trong số ít công cụ hữu ích để nghiên cứu tác dụng của các chất chống trầm cảm. Các thuốc chống trầm cảm kinh điển đã được chứng minh có tác dụng ngăn chặn những biểu hiện hành vi giống trầm cảm do UCMS gây ra, đặc biệt là chứng giảm hứng thú (anhedonia), vốn là đặc điểm trung tâm của trầm cảm nội sinh. Hơn thế

nữa, mô hình UCMS khắc phục được hạn chế của mô hình OBX ở tính tương đồng về nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh, bởi vì bằng chứng chỉ ra rằng căng thẳng nhẹ mạn tính có thể là một yếu tố quan trọng trong căn nguyên của bệnh trầm cảm [124].



Hình 3.20. *Ảnh hưởng của OS và các cao chiết phân đoạn lên biểu hiện trầm cảm của chuột OBX trong thử nghiệm bơi cưỡng bức (FST)*

*(A) Thời gian bất động; (B) Thời gian trèo (*p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, ##p < 0,01, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n =12). (one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).*

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)

SPT được thực hiện hàng tuần để đánh giá hội chứng anhedonia của động vật tiếp xúc với stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước, dựa trên lượng saccharose tiêu thụ trung bình của các lô chuột.

Kết quả thể hiện trong *Hình 3.21*., như sau:

- Không có sự khác biệt đáng kể giữa các lô về lượng saccharose được tiêu thụ từ tuần 0 đến tuần thứ 3.

- Lượng saccharose tiêu thụ ở tuần thứ 4 đã giảm rõ rệt ở lô bệnh lý UCMS so với lô sinh lý, cho thấy hội chứng anhedonia trên chuột UCMS không được điều trị ($p = 0,013 < 0,05$).

- Điều trị chuột UCMS bằng imipramin đã ngăn chặn đáng kể sự sụt giảm lượng saccharose tiêu thụ vào tuần thứ 4 của lô UCMS ($p = 0,017 < 0,05$), chứng tỏ IMP có tác dụng cải thiện hội chứng anhedonia ở chuột UCMS.

- Điều trị chuột UCMS bằng OS-B 100 mg/kg/ngày đã làm tăng rõ rệt lượng saccharose tiêu thụ ở tuần thứ 4 so với lô bệnh lý không được điều trị ($p = 0,016 < 0,05$).

- Điều trị chuột UCMS bằng OS-B 50 mg/kg/ngày cũng có xu hướng làm tăng lượng saccharose tiêu thụ, tuy nhiên sự khác biệt này chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy, 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 anhedonia, một biểu hiện của trầm cảm ở chuột UCMS, trong khi tác dụng này chưa thể hiện rõ khi điều trị bằng OS-B ở liều thấp 50 mg/kg/ngày.

3.2.2.2. Ảnh hưởng của OS-B lên biểu hiện trầm cảm của chuột UCMS trong thử nghiệm treo đuôi chuột (TST)

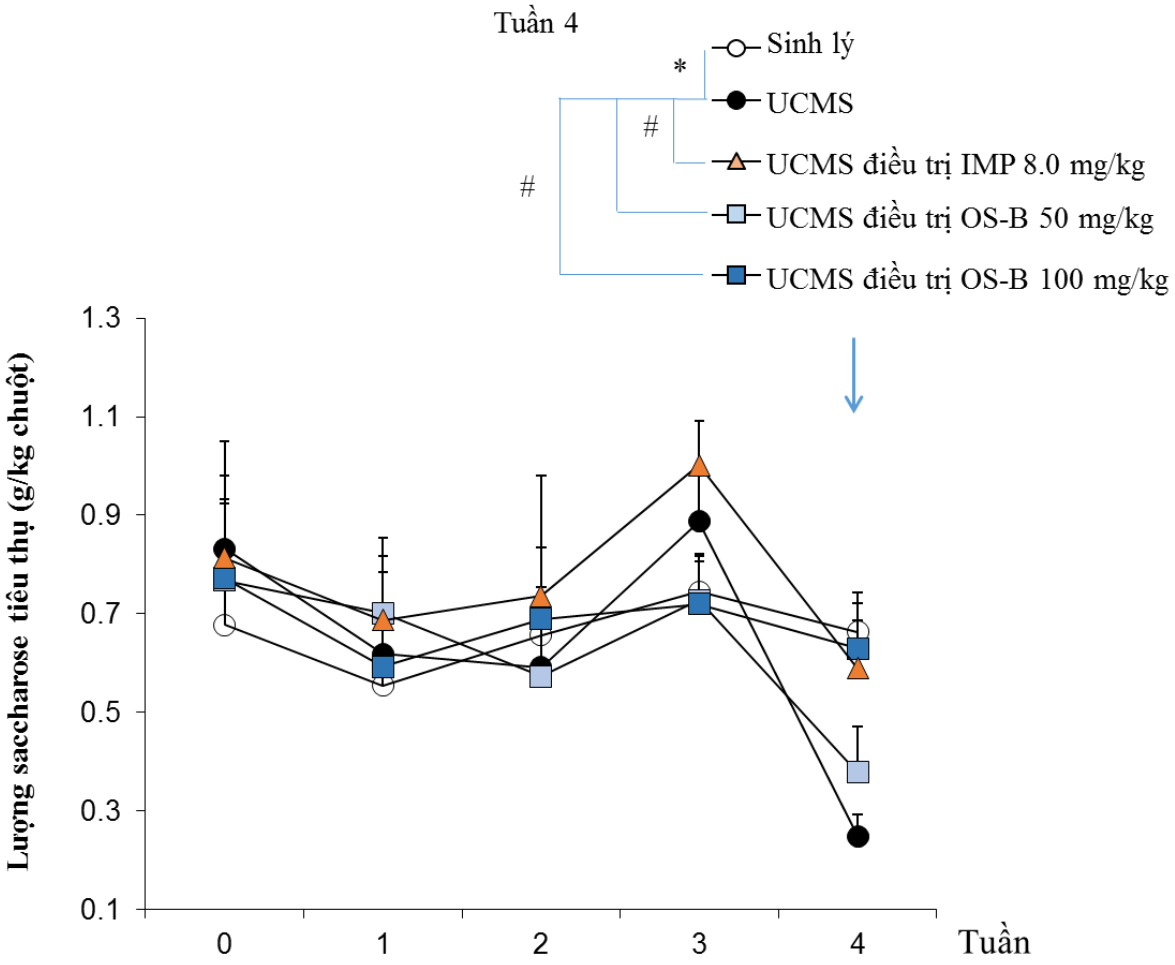
Hành vi tuyệt vọng của chuột UCMS và tác dụng chống trầm cảm của cao OS-B ở 2 mức liều 50 và 100 mg/kg được phân tích bằng thử nghiệm treo đuôi (TST) thông qua thông số thời gian bất động.

Kết quả được trình bày ở *Hình 3.22*, cho thấy:

- Thời gian bất động của lô bệnh lý UCMS không được điều trị dài hơn đáng kể so với lô sinh lý trong TST ($p = 0,002 < 0,01$), chứng tỏ chuột đã biểu hiện triệu chứng giống như trầm cảm, xuất hiện khi động vật phải tiếp xúc với các yếu tố gây stress nhẹ

trong một thời gian dài.

- Imipramin liều 8,0 mg/kg dùng hàng ngày làm giảm rõ rệt thời gian bất động trên chuột UCMS (p = 0,006 < 0,01).



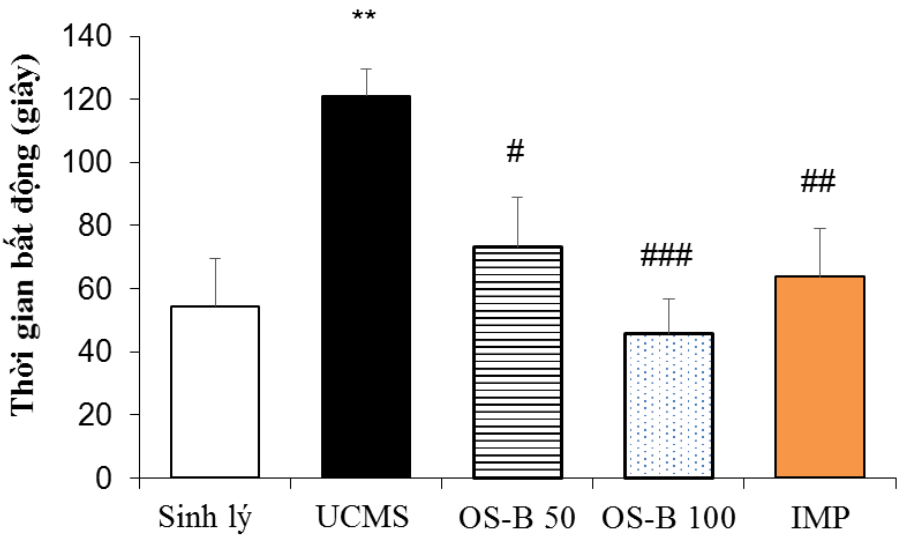
Hình 3.21. *Ảnh hưởng của OS-B lên triệu chứng giảm hứng thú của chuột UCMS trong thử nghiệm tiêu thụ saccharose (SPT).*

*Đồ thị biểu diễn lượng saccharose tiêu thụ/khối lượng cơ thể chuột, được đo hàng tuần trước và trong quá trình 4 tuần gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (*p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n = 9-10).*

(one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).

- Thời gian bất động của chuột UCMS được điều trị bằng OS-B liều 50 và 100 mg/kg cũng giảm rõ rệt so với chuột UCMS không được điều trị (p lần lượt là 0,014 < 0,05 và 0,000 < 0,001).

Như vậy, tác dụng chống trầm cảm của OS-B là tác dụng phụ thuộc liều. Đặc biệt là với mức liều 100 mg/kg, OS-B đã giúp giảm gần 3 lần thời gian bất động so với lô bệnh lý.

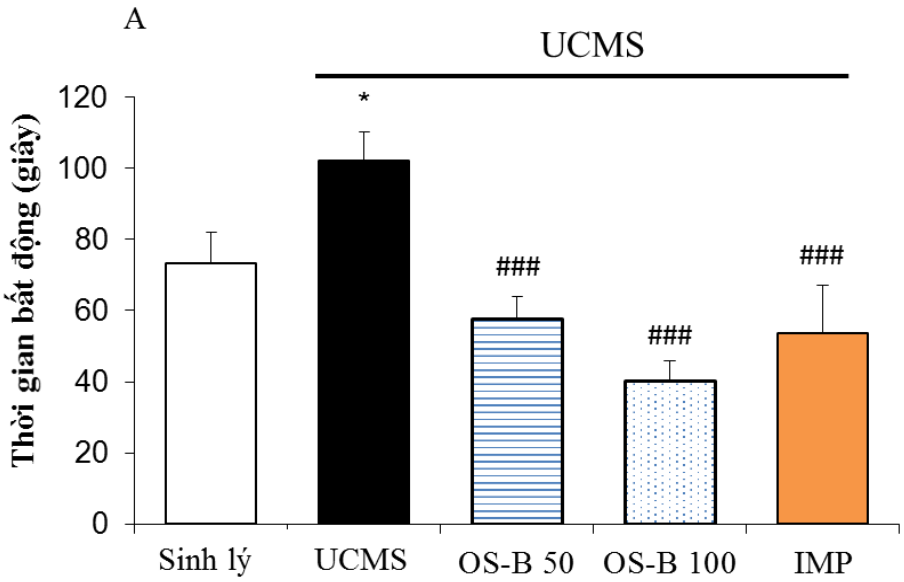


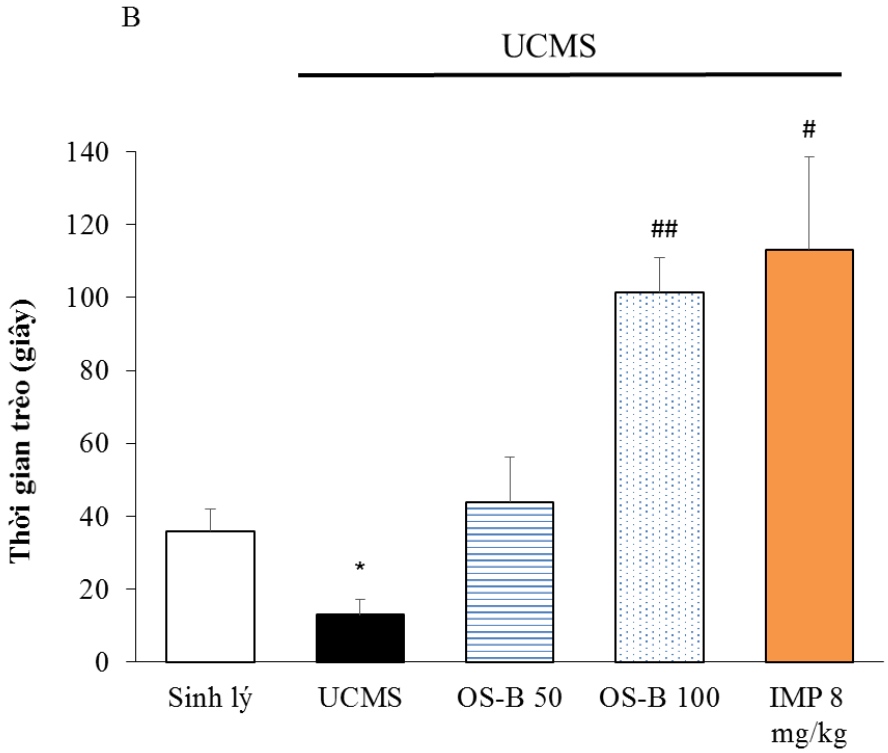
Hình 3.22. *Ảnh hưởng của OS-B (50 và 100 mg/kg) lên biểu hiện trầm cảm của chuột UCMS trong thử nghiệm TST thông qua thông số thời gian bất động.*

*(**p < 0,01 khi so sánh với lô sinh lý, ###p < 0,001, ##p < 0,01, #p < 0,05 khi so sánh với lô bệnh lý, n = 9-10). (one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).*

3.2.2.3. Ảnh hưởng của OS-B lên biểu hiện trầm cảm của chuột UCMS trong thử nghiệm chuột bơi cưỡng bức (FST)

Hành vi giống như trầm cảm của chuột UCMS và tác dụng chống trầm cảm của OS-B với 2 mức liều 50 và 100 mg/kg cũng được làm sáng tỏ bằng thử nghiệm bơi cưỡng bức (FST) thông qua thông số thời gian bất động và thông số thời gian trèo.





Hình 3.23. *Ảnh hưởng của OS-B (50 và 100 mg/kg) lên biểu hiện trầm cảm của chuột UCMS trong thử nghiệm FST thông qua (A) thông số thời gian bất động, (B) thông số thời gian trèo (*p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 khi so sánh với lô bệnh lý, n = 9-10). (one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).*

Kết quả thông số thời gian bất động được trình bày ở *Hình 3.23A*, như sau:

- Tương tự kết quả thu được qua TST, lô chứng sinh lý có thời gian bất động thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý (p = 0,027 < 0,05).

- Imipramin liều 8,0 mg/kg/ngày làm giảm rõ rệt thời gian bất động so với lô chứng bệnh lý (p = 0,000 < 0,001).

- Điều trị chuột UCMS mỗi ngày với OS-B (50, 100 mg/kg) đã làm giảm rõ rệt thời gian bất động trên chuột UCMS (p = 0,000 <0,001) và tác dụng này phụ thuộc vào liều dùng. Cụ thể, lô OS-B 50 có thời gian bất động ngắn hơn đáng kể so với lô UCMS, tương đương với lô chứng dương. Đáng chú ý hơn nữa, lô OS-B 100 có thời gian bất động giảm tới hơn 2 lần so với lô UCMS.

Kết quả thông số thời gian trèo được trình bày ở *Hình 3.23B*, như sau:

- Lô chứng sinh lý có thời gian trèo cao hơn gấp đôi so với lô chứng bệnh lý (p = 0,046 < 0,05), cho thấy hành vi trốn thoát có chủ đích của chuột UCMS bị giảm rõ rệt.

- Imipramin liều 8,0 mg/kg/ngày làm tăng đáng kể thời gian trèo so với lô chứng bệnh lý (p = 0,028 < 0,05).

- Điều trị chuột UCMS mỗi ngày với OS-B 50 mg/kg có xu hướng làm tăng thời gian trèo của chuột UCMS nhưng chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Trong khi đó, OS-B 100 mg/kg đã cải thiện rõ rệt thời gian trèo của chuột UCMS ($p = 0,001 < 0,01$).

Như vậy, OS-B 100 mg/kg/ngày có tác dụng cải thiện biểu hiện của trầm cảm của chuột UCMS trong thử nghiệm FST thông qua thông số thời gian bất động và thông số thời gian trèo, tương tự như tác dụng của IMP 8,0 mg/kg/ngày. OS-B 50 mg/kg/ngày cũng có xu hướng thể hiện tác dụng này tuy chưa rõ rệt.

3.2.2.4. 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)

Thử nghiệm môi trường mở OFT dùng để đánh giá hoạt động tự nhiên của chuột, nhằm loại trừ kết quả dương tính giả từ việc tăng vận động do thuốc gây ra.

Kết quả thông số đo lường hoạt động của chuột theo chiều ngang, chiều dọc được trình bày ở *Hình 3.24A1, A2*, như sau:

- Không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thông kê nào về thông số hoạt động theo chiều ngang và chiều dọc của chuột khi so sánh giữa 2 lô sinh lý và bệnh lý UCMS không được điều trị ($p > 0,05$), chứng tỏ các yếu tố stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước không làm ảnh hưởng đến vận động tự nhiên của chuột.

- Imipramin và OS-B (ở cả 2 mức liều 50 và 100 mg/kg) đều không ảnh hưởng đến hoạt động tự nhiên của chuột UCMS, bao gồm cả hoạt động ngang và dọc ($p > 0,05$).

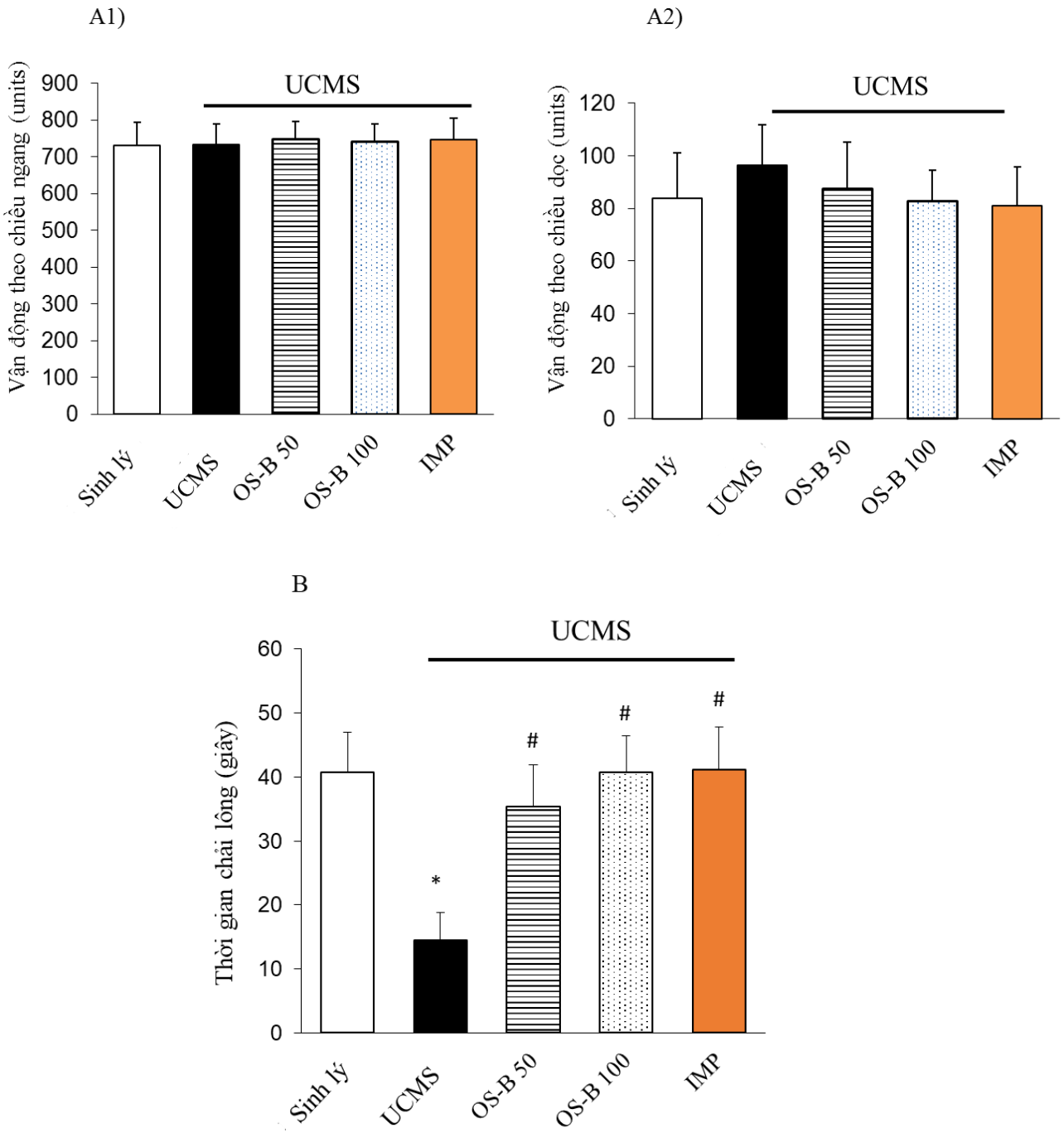
Trong OFT, việc giảm hành vi chải lông có thể liên quan đến sự giảm động lực hoặc quan tâm đến các hoạt động hàng ngày, chẳng hạn như duy trì chăm sóc cá nhân tối thiểu, như là một triệu chứng của bệnh trầm cảm [168]. Do đó, đồng thời với việc đánh giá hoạt động tự nhiên trong OFT, việc quan sát hành vi chải lông của chuột suốt 10 phút cũng được tiến hành. Thời gian thực hiện hành vi chải lông được trình bày ở *Hình 3.24B*, như sau:

- Thời gian chải lông của chuột UCMS đã giảm rõ rệt so với lô sinh lý ($p = 0,019 < 0,05$), chứng tỏ chuột UCMS có biểu hiện trầm cảm thông qua sự giảm nhu cầu thực hiện các hoạt động tự chăm sóc cá nhân hàng ngày.

- Điều trị với imipramin 8,0 mg/kg/ngày đã đảo ngược tình trạng giảm chải lông của chuột UCMS ($p = 0,048 < 0,05$).

- Điều trị bằng OS-B liều 50 và 100 mg/kg/ngày có tác dụng kéo dài đáng kể thời

gian chải lông của chuột UCMS (*p* lần lượt là 0,043 và 0,022 < 0,05). Tác dụng này là tác dụng phụ thuộc liều.



Hình 3.24. *Ảnh hưởng của OS-B (50 và 100 mg/kg) lên hoạt động tự nhiên và hành vi chải lông của chuột UCMS trong thử nghiệm không gian mở.*

Đồ thị biểu diễn: (A1) Vận động theo chiều ngang; (A2) Vận động theo chiều dọc; (B) Thời gian chải lông.

*(*p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, ###p < 0,001 khi so sánh với lô bệnh lý, n = 9-10). (one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).*

Như vậy, 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, trong khi không làm ảnh hưởng đến vận động tự nhiên của chuột.

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

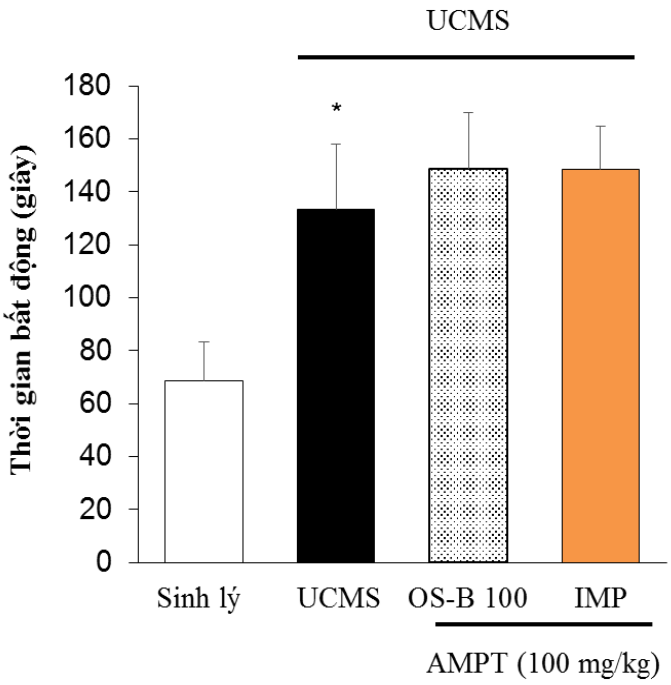
+ Thông qua hệ dẫn truyền thần kinh noradrenergic và dopaminergic

AMPT, một chất ức chế tyrosin hydroxylase, được sử dụng ở tuần thứ 9 sau khi chuột bắt đầu tiếp xúc với UCMS, để tìm hiểu sự tham gia của hệ dẫn truyền thần kinh noradrenergic và dopaminergic trong tác dụng chống trầm cảm của OS-B.

Kết quả được trình bày ở *Hình 3.25*, cho thấy:

- Tương tự kết quả trong TST của các giai đoạn nghiên cứu trước đó, lô bệnh lý UCMS cho thấy thời gian bất động lâu hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p = 0,017 < 0,05$).

- Không có sự khác biệt đáng kể nào về thời gian bất động của cả 3 lô bệnh lý, OS-B 100 và IMP ($p > 0,05$).



Hình 3.25. *Ảnh hưởng của α-methyl-p-tyrosin (AMPT) đến thông số thời gian bất động của các lô chuột trong TST*

*(*p < 0,05 khi so sánh với lô sinh lý, n = 9-10).*

(one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).

Như vậy, việc điều trị trước bằng AMPT (100 mg/kg, tiêm phúc mạc) đã làm mất tác dụng rút ngắn thời gian bất động của OS-B và IMP đối với chuột UCMS, chứng tỏ

tác dụng của OS-B và IMP thông qua hệ dẫn truyền thần kinh noradrenergic và dopaminergic.

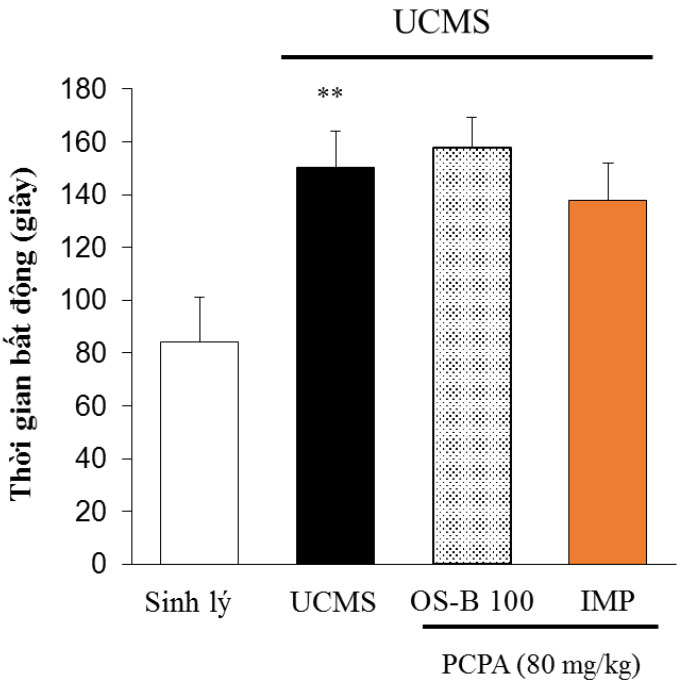
+ Thông qua hệ dẫn truyền thần kinh serotonergic

PCPA, một chất ức chế tryptophan hydroxylase, được sử dụng ở tuần thứ 11 sau khi chuột bắt đầu tiếp xúc với UCMS, để tìm hiểu sự tham gia của hệ dẫn truyền thần kinh serotonergic trong tác dụng chống trầm cảm của OS-B. Kết quả được trình bày ở *Hình 3.26,* như sau:

- Lô bệnh lý UCMS vẫn cho thấy thời gian bất động lâu hơn đáng kể so với lô sinh lý (p = 0,008 < 0,01).

- Không có sự khác biệt đáng kể nào về thời gian bất động của cả 3 lô bệnh lý, OS-B 100 và IMP (p > 0,05).

Như vậy, việc điều trị trước bằng PCPA (80 mg/kg, tiêm phúc mạc) đã làm mất tác dụng rút ngắn thời gian bất 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.



Hình 3.26. *Ảnh hưởng của ρ-chlorophenylalanin (PCPA) đến thông số thời gian bất động của các lô chuột trong TST*

*(**p < 0,01 khi so sánh với lô sinh lý, n = 9-10).*

(one-way ANOVA, hậu kiểm Student-Newman-Keul's).

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Nguyên liệu nghiên cứu

4.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Cao chiết cồn toàn phần hương nhu tía: dung môi ethanol 70% được lựa chọn để chiết xuất hương nhu tía, thu được cao chiết cồn toàn phần OS dùng cho các thí nghiệm. Dung môi này có khả năng hòa tan chọn lọc và hiệu quả các nhóm hoạt chất chứa trong OS như tinh dầu, flavonoid, terpenoid, polyphenol và tannin [10, 130, 140, 169], lại ít độc hơn methanol. Sau khi chứng minh được tác dụng và cơ chế tác dụng của OS, cao chiết cồn này được dùng để phân lập hiệu quả các hoạt chất trong hương nhu tía, từ đó xác định được các thành phần hóa học đóng góp quan trọng vào tác dụng của OS bằng các nghiên cứu sâu hơn trên *in vivo*.

Các cao chiết phân đoạn hương nhu tía: chiết xuất phân đoạn OS bằng các dung môi theo thứ tự có độ phân cực tăng dần (n-hexan, ethyl acetat, n-butanol) với mục đích phân nhóm hợp chất theo độ phân cực, thu được các cao chiết phân đoạn n-hexan (OS-H), ethyl acetat (OS-E) và n-butanol (OS-B), từ đó xác định được các hợp chất đóng vai trò chính trong tác dụng của OS sẽ nằm trong phân đoạn cao chiết có tác dụng rõ nhất.

Cách dùng và liều dùng của OS và các cao chiết phân đoạn: do dạng thuốc dự định dùng cho người là đường uống nên đường đưa thuốc của OS và các cao chiết phân đoạn trong nghiên cứu là đường uống.

Theo y học cổ truyền, công dụng của hương nhu tía rất đa dạng và được dùng với các mức liều khác nhau, có thể dao động từ 8g-20g dược liệu khô/lần/người. Với hiệu suất chiết OS tính trên dược liệu khô là 16,5%, kết hợp với hệ số ngoại suy liều dùng từ người sang chuột nhắt trắng là 12, có thể dự đoán mức liều có tác dụng của OS không thấp hơn 320 mg/kg. Hơn nữa, trong một nghiên cứu gần đây [16], cao chiết cồn hương nhu tía đã được chứng minh là có tác dụng chống trầm cảm ở liều 400 mg/kg thông qua hành vi giảm lo âu trong thử nghiệm không gian mở (open field test, OFT) và giảm thời gian bất động trong thử nghiệm treo đuôi trên chuột OBX. Vì vậy, 2 mức liều 400 mg/kg và 200 mg/kg của OS đã được sử dụng để tiến hành nghiên cứu.

Để làm rõ phân đoạn cao chiết nào chứa thành phần hoạt chất chính đóng góp vào tác dụng của OS, nghiên cứu đã lựa chọn liều 400 mg/kg (là mức liều OS đã thể hiện tác dụng tốt) áp dụng cho cả 3 cao OS-H, OS-E, OS-B trong nghiên cứu đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ và chống trầm cảm của các cao chiết phân đoạn OS.

4.1.2. Lựa chọn động vật thí nghiệm

Động vật được dùng cho tất cả các nghiên cứu trong luận án đều là chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino*, giống đực và cùng tuổi để các thông số thu được tương đối đồng đều, hạn chế tối đa các sai sót có thể gặp phải. Có thể dùng chuột nhắt hoặc chuột cống cho các nghiên cứu về thần kinh. Tuy nhiên, ở đây chuột nhắt đã được ưu tiên lựa chọn do dễ thực hiện các thao tác kỹ thuật hơn, đồng thời phù hợp với các thiết kế thí nghiệm sẵn có tại Khoa Dược lý – Sinh hóa, Viện dược liệu và phù hợp với nguyên tắc đạo đức trong sử dụng động vật thí nghiệm.

Với các nghiên cứu trên mô hình OBX, tuổi của động vật khi bắt đầu thí nghiệm là 7 – 8 tuần tuổi. Đây là độ tuổi bắt đầu trưởng thành của chuột, khả năng thích nghi cao với điều kiện nghiên cứu, hơn nữa sau 1 tuần cho chuột làm quen với môi trường và điều kiện nuôi dưỡng, chuột sẽ đạt khối lượng thích hợp (trên 30 g) để tiến hành gây mê và phẫu thuật được thuận lợi, hạn chế tỷ lệ chết trong quá trình phẫu thuật.

Với nghiên cứu trên mô hình UCMS, tuổi của động vật khi bắt đầu thí nghiệm là 5 – 6 tuần tuổi. Đây cũng là độ tuổi bắt đầu trưởng thành của chuột, khả năng thích nghi cao với điều kiện nghiên cứu. Do thời gian gây mô hình UCMS và tiến hành các thử nghiệm kéo dài nhiều tuần nên độ tuổi của chuột nhỏ hơn chuột sử dụng cho các nghiên cứu trên mô hình OBX, nhằm đảm bảo trong suốt quá trình thí nghiệm chuột vẫn trong độ tuổi trưởng thành, chưa bị già hóa.

4.1.3. Lựa chọn thuốc chứng dương

4.1.3.1. Thuốc chứng dương cho nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ của hương nhu tía

Donepezil (DNP, một trong năm thuốc điều trị Alzheimer được FDA phê duyệt) là thuốc chứng dương được lựa chọn trong nghiên cứu này. Cho đến nay, các thuốc thuộc nhóm thuốc ức chế acetylcholinesterase vẫn cho thấy vai trò không thể thay thế trong điều trị Alzheimer, trong đó donepezil là thuốc duy nhất có chỉ định cho điều trị chứng mất trí tiến triển [21]. Tacrin cũng là thuốc chứng dương hay được dùng trong các nghiên cứu về trí nhớ trên thực nghiệm (liều 2,5 mg/kg, tiêm phúc mạc [107, 108, 170]), tuy nhiên, donepezil có liều dùng thấp và an toàn hơn nhiều so với tacrin [171].

Liều dùng của donepezil tinh khiết dùng cho nghiên cứu này là 1,5 mg/kg, tiêm phúc mạc. Donepezil liều 1,5 mg/kg, dùng đường tiêm phúc mạc đã từng được sử dụng làm thuốc chứng dương trong nghiên cứu trước đây [106].

4.1.3.2. Thuốc chứng dương cho nghiên cứu tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía

Trong nghiên cứu này, imipramin (IMP) – một thuốc chống trầm cảm ba vòng (tác dụng trên cả hệ serotonergic và noradrenergic) được chọn làm thuốc chứng dương. Bất kỳ nghiên cứu nào về khả năng chống trầm cảm của một đối tượng mới đều phải bắt đầu với việc quan sát hoạt động kinh điển của các thuốc chống trầm cảm hiện có, là tăng sự dẫn truyền tại các khớp thần kinh monoaminergic bằng cách ngăn chặn tái hấp thu serotonin và norepinephrin (cơ sở chính cho tác dụng của thuốc trên lâm sàng) [172]. Thực tế là imipramin đã thể hiện rõ tác dụng làm giảm biểu hiện hành vi trầm cảm trong nhiều thử nghiệm hành vi khác nhau trên mô hình gây trầm cảm cho động vật [73, 138, 162].

Đường dùng thuốc của lô chứng dương là IMP tiêm phúc mạc với liều 8,0 mg/kg. Liều này tương tự với liều mà Ripoll (2003) đã chứng minh là có hiệu quả đối với chủng chuột *Swiss* [173]. Đa số các nghiên cứu đều sử dụng IMP đường tiêm phúc mạc [174], hơn nữa IMP sử dụng cho nghiên cứu là chất có độ tinh khiết cao, khi đưa thuốc đường tiêm cũng giúp hạn chế lượng thuốc cần dùng, tiết kiệm chi phí.

4.2. Mô hình dược lý

4.2.1. Mô hình loại bỏ thùy khứu giác (OBX)

Hiện nay trên thế giới đã phát triển nhiều mô hình thực nghiệm để nghiên cứu tác dụng của các chất điều trị sa sút trí tuệ, cải thiện trí nhớ và chống trầm cảm. Tuy vậy, mô hình OBX vẫn là mô hình rất hữu ích được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu về dược lý thần kinh. Đặc biệt, mô hình OBX được coi là mô hình chung cho cả suy giảm trí nhớ và trầm cảm nên rất phù hợp cho nghiên cứu được tiến hành trong luận án. Tại Việt Nam, mô hình này còn ít được biết đến. Nghiên cứu hiện tại đã góp phần khẳng định tính phù hợp của mô hình OBX và là cơ sở khoa học chặt chẽ để áp dụng vào nghiên cứu, phát triển các sản phẩm từ dược liệu phục vụ chăm sóc sức khỏe cộng đồng ở Việt Nam.

Trong nghiên cứu hiện tại, mô hình OBX đã tái hiện được cả ba khía cạnh của một mô hình bệnh Alzheimer và mô hình bệnh trầm cảm có ý nghĩa.

Đối với mô hình bệnh Alzheimer, OBX mô phỏng được đặc trưng của bệnh với nhiều điểm tương đồng có giá trị về sinh lý bệnh và biểu hiện hành vi của bệnh nhân Alzheimer như: suy giảm trí nhớ làm việc, suy giảm chức năng và thoái hóa tế bào

cholinergic; đặc biệt, tình trạng giảm hình thành tế bào thần kinh mới hồi hải mã, có dấu hiệu teo não (giãn rộng não thất bên) và giảm biểu hiện VEGF là các đóng góp rất mới của luận án. Tính dự đoán điều trị đã được tái tạo thành công trên mô hình này khi có sự tương đồng về đáp ứng điều trị của động vật đối với thuốc ức chế AChE – donepezil đang được chỉ định cho bệnh nhân Alzheimer. OBX có thể tái thiết lập được một phần cấu tạo bệnh trên lâm sàng khi sự mất tín hiệu khứu giác ở động vật rất giống với sự suy giảm khứu giác đã được ghi nhận trên những bệnh nhân ở giai đoạn đầu của bệnh Alzheimer (trước khi xuất hiện những triệu chứng lâm sàng) và những bệnh nhân có rối loạn nhận thức nhẹ (mild cognitive impairment, MCI) mà không liên quan trực tiếp đến tình trạng gia tăng Aβ trong não [113, 175]. Điều này cũng mở ra tiềm năng phát triển mô hình OBX trên chuột già với mục tiêu tiệm cận hơn với cơ chế bệnh sinh tự nhiên của bệnh lý Alzheimer ở người.

Đối với mô hình bệnh trầm cảm, OBX đã mô phỏng được mặt bệnh gồm gia tăng hành vi tuyệt vọng thông qua thông số thời gian bất động trong thử nghiệm TST và suy giảm hành vi trốn thoát có định hướng thông qua thông số thời gian trèo trong thử nghiệm FST, cùng với đặc điểm OBX gây ra suy giảm trí nhớ và tình trạng tổn thương hình thành thần kinh hồi hải mã, tương tự như những thay đổi về hành vi và mô học thần kinh quan sát được ở bệnh nhân trầm cảm [176]. Mô hình OBX có đáp ứng tốt với thuốc chống trầm cảm và giải lo âu hiệu quả trên lâm sàng hiện tại (imipramin), cho thấy giá trị dự đoán của nó. Tương tự như ở bệnh nhân Alzheimer, sự suy giảm về khứu giác đã được ghi nhận ở những bệnh nhân bị tổn thương về mặt cảm xúc như bệnh nhân trầm cảm hoặc mắc các rối loạn tâm trạng khác [176] cho thấy mối liên quan về cấu tạo bệnh với việc loại bỏ thùy khứu giác trên động vật. Hơn nữa, trong số các mô hình gây trầm cảm trên động vật, mô hình OBX có thời gian thực hiện ngắn, nên hạn chế được các sai số do tác nhân khách quan gây ra và tiết kiệm được chi phí chăm sóc động vật.

Trong suốt quá trình thí nghiệm, quy trình phẫu thuật rất ổn định, có độ lặp lại cao và khống chế được tỷ lệ chuột tử vong (dưới 7%) trong và sau quá trình phẫu thuật. Tuy nhiên như tất cả các mô hình thực nghiệm khác, mô hình OBX cũng có một số nhược điểm mà khi thực hiện cần chú ý như sau:

- Kỹ thuật cần tiến hành trên động vật đã được gây mê, do đó cần dùng thuốc mê và liều gây mê phù hợp (ở đây dùng pentobarbital liều 60 mg/kg, tương đồng với một

số nghiên cứu trước [100, 107]), theo dõi sát sao tình trạng chuột trước, trong và sau gây mê để hạn chế tỷ lệ chuột chết do gây mê;

- Là một phẫu thuật can thiệp có thể gây biến chứng trên chuột do nhiễm trùng nên cần đảm bảo hạn chế nhiễm khuẩn tối đa trong quá trình phẫu thuật (khử trùng dụng cụ) và sau phẫu thuật (sát khuẩn vết thương hàng ngày bằng iod trong 3 ngày sau mổ);

- Việc gây mô hình không giống với cơ chế bệnh sinh tự nhiên của bệnh lý Alzheimer ở người (đa số diễn biến theo quá trình lão hóa và một phần nhỏ do gen di truyền), ít có sự tương đồng về nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của bệnh trầm cảm trên con người và chỉ bắt chước được một phần hạn chế các triệu chứng của bệnh nhân trầm cảm.

- Có thể làm ảnh hưởng đến cảm xúc của động vật, làm tăng vận động tự nhiên [177] và tính hung hăng của động vật [178], dẫn đến ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm, thể hiện ở kết quả thông số thời gian bất động trong thử nghiệm FST.

4.2.2. Mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS)

Trong số các mô hình thực nghiệm của trầm cảm, mô hình UCMS được coi là một trong những mô hình rất có giá trị trong nghiên cứu và phát triển các chất có tác dụng chống trầm cảm. Tại Việt Nam, mô hình này chưa được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu dược lý thần kinh để đánh giá tác dụng của thuốc và dược liệu, mặc dù đã có công trình công bố về mô hình UCMS tiến hành ở phòng thí nghiệm của Trường Đại học Dược Hà Nội [179]. Trên thực tế, việc triển khai mô hình UCMS có nhiều khác biệt giữa các tác giả và các phòng thí nghiệm khác nhau trên thế giới do mô hình đòi hỏi nhiều công sức và sự nhất quán cao trong quy trình chăm sóc và gây stress cho động vật, được thực hiện đều đặn hàng ngày trong suốt một thời gian dài.

Trong nghiên cứu hiện tại, mô hình UCMS đã được thiết lập thành công, xét toàn diện trên cả ba khía cạnh của một mô hình trầm cảm có ý nghĩa. Thứ nhất, mô hình UCMS đã cho thấy khả năng tái hiện lại một số triệu chứng của rối loạn trầm cảm bao gồm hành vi tuyệt vọng, hành vi giảm khả năng trốn thoát một cách có định hướng và hành vi giảm hứng thú (anhedonia) - là đặc điểm điển hình của trầm cảm. Thứ hai, mô hình UCMS cho đáp ứng tốt với thuốc điều trị trầm cảm có hiệu quả hiện nay là IMP. Ngoài ra, mô hình UCMS cũng đã được chứng minh có đáp ứng với việc sử dụng nhiều loại thuốc chống trầm cảm mạn tính khác, ví dụ như: escitalopram (ức chế chọn lọc thu hồi serotonin - SSRI), venlafaxin (ức chế tái hấp thu kép 5-HT/noradrenalin - SNRI) và

agomelatin (chủ vận 5HT2C / melatonin) [172]. Thứ ba, mô hình UCMS có sự tương đồng cao về nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh phổ biến của bệnh trầm cảm ở con người (gây tích lũy stress nhẹ trong một thời gian dài). Như vậy, mô hình UCMS trong nghiên cứu này đã khắc phục được một số nhược điểm của mô hình OBX ở giai đoạn trước.

Việc áp dụng mô hình UCMS ở Viện Dược liệu có nhiều thuận lợi như: việc tạo các yếu tố gây stress là các kỹ thuật đơn giản, dễ thực hiện; trang thiết bị sẵn có, dễ thay thế. Trong quá trình thực hiện, nghiên cứu chỉ ra được một số điểm cần lưu ý như sau:

Về thời gian gây mô hình, thử nghiệm tiêu thụ saccharose (SPT) là công cụ phát hiện biểu hiện hành vi trầm cảm của động vật thí nghiệm theo thời gian. SPT được thực hiện định kỳ hàng tuần trong suốt quá trình trước và trong khi tiếp xúc với stress để xác lập thời gian mô hình phát huy hiệu lực gây trầm cảm. Loại đường thường sử dụng trong các nghiên cứu là natri saccharin và/hoặc saccharose (saccarose) nhưng với nồng độ đường rất khác nhau. Nghiên cứu hiện tại đã sử dụng saccharose với *nồng độ 2%*. Dung dịch saccharose 2% này cũng được Daodee và cộng sự (2019) lựa chọn trong nghiên cứu của mình [162]. Để xác định rõ chỉ số tiêu thụ saccharose tăng lên hoàn toàn là do sự gia tăng tiêu thụ saccharose chứ không phải do sự giảm mức tiêu thụ nước không cụ thể, nghiên cứu đã đề xuất cách tính lượng saccharose tiêu thụ là *tỷ lệ tiêu thụ saccharose tính trên trọng lượng cơ thể chuột*. Trong nghiên cứu, chuột tiếp xúc với stress có xu hướng giảm dần nhu cầu tiêu thụ saccharose qua các tuần và bộc lộ hành vi giảm hứng thú thực sự rõ rệt ở tuần thứ 4 cho thấy sự thành công của mô hình. Kết quả luận án thu được hoàn toàn phù hợp với công bố của các nghiên cứu trên thế giới là chuột tiếp xúc với UCMS biểu hiện mức tiêu thụ/ưa thích dung dịch saccharin hoặc saccharose giảm đáng kể trong khoảng từ tuần thứ 4 đến tuần thứ 9 [172].

Về các tác nhân gây stress sử dụng, có thể nói, tác nhân và cách thức gây stress đóng vai trò quyết định cho sự thành công của mô hình UCMS. Qua nhiều lần khảo sát, nghiên cứu chọn được các tác nhân gây stress khá đa dạng *(8 loại)* với lịch thực hiện được sắp xếp ngẫu nhiên, tránh dẫn đến sự thích nghi của chuột khi được tiếp xúc với các stress lặp đi lặp lại, dẫn đến giảm hiệu quả của mô hình. Tuân theo xu hướng phát triển của mô hình UCMS [172], các tác nhân này chỉ gây căng thẳng ở mức độ nhẹ nằm trong quy trình tổng thể là một dải căng thẳng vừa phải (kết hợp 2 tác nhân trong cùng một ngày), không bao gồm bất kỳ yếu tố căng thẳng nghiêm trọng nào được Katz và

cộng sự sử dụng trong mô hình gốc như gây cú sốc bàn chân mạnh, ngâm nước lạnh, hoặc bỏ thức ăn và nước uống kéo dài (48 giờ) [123].

Ngoài ra, một số vấn đề có thể phát sinh trong quá trình gây mô hình cũng cần được kiểm soát tốt như: chai nước rò rỉ, thiếu thức ăn và nước uống, đèn phòng chăn nuôi tạo chu kỳ sáng-tối trục trặc hoặc môi trường ồn ào làm ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm. Những con chuột ở cùng một lô được nuôi trong cùng một chuồng lớn và chỉ được tách riêng mỗi con một chuồng nhỏ ngay trước SPT.

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

Trên mô hình OBX, lần đầu tiên nghiên cứu đã chứng minh được tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của cao chiết cồn hương nhu tía, tìm ra phân đoạn cao chiết có tác dụng rõ nhất, từ đó chỉ ra được một số hoạt chất chính đóng góp vai trò quan trọng vào tác dụng của hương nhu tía.

4.3.1. Tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của cao chiết cồn OS toàn phần

4.3.1.1. Tác dụng cải thiện trí nhớ làm việc của OS trên thử nghiệm hành vi

Trước tiên, tác dụng cải thiện trí nhớ làm việc (trí nhớ không gian và trí nhớ không liên quan đến không gian ngắn hạn) của cao chiết cồn toàn phần OS trên chuột OBX được đánh giá tương ứng thông qua thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến và thử nghiệm nhận diện vật thể. Nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng trí nhớ làm việc (một trong số các loại trí nhớ ngắn hạn) thường bị suy giảm ở giai đoạn đầu của bệnh lý Alzheimer [180].

Trong thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến (phép đo trí nhớ không gian ngắn hạn), tỷ lệ thời gian mà lô sinh lý dành để khám phá cánh mới B ở giai đoạn kiểm tra so với thời gian khám phá hai cánh quen thuộc A, C cao hơn mức cơ hội (33,3%). Đồng thời, ở thử nghiệm nhận diện vật thể (phép đo trí nhớ ngắn hạn không liên quan đến không gian), lô sinh lý cũng dành gấp đôi thời gian để khám phá vật mới so với vật thể đã biết ở giai đoạn luyện tập. Điều này chỉ ra sở thích ưa mới lạ hơn là quen thuộc của loài gặm nhấm.

Kết quả của luận án cho thấy, chuột OBX có biểu hiện suy yếu đáng kể trí nhớ làm việc trong cả hai thử nghiệm và sự suy yếu này có thể được phục hồi bằng cách điều trị với DNP và cao chiết cồn OS. Nghiên cứu trước đây đã chứng minh sự tham gia của hệ cholinergic và glutamatergic vào hiệu suất của trí nhớ làm việc bằng cách tiêm phúc mạc scopolamin (đối kháng thụ thể acetylcholin muscarinic) và MK801 (đối kháng thụ

thể NMDA) gây suy giảm trí nhớ làm việc trên chuột ddY [106]. Như vậy, hiệu quả cải thiện trí nhớ làm việc của DNP trong luận án phù hợp với các báo cáo trước đây [106-108, 181], ủng hộ cho giả thuyết rằng rối loạn chức năng của hệ cholinergic có liên quan đến thiếu hụt trí nhớ làm việc không gian và không liên quan đến không gian của chuột OBX. Cao chiết cồn OS, cũng như DNP, cải thiện sự suy giảm trí nhớ làm việc của chuột OBX trên thử nghiệm hành vi, có thể có thông qua cơ chế tương tự nhau, là ức chế acetylcholinesterase (AChE).

4.3.1.2. Cơ chế tác dụng của OS thông qua tăng cường chức năng hệ cholinergic

Acetylcholin là chất dẫn truyền thần kinh quan trọng liên quan đến trí nhớ. Acetylcholinesterase (AChE) có vai trò thủy phân acetylcholin. Do đó, sự gia tăng hoạt độ AChE vỏ não chuột OBX trong nghiên cứu này cho thấy sự suy yếu chức năng của hệ cholinergic thông qua sự suy giảm nồng độ acetylcholin nội sinh trong não. Ngoài ra, hiện tượng giảm số lượng tế bào dương tính với ChAT (chỉ dấu protein của tế bào cholinergic) trong vùng hồi hải mã cũng cho thấy sự thoái hóa rõ rệt của tế bào cholinergic do OBX gây ra.

Kết quả của luận án đã chứng minh OS, cũng như DNP, ức chế đáng kể hoạt độ AChE vùng vỏ não và làm tăng rõ rệt số lượng tế bào thần kinh dương tính với ChAT vùng hồi hải mã của chuột OBX. Tương tự, tacrin cũng là chất ức chế AChE đã cải thiện sự suy giảm trí nhớ và bảo vệ tế bào thần kinh cholinergic trên mô hình động vật gây đái tháo đường typ 2 trong nghiên cứu trước đây [107]. Như vậy, có khả năng nồng độ acetylcholin nội sinh tăng lên do OS và DNP ức chế hoạt độ AChE đã giúp bảo vệ các tế bào thần kinh cholinergic không bị thoái hóa trong tình trạng bệnh lý. Phát hiện này có sự tương đồng với kết quả của thử nghiệm hành vi của luận án, chứng tỏ rằng một trong những cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ làm việc của OS trên chuột OBX là tương tự với donepezil, thông qua tăng cường chức năng hệ cholinergic.

4.3.1.3. Cơ chế tác dụng của OS thông qua cải thiện tình trạng suy giảm hình thành thần kinh mới ở hồi hải mã do OBX

Trong nghiên cứu này, hiện tượng giảm đáng kể số lượng tế bào dương tính với DCX (một chỉ dấu của các tế bào thần kinh mới sinh trong hồi hải mã) của chuột OBX chứng tỏ OBX gây ức chế đối với sự hình thành các tế bào thần kinh mới vùng hồi hải mã. Trong khi, việc điều trị bằng DNP đã làm tăng sinh rõ rệt lượng tế bào dương tính với DCX trong hồi hải mã của chuột OBX, phù hợp với các nghiên cứu trước đó [182,

183]. Sự hình thành thần kinh trong vùng dưới hạt (subgranular zone) hồi răng hồi hải mã diễn ra mạnh mẽ và đóng một vai trò hết sức quan trọng trong quá trình học hỏi và hình thành trí nhớ [108, 184-186]. Trên thực tế, rối loạn điều hòa quá trình hình thành thần kinh hồi hải mã có liên quan đến sự thiếu hụt nhận thức ở bệnh nhân Alzheimer và các mô hình Alzheimer khác nhau, bao gồm cả mô hình OBX trên động vật [184, 187, 188].

Kết quả của luận án cho thấy, việc điều trị hàng ngày bằng OS giúp ngăn chặn sự suy giảm số lượng tế bào thần kinh mới sinh vùng hồi hải mã do OBX gây ra, tương tự DNP. Như vậy, cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của OS có thể do một số thành phần hoạt chất trong OS có khả năng tăng cường sự hình thành thần kinh bằng cách tác động trực tiếp lên tế bào gốc thần kinh hồi hải mã. Ngoài ra, bằng chứng chỉ ra rằng hoạt động của hệ cholinergic ở hồi hải mã đóng một vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh sự hình thành thần kinh, ngay cả ở hồi hải mã trưởng thành, bao gồm quá trình tăng sinh, biệt hóa và tồn tại của tế bào gốc thần kinh [189]. Do đó, cơ chế tăng cường chức năng cholinergic của OS có thể là cơ chế trung gian, để từ đó cải thiện sự suy giảm hình thành thần kinh hồi hải mã do OBX gây ra.

4.3.1.4. Cơ chế tác dụng của OS thông qua cải thiện tình trạng giãn não thất bên do OBX

Sự mở rộng não thất bên của chuột OBX quan sát được trong nghiên cứu này trên chủng chuột *Albino Swiss* phù hợp với một nghiên cứu trước đây sử dụng chuột ddY của tác giả Lê Thị Xoan và cộng sự [107]. Nhiều bằng chứng đã chỉ ra rằng bán cầu não bị teo do mở rộng não thất có tương quan với rối loạn chức năng nhận thức [190]; gia tăng tỷ lệ mắc các mảng già hóa (senile plaques) và đám rối sợi thần kinh (NFTs) ở bệnh nhân Alzheimer [191]. Hơn nữa, sự giãn rộng não thất còn là một dấu hiệu ngắn hạn cho sự tiến triển triệu chứng ở những bệnh nhân suy giảm nhận thức nhẹ (MCI) và Alzheimer [192].

Nghiên cứu mô học hiện tại đã cho thấy, điều trị hàng ngày bằng OS (400 mg/kg) có thể ngăn cản sự giãn rộng của não thất bên do OBX gây ra, trong khi điều trị bằng DNP không ghi nhận được tác dụng này. Như vậy, kết quả của luận án gợi ý rằng OS cải thiện trí nhớ thông qua cơ chế bảo vệ não khỏi tình trạng teo não, một triệu chứng thoái hóa thần kinh liên quan đến Alzheimer.

4.3.1.5. Cơ chế tác dụng của OS thông qua tăng cường biểu hiện VEGF

Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng OBX đã gây ra sự suy giảm biểu hiện VEGF trong hồi hải mã của chuột OBX. VEGF là một phân tử tín hiệu quan trọng bao gồm tăng sinh, di chuyển và chống lại quá trình chết của tế bào nội mô. Trong hệ thần kinh trung ương (central nervous system, CNS), VEGF và các thụ thể của nó (bao gồm VEGFR2) được biểu hiện ở khắp nơi. Chúng chủ yếu nằm trong tế bào biểu mô đám rối màng mạch (choroid plexus epithelial cells), tế bào hình sao, tế bào thần kinh và tế bào tiền thân thần kinh [26, 193]. VEGF đã được chứng minh vai trò sinh lý thần kinh là có khả năng cải thiện thiếu hụt nhận thức thông qua việc thúc đẩy hình thành thần kinh, bảo vệ tế bào nội mô và tế bào thần kinh trong điều kiện thiếu máu cục bộ [194, 195]. Hơn nữa, nồng độ VEGF dịch não tủy tăng cao có liên quan đến tốc độ teo đồi thị chậm hơn và tốc độ suy giảm nhận thức chậm hơn, đặc biệt là ở những người có nồng độ dấu ấn sinh học của bệnh AD cao hơn [31]. Như vậy, có thể kết luận nguyên nhân dẫn đến sự hình thành thần kinh hồi hải mã kém đi rõ rệt và sự thiếu hụt nhận thức của chuột OBX, ít nhất một phần là do rối loạn chức năng yếu tố VEGF trong não.

Kết quả của luận án chứng minh rằng, việc điều trị bằng OS và DNP đã giúp bình thường hóa sự suy giảm biểu hiện VEGF ở hồi hải mã của chuột OBX. Từ đó chỉ ra cơ chế cải thiện thâm hụt nhận thức và tăng cường hình thành thần kinh hồi hải mã của OS và DNP có thể có sự tham gia của yếu tố VEGF. Ủng hộ cho giả thuyết này, tacrin (cũng là một chất ức chế AChE) đã được báo cáo là có tác dụng bảo vệ thần kinh và chống sa sút trí tuệ, một phần thông qua acetylcholin nội sinh (ACh), tăng cường biểu hiện VEGF và tín hiệu qua trung gian VEGFR2 trên lát cắt hồi hải mã nuôi cấy [26]. Hơn nữa, các nghiên cứu trước đây cho thấy có mối liên hệ tương quan hai chiều giữa hệ cholinergic và tín hiệu VEGF trong não. Thứ nhất, acetylcholin nội sinh đóng vai trò làm tăng biểu hiện VEGF trong tế bào thần kinh và tế bào hình sao, từ đó kích hoạt VEGFR2 trên tế bào thần kinh cholinergic trong vùng vách giữa [166]. Thứ hai, VEGF đã chứng minh tác dụng bảo vệ thần kinh do ngăn ngừa sự mất mát tế bào thần kinh cholinergic ở chuột trưởng thành bị tổn thương thần kinh [196]. Do đó, nghiên cứu này có thể dẫn đến giả thuyết rằng OS và DNP đã tăng cường mức độ của biểu hiện gen và protein VEGF một phần thông qua sự gia tăng chất dẫn truyền thần kinh acetylcholin trong não và ngược lại, tác dụng tăng cường biểu hiện VEGF hồi hải mã của OS và DNP cũng có tác động tích cực đến hệ cholinergic.

Nói tóm lại, nghiên cứu hiện tại đã chứng minh được tác dụng cải thiện trí nhớ làm việc trên chuột OBX của cao chiết cồn hương nhu tía ở liều 400 mg/kg, cho thấy OS rất có tiềm năng trong dự phòng và điều trị các chứng sa sút trí tuệ, suy giảm trí nhớ ở người ngay từ giai đoạn sớm. Một trong những đóng góp mới của luận án là chỉ ra các cơ chế sau đây, ít nhất một phần, có liên quan đến tác dụng cải thiện trí nhớ của OS: tăng cường chức năng hệ cholinergic thông qua ức chế AChE và ngăn chặn thoái hóa tế bào cholinergic, tăng sinh tế bào thần kinh mới vùng hồi hải mã, giảm tình trạng giãn rộng não thất bên và tăng cường biểu hiện VEGF. Nhờ vậy, nghiên cứu đã làm nổi bật lên ưu điểm của dược liệu trong điều trị, đó là một chế phẩm có thể tác dụng theo nhiều cơ chế/đích tác dụng khác nhau nên có thể chỉ định cho nhiều giai đoạn của bệnh và khắc phục được tình trạng giảm đáp ứng với thuốc trên nhiều đối tượng bệnh nhân.

4.3.2. Tác dụng cải thiện trí nhớ của các cao chiết phân đoạn hương nhu tía

Để xác định được thành phần hoạt chất chính tham gia vào tác dụng cải thiện trí nhớ của OS, nghiên cứu tiếp tục tiến hành sàng lọc tác dụng của các cao chiết phân đoạn OS-H, OS-B, OS-E, tìm ra phân đoạn có tác dụng rõ nhất. Sau đó, phân đoạn này được đem đi phân lập các thành phần hoạt chất tiềm năng.

Trong số các thử nghiệm hành vi để kiểm tra trí nhớ của động vật, mê lộ chữ Y cải tiến rất dễ thực hiện, thí nghiệm tiến hành trong thời gian ngắn, kết quả thu được ổn định và có độ tin cậy cao, rất phù hợp cho nghiên cứu sàng lọc tác dụng của nhiều phân đoạn cao chiết (cần sử dụng nhiều lô chuột thí nghiệm).

Sử dụng thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến, nghiên cứu đã chứng minh rằng việc điều trị bằng cao OS-E, giống như OS, cho thấy tác dụng cải thiện rõ rệt tình trạng suy giảm trí nhớ ngắn hạn liên quan đến không gian của chuột OBX với mức liều 400 mg/kg, trong khi hai phân đoạn còn lại OS-H và OS-B 400 mg/kg không ghi nhận được tác dụng này. Điều đáng chú ý là, phân đoạn OS-E không chỉ cho tác dụng cải thiện trí nhớ ở liều 400 mg/kg mà tác dụng này còn thể hiện rất rõ ở liều 200 mg/kg. Trong khi ở giai đoạn trước, cao chiết cồn toàn phần OS chỉ có tác dụng cải thiện trí nhớ làm việc rõ rệt ở mức liều 400 mg/kg còn tác dụng của OS 200 mg/kg là không đáng kể. Ngoài ra, nếu tính theo hiệu suất chiết, từ 4kg dược liệu khô tương ứng với 660g OS, thu được 173g OS-E, có thể thấy liều có tác dụng của OS-E không thấp hơn 108 mg/kg. Mức liều lý thuyết này có sự tương đồng với mức liều 200 mg/kg có hiệu quả trên thực nghiệm. Từ các kết quả trên, nghiên cứu đã chỉ ra một phát hiện thú vị rằng, phân đoạn OS-E từ OS

toàn phần rất giàu các thành phần hoạt chất có khả năng đóng góp quan trọng vào hoạt động chống sa sút trí tuệ của OS.

4.3.3. Cơ sở lựa chọn chất phân lập tiềm năng từ hương nhu tía để đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ trên thực nghiệm

Kết quả phân tích hóa học của cao OS-E thu được 5 hợp chất bao gồm: acid ursolic, acid oleanolic, apigenin, luteolin, luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid. Đối chiếu với kết quả phân lập từ OS thu được 6 hợp chất bao gồm: 1,02% acid ursolic, 1,48% acid oleanolic, 0,10% apigenin, 0,11% luteolin, 3,06% luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid và 0,85% apigenin-7- *O*-*β*-D-glucuronid *(Phụ lục 2 – Bảng 1)*, thấy rằng:

5 trong số 6 hợp chất chính của OS đã có mặt ở phân đoạn OS-E chứng tỏ một hoặc nhiều trong số 5 hợp chất của phân đoạn OS-E có đóng góp quan trọng vào tác dụng cải thiện trí nhớ của OS. Đã có một số nghiên cứu ủng hộ cho giả thuyết này báo cáo tác dụng cải thiện sự thiếu hụt nhận thức ở các mô hình động vật khác nhau của các thành phần hóa học trong OS, chẳng hạn như acid ursolic [197, 198], acid oleanolic [199], apigenin [200] và luteolin [201]. Do đó, bốn chất này có thể giải thích một cách hợp lý nhất tác dụng của OS trên chuột OBX. Tuy nhiên, nghiên cứu không loại trừ khả năng luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid cũng góp phần vào tác dụng trên trí nhớ của OS. Thật vậy, bằng chứng khoa học chứng minh rằng luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid có thể bị phân hủy bởi hoạt động của β-glucuronidase biểu hiện trong đại thực bào, do đó dẫn đến dạng hoạt động của aglycon là luteolin [202]. Hơn nữa, so sánh dựa trên phân tích kết nối phân tử (molecular docking) [203] cho thấy sự tương đồng đáng kể giữa luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid và DNP khi liên kết với acetylcholinesterase ở người, dự đoán tiềm năng của luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid có thể hoạt động tương tự DNP.

Tuy nhiên, kết quả phân tích định lượng cho thấy, luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid có hàm lượng cao không chỉ trong OS (3,06%), OS-E (7,75%) mà còn cao trong cả OS-B (5,82%) nữa nhưng OS-B lại không có tác dụng cải thiện trí nhớ trên thực nghiệm. Trong khi đó, apigenin và luteolin trong OS-E có hàm lượng thấp (lần lượt là 0,82% và 1,18%), đồng thời hai chất này cũng có ít trong OS và các phân đoạn còn lại. Điều này chứng tỏ apigenin, luteolin và luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid có thể không phải là hoạt chất chính góp phần vào tác dụng cải thiện trí nhớ của OS. Ngược lại, acid ursolic và acid oleanolic, hai triterpenoid là đồng phân cấu tạo của nhau, có hàm lượng rất cao trong OS-E (lần lượt là 11% và 10,27%), có hàm lượng cao trong OS (lần lượt là 1,02%

và 1,48%) và không có nhiều trong 2 phân đoạn còn lại. Như vậy, rất có thể tác dụng cải thiện trí nhớ của OS là do sự đóng góp vai trò quan trọng của acid ursolic và acid oleanolic. Do đó, tác dụng cải thiện trí nhớ tiềm năng của acid ursolic (UA) và acid oleanolic (OA) đã tiếp tục được nghiên cứu.

Về việc thiết kế liều dùng của UA và OA, căn cứ vào hàm lượng UA và OA trong cao chiết, tính trên mức liều thấp nhất có tác dụng. Đối với cao chiết cồn toàn phần, OS đã được chứng minh chỉ có tác dụng ở liều 400 mg/kg mà không thể hiện tác dụng ở liều 200 mg/kg nên có thể coi OS liều 400 mg/kg là liều tối ưu có tác dụng. Trong khi đó, cả OS-E ở 2 mức liều 200 và 400 mg/kg đều cho tác dụng cải thiện trí nhớ rất tốt nên chưa thể khẳng định OS-E 200 mg/kg là mức liều thấp nhất có tác dụng. Vì vậy, liều dùng của UA và OA cho các thí nghiệm tiếp theo được tính dựa trên hàm lượng UA, OA trong cao chiết cồn toàn phần OS như sau: OS 400 mg/kg có chứa 1,02% UA tương ứng xấp xỉ 4 mg/kg; 1,48% OA tương ứng xấp xỉ 6 mg/kg. Để thuận lợi cho việc so sánh về tác dụng, 2 mức liều được chọn chung cho cả UA và OA là 6 mg/kg và 12 mg/kg, OA có thêm 1 mức liều nữa là 24 mg/kg.

Trong quá trình pha chế thuốc để cho động vật uống, UA và OA cho thấy độ tan không đáng kể trong nước. Để cải thiện tình trạng này, UA và OA cần được pha bằng nước có phối hợp với 0,1% Tween 80 và siêu âm 2 lần, mỗi lần 15 phút ở nhiệt độ thường (lắc kỹ giữa 2 lần siêu âm) để tạo được hỗn dịch đồng nhất.

4.3.4. Tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của các hoạt chất tiềm năng trong hương nhu tía

4.3.4.1. Tác dụng cải thiện trí nhớ không gian ngắn hạn và dài hạn của UA và OA

a, Tác dụng cải thiện trí nhớ không gian ngắn hạn

Bằng thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến, nghiên cứu chứng minh rằng sự suy giảm trí nhớ làm việc trên chuột OBX có thể được cải thiện bởi cả UA và OA. UA thể hiện tác dụng rất mạnh ở cả 2 liều 6 và 12 mg/kg, tương đương DNP. Trong khi OA cho thấy tác dụng phụ thuộc liều, tỷ lệ thời gian khám phá cánh mới tăng dần nhưng chỉ có liều 24 mg/kg thì tác dụng của OA mới rõ rệt. Kết quả cho thấy cả UA và OA đều đóng góp vai trò quan trọng trong tác dụng cải thiện trí nhớ làm việc của OS trên chuột OBX, có thể với cơ chế liên quan đến điều chỉnh rối loạn chức năng của hệ cholinergic trong não.

b, Tác dụng cải thiện trí nhớ không gian dài hạn

Việc học và ghi nhớ các vị trí mang ý nghĩa quyết định khả năng di chuyển an

toàn trong môi trường, là trọng tâm cho sự sống còn của hầu hết các loài. Mê lộ nước Morris là một nhiệm vụ tương đối khó khăn, kiểm tra khả năng học nhớ vị trí của chuột. Các quá trình bao gồm: định vị và ghi nhớ không gian nhờ các bảng chỉ dẫn xung quanh mê lộ, sau đó xử lý, tổng hợp và đưa ra áp dụng để hướng đến đích, từ đó lưu giữ vị trí bến đỗ đã bị ẩn đi nhằm thoát khỏi tình trạng bị ngập nước. Năng lực này được mã hóa trong não bộ bởi hai hệ: điều hướng phân bổ bằng cách sử dụng các tín hiệu bên ngoài cơ thể (tín hiệu xa) và điều hướng trung tâm bằng cách sử dụng tự chuyển động, tín hiệu bên trong và tín hiệu gần. Hệ điều hướng bị chi phối bởi hồi hải mã, vỏ não và các cấu trúc xung quanh [204]. Trong nghiên cứu này, chuột OBX đã cho thấy sự suy giảm khả năng học tập và ghi nhớ không gian trong cả giai đoạn luyện tập (bài tập không nhìn thấy bến đỗ) và giai đoạn kiểm tra probe test (bài tập không có bến đỗ). Sự suy giảm khả năng điều hướng của chuột OBX do thiếu thông tin để tìm ra bến đỗ một cách hiệu quả, có thể phản ánh tầm quan trọng của hồi hải mã đối với trí nhớ không gian [205]. Phát hiện thú vị này hoàn toàn tương đồng với kết quả của luận án giai đoạn trước là OBX gây suy giảm sự hình thành thần kinh hồi hải mã. Thêm vào đó, nhiều khả năng bị mất đi của chuột OBX thể hiện qua các bài tập của mê lộ nước Morris chỉ ra sự tương đồng với những biểu hiện trên bệnh nhân Alzheimer như: giảm khả năng nhìn nhận sự việc trong không gian và mất phương hướng. Hiện tượng này có thể được phát hiện rất sớm trong giai đoạn đầu của bệnh Alzheimer và càng trở nên rõ rệt hơn khi bệnh tiến triển, khi mà suy thoái vùng hồi hải mã liên quan trực tiếp đến khả năng nhận thức và hành vi [206].

Kết quả nghiên cứu cho thấy, việc điều trị bằng UA và OA có thể cải thiện tình trạng suy giảm trí nhớ không gian dài hạn của chuột OBX trong thử nghiệm MWM. UA có tác dụng rõ rệt ở cả 2 liều 6 và 12 mg/kg, tương đương DNP. Trong khi OA chỉ thể hiện tác dụng ở liều 24 mg/kg. Cơ chế tác dụng tích cực trên trí nhớ không gian dài hạn này của UA và OA có thể thông qua việc phục hồi chức năng của hồi hải mã của chuột OBX.

c, Bàn luận chung về tác dụng trên hành vi của UA và OA

Cho đến nay, luận án là công trình đầu tiên tập trung vào việc đánh giá tác dụng cải thiện sự suy giảm trí nhớ của cả UA và OA trên *in vivo*. Mặc dù UA và OA có khả năng hòa tan hạn chế trong nước có thể ảnh hưởng đến sinh khả dụng của chúng trong cơ thể [207], bằng các thử nghiệm hành vi khác nhau, kết quả luận án đã chỉ ra rằng cả

UA và OA đều có tác dụng cải thiện khả năng học tập và ghi nhớ không gian ngắn hạn (thông qua mê lộ chữ Y cải tiến) và dài hạn (thông qua mê lộ nước Morris) trên chuột OBX, có thể thông qua việc phục hồi hệ cholinergic và chức năng của hồi hải mã.

Trong đó, acid ursolic cho thấy tác dụng cải thiện trí nhớ mạnh hơn acid oleanolic vì mức liều có hiệu quả thấp hơn (6 mg/kg so với 24 mg/kg). Cơ chế chính xác tại sao UA có hiệu quả hơn OA vẫn chưa được biết đến. Tuy nhiên, cấu trúc hóa học của UA và OA khác nhau ở vị trí một nhóm metyl ở C_{19} và C_{20} tương ứng, có thể chịu trách nhiệm về sự khác biệt tác dụng của 2 chất đồng phân cấu tạo của nhau này *(Phụ lục 3)*. Điều này có thể lý giải bởi cấu trúc hóa học ảnh hưởng đến một số yếu tố như ái lực liên kết nội bào của chất với các thành phần nội bào khác nhau tham gia vào quá trình chu kỳ tế bào hoặc các đặc tính dược động học bao gồm hấp thu và phân bố [208]. Theo Jeong và cộng sự [209], các thông số dược động học đường uống của acid oleanolic trên chuột cống không xác định được ở liều 10 mg/kg, sinh khả dụng đường uống thấp 0,7% do hấp thu ở đường tiêu hóa kém và chuyển hóa ở microsom ở gan sau đó. Với cùng mức liều 10mg/kg đường uống trên chuột cống, trong nghiên cứu của Ge và cộng sự [210], các thông số dược động học của UA thu được là diện tích dưới đường cong $AUC_{0\rightarrow12}$ =1.37 ± 0.43 µg·h/mL; C_{max} = 1.17 ± 0.27 µg/mL; T_{max} = 0.75 ± 0.07 h. Cấu trúc cơ bản của UA đã được phát hiện trong các mẫu huyết thanh của chuột sau khi uống hợp chất này, cho thấy rằng nó được hấp thu tốt ở đường tiêu hóa [211]. Ngoài ra, 1 giờ sau khi uống, UA đã được phát hiện trong não của chuột, cho thấy khả năng vượt qua hàng rào máu não (nơi tiếp giáp kiểm soát chặt chẽ việc vận chuyển vật chất vào não) do có phân tử lượng thấp [212].

4.3.4.2. Cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của UA

Do UA đã thể hiện tác dụng cải thiện trí nhớ tốt hơn OA nên nghiên cứu chỉ tiếp tục tìm hiểu sâu hơn cơ chế bảo vệ thần kinh của UA với mức liều thấp (6 mg/kg) bằng cách xác định hoạt độ AChE, biểu hiện protein ChAT và VEGF hồi hải mã.

a, Hoạt độ AChE vỏ não

Nghiên cứu đã chỉ ra UA (6 và 12 mg/kg) có hiệu quả tương đương DNP trong việc giảm hoạt độ AChE ở vỏ não của chuột OBX trên *ex vivo*. Kết quả này phù hợp với kết quả trên *in vitro* của nghiên cứu trước đây, acid ursolic của *Origanum majorana* L. được chứng minh có tác dụng ức chế mạnh hoạt động AChE phụ thuộc vào liều lượng và nồng độ cần thiết để ức chế 50% enzym (giá trị IC_{50}) là 7,5 nM, so với tacrin là 1 nM

[213]. Điều này khẳng định tác dụng cải thiện trí nhớ của UA là thông qua hệ cholinergic ở vỏ não như một chất ức chế AChE, cũng như vai trò quan trọng của UA đối với tác dụng của cao chiết cồn hương nhu tía. Do Alzheimer có liên quan mật thiết đến sự thiếu hụt chất dẫn truyền thần kinh acetylcholin (ACh) ở vùng hải mã và vỏ não [214] nên chất ức chế AChE có thể làm giảm các triệu chứng điển hình của bệnh Alzheimer như chứng hay quên hoặc rối loạn hành vi được cho là do làm tăng nồng độ acetylcholin (ACh) [215] và tiếp tục có lợi trong giai đoạn AD nặng hơn [216, 217]. Từ đó cho thấy tiềm năng to lớn của UA, cũng như dược liệu hương nhu tía trong quá trình tìm kiếm liệu pháp điều trị sa sút trí tuệ ưu việt; trong bối cảnh việc phát triển các chất ức chế AChE vẫn là một chiến lược đầy hứa hẹn [218] khi mà hiệu quả của các thuốc ức chế AChE hiện tại bao gồm donepezil (Aricept®), galantamin (Reminyl®) và rivastigmin (Exelon®) bị cản trở bởi các tác dụng không mong muốn của chúng, chẳng hạn như rối loạn tiêu hóa, độc tính với gan và hạ huyết áp [219-221].

b, Biểu hiện protein ChAT

ChAT (một dấu hiệu chức năng tiền synap của tế bào thần kinh cholinergic) đã được đề xuất công nhận như một dấu ấn sinh học để phát hiện sớm AD và các rối loạn sa sút trí tuệ thoái hóa thần kinh khác [222]; do nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng ở những bệnh nhân mắc chứng sa sút trí tuệ do tuổi già kiểu Alzheimer, hoạt động của ChAT trong vỏ não, hồi hải mã và thùy khứu giác giảm rõ rệt [223]. Phương pháp Western blot trong nghiên cứu này cho thấy, chuột OBX có mức độ biểu hiện protein ChAT giảm đáng kể trong hồi hải mã. Kết quả này tương đồng với kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch giai đoạn trước khi số lượng tế bào dương tính với ChAT trong hồi hải mã của chuột OBX cũng bị giảm rõ rệt. Trong một nghiên cứu khác, cường độ huỳnh quang của ChAT cũng được chứng minh là giảm đáng kể ở vỏ não, hồi hải mã và hạch hạnh nhân vào ngày thứ 14 phẫu thuật OBX [181].

Điều thú vị là, luận án đã chứng minh được việc điều trị bằng UA và DNP đã bình thường hóa mức độ biểu hiện của ChAT trong hồi hải mã của chuột OBX, cho thấy cơ chế cải thiện trí nhớ của UA một phần nhờ tăng cường hoạt động của ChAT trong hồi hải mã, có thể gián tiếp thông qua sự gia tăng nồng độ acetylcholin trong não tương tự cơ chế tác dụng của OS.

c, Biểu hiện protein VEGF

Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng UA đã cải thiện mức protein VEGF trong hồi

hải mã của chuột OBX, tương tự DNP. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ thông qua sự tăng cường VEGF trong não của OS đã được chứng minh ở giai đoạn trước của luận án. Mặc dù ban đầu được mô tả là một yếu tố tạo mạch, các yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGFs) ngày càng được làm sáng tỏ vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng và duy trì tế bào thần kinh, có liên quan đến biểu hiện lâm sàng của bệnh Alzheimer [224, 225]. Các mô hình bệnh Alzheimer trên chuột cũng hỗ trợ thêm cho vai trò bảo vệ thần kinh của VEGF, vì tình trạng suy giảm trí nhớ (ví dụ như gánh nặng Aβ ở não, tăng phosphoryl hóa Tau và suy giảm nhận thức) được cải thiện khi động vật được điều trị bằng VEGF [29, 226]. Nhiều nghiên cứu đã chứng tỏ VEGF điều chỉnh một số thành tố của hệ thần kinh trung ương, đặc biệt là ở các tế bào thần kinh dopaminergic, ngược lại, các chất ức chế VEGF có thể liên quan đến chứng sa sút trí tuệ [227].

4.3.4.3. Tác dụng ức chế AChE in vitro của các chất phân lập từ OS

OS cũng như chất phân lập từ nó, acid ursolic đã cho thấy hiệu quả ức chế AChE rõ rệt trên *ex vivo*. Câu hỏi đặt ra là, liệu rằng còn thành phần nào trong OS cũng có tác dụng ức chế AChE nữa không? Mặc dù, kết quả trên *ex vivo* có độ chính xác cao, có giá trị gần với thực tế do đo lường hoạt độ AChE trong não chuột đã được điều trị bằng thuốc, thể hiện tác dụng ức chế AChE của thuốc trên cơ thể sống thực sự, nhưng mất rất nhiều thời gian và chi phí. Trong khi đó thử nghiệm *in vitro* lại nhanh chóng và kinh tế hơn, thích hợp để sàng lọc tác dụng của nhiều chất một lúc. Nhiều loài thực vật hoặc hợp chất đã được báo cáo có biểu hiện ức chế AChE *in vitro* có thể liên quan đến điều trị các rối loạn thoái hóa thần kinh như bệnh Alzheimer [167]. Vì vậy nghiên cứu đã đánh giá tác dụng ức chế AChE *in vitro* của OS, OS-E và cả 5 chất phân lập được từ OS-E, để sàng lọc tác dụng cải thiện trí nhớ tiềm năng, cùng lúc với chứng dương DNP.

Ngoài DNP cho IC_{50} tương tự với các nghiên cứu trước đó [228, 229], tác dụng ức chế AChE *in vitro* của các cao chiết và các chất còn lại là không đáng kể. Trong đó chỉ có acid ursolic là tìm được giá trị IC_{50}. Kết quả này dường như trái ngược với kết quả trên *in vivo* trước đó khi mà OS, OS-E, acid ursolic và acid oleanolic đều cho thấy tác dụng tương tự DNP. Điều này được lý giải rằng tác dụng cải thiện trí nhớ của các cao chiết OS, OS-E, UA và OA chỉ được phát huy rõ rệt sau khi trải qua quá trình dược động học trên cơ thể sống hoặc tác dụng *in vivo* có được có thể là do hiệp đồng với một số cơ chế khác nữa bên cạnh cơ chế ức chế AChE. Tuy nhiên, kết quả *in vitro* này cũng

hướng đến một kết luận tương tự kết quả thu được trên *in vivo* là tác dụng cải thiện trí nhớ của UA mạnh hơn OA.

4.3.4.4. Bàn luận chung về vai trò của acid ursolic và acid oleanolic đối với tác dụng cải thiện trí nhớ của OS

Nói tóm lại, nghiên cứu đã đóng góp những bằng chứng mới, rõ ràng cho tác dụng cải thiện cả trí nhớ làm việc và trí nhớ hình thành qua quá trình học tập dài hạn của UA và OA đối với sự suy giảm nhận thức do OBX, một phần thông qua cơ chế kích thích/bảo vệ hệ cholinergic, phục hồi biểu hiện protein VEGF và có thể tác động tích cực đến chức năng của hồi hải mã bị suy yếu do OBX. Từ đó, nghiên cứu đã làm sáng tỏ thành phần hóa học trong hương nhu tía là UA cùng với OA, đóng một vai trò quan trọng trong tác dụng và cơ chế tác dụng chống sa sút trí tuệ của OS.

OS từ lâu đã được sử dụng làm thuốc trong y học cổ truyền Ấn Độ và làm trà thảo mộc/nguyên liệu ẩm thực ở Việt Nam cũng như các nước Đông Nam Á khác, có tác dụng chống sa sút trí tuệ với một số cơ chế cơ bản tương tự như DNP. Thực tế phải mất nhiều năm trước khi rối loạn chức năng nhận thức của bệnh nhân được chẩn đoán xác định là bệnh Alzheimer. Có thể nói, kết quả của luận án là những đóng góp rất hữu ích, đưa ra cơ sở khoa học cho việc chuẩn hóa cao OS và sử dụng OS lâu dài nhằm mục đích phòng ngừa hơn là điều trị sa sút trí tuệ, suy giảm trí nhớ bằng các thuốc như DNP.

4.4. Tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía

Lần đầu tiên, nghiên cứu chỉ ra được cao chiết phân đoạn có tác dụng chống trầm cảm rõ nhất trong ba phân đoạn cao chiết hương nhu tía (OS-H, OS-E, OS-B) bằng mô hình OBX, thông qua thử nghiệm hành vi treo đuôi và bơi cưỡng bức. Từ đó nghiên cứu đã chứng minh tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của phân đoạn này ở mức liều thấp hơn bằng mô hình UCMS, đồng thời dự đoán một số hoạt chất chính đóng góp vai trò quan trọng vào tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía.

4.4.1. Tác dụng chống trầm cảm của các cao chiết phân đoạn hương nhu tía trên mô hình OBX

Để xác định được cao chiết phân đoạn giàu thành phần hoạt chất chính tham gia vào tác dụng chống trầm cảm của OS, nghiên cứu tiến hành sàng lọc tác dụng của các cao chiết phân đoạn OS-H, OS-B, OS-E trên mô hình OBX với 2 thử nghiệm hành vi (treo đuôi và bơi cưỡng bức), tìm ra phân đoạn có tác dụng rõ nhất.

4.4.1.1. Tác dụng chống trầm cảm của các cao chiết phân đoạn hương nhu tía trên mô hình OBX trong thử nghiệm treo đuôi (TST)

Thử nghiệm TST được tiến hành dựa trên nguyên tắc khi động vật bị phơi nhiễm với một stress cấp tính (bị treo đuôi), chúng có xu hướng rơi dần vào trạng thái bất động (biểu hiện của hành vi tuyệt vọng). Thời gian bất động gia tăng là một trong các triệu chứng điển hình của rối loạn trầm cảm. Các chất có tác dụng chống trầm cảm sẽ thúc đẩy hành vi cố gắng trốn thoát và làm giảm thời gian bất động của động vật thí nghiệm.

Trong nghiên cứu hiện tại, thời gian bất động của chuột OBX không được điều trị cao hơn rõ rệt khi so sánh với lô chứng sinh lý. Kết quả này phù hợp với các báo cáo trước đây về đặc điểm trầm cảm và lo âu của động vật OBX [97, 121, 176].

Bên cạnh đó, imipramin (thuốc điều trị triệu chứng trầm cảm, kích động hay lo âu theo cơ chế ức chế tái thu hồi serotonin và norepinephrin về các bọc dự trữ ở cúc tận cùng tiền synap [230]) cho thấy tác dụng làm giảm xu hướng dễ rơi vào trạng thái bất động của chuột OBX. Đồng thời, OS cũng thể hiện khả năng chống trầm cảm như công bố trước đây [16] do làm giảm thời gian bất động của chuột OBX ở liều 400 mg/kg. Với kết quả này, nghiên cứu đã chứng tỏ động vật OBX có đáp ứng tốt khi được điều trị lâu dài với các chất chống trầm cảm hiện tại.

Hơn thế nữa, nghiên cứu chỉ ra phân đoạn OS-B có tác dụng chống trầm cảm rõ rệt do làm giảm đáng kể thời gian bất động của chuột OBX trong TST, gần tương đương IMP. Trong khi đó, hai phân đoạn còn lại OS-H và OS-E với cùng mức liều 400 mg/kg nhưng không ghi nhận tác dụng này. Điều này cho thấy cao OS-B có tác dụng chống trầm cảm rõ nhất và có thể giàu các thành phần hoạt chất đóng vai trò quan trọng với tác dụng chống trầm cảm của OS.

4.4.1.2. Tác dụng chống trầm cảm của các cao chiết phân đoạn hương nhu tía trên mô hình OBX trong thử nghiệm bơi cưỡng bức (FST)

Thử nghiệm FST có nguyên tắc tương tự với thử nghiệm treo đuôi. Trong FST, chuột bị buộc phải bơi trong một không gian hạn chế không có lối thoát, sau một thời gian bị kích động, chuột sẽ ngừng cố gắng trốn thoát và trở nên bất động (biểu hiện của hành vi tuyệt vọng). Thông số thời gian bất động tăng lên biểu hiện tình trạng giống như trầm cảm ở người.

Kết quả của luận án cho thấy, *thông số thời gian bất động* của chuột OBX không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê khi so sánh với lô chứng sinh lý. Kết quả thu được

dường như trái ngược đối với một mô hình động vật bị trầm cảm. Tuy nhiên, hành vi giảm thời gian bất động của chuột OBX đã từng được ghi nhận trong một số báo cáo trước đây [231, 232], và được giải thích dựa trên sự tăng vận động quá mức mà chuột OBX bộc lộ trong các tình huống căng thẳng cao độ, không hẳn bởi hành vi trốn thoát có mục đích. Ngược lại, thời gian bất động trong thử nghiệm FST của chuột ddY [233, 234]và chuột cống [235] bị loại bỏ thùy khứu giác vẫn tăng lên so với chuột sinh lý theo đúng quy luật thông thường. Như vậy, hành vi bất động trong FST xuất hiện ở chuột OBX đối với các chủng loài khác nhau có thể có sự khác biệt. Lô chuột OBX được điều trị bởi OS-B và imipramin có thời gian bất động mang xu hướng giảm hơn so với lô bệnh lý nhưng chưa đạt ý nghĩa thống kê.

Trong thử nghiệm này, nghiên cứu cũng quan tâm đến *thông số thời gian trèo*, khi xem xét nỗ lực trốn thoát khỏi tình huống bị đe dọa một cách có định hướng. Kết quả thu được rất thú vị, chuột OBX không được điều trị có sự suy giảm thời gian trèo rõ rệt so với lô chứng sinh lý. Ghi nhận này tương đồng với nghiên cứu trước đó của Linge [231], trong đó việc giảm nỗ lực trốn thoát một cách có định hướng ở chuột OBX được xem là hành vi tuyệt vọng, mất khả năng đối mặt với tình trạng stress – là biểu hiện triệu chứng của trầm cảm. Lý giải sự khác biệt về hành vi trong FST, khả năng bơi lội được cho là liên quan đến chất dẫn truyền hệ serotonergic còn hành vi trèo liên quan đến chất dẫn truyền hệ noradrenergic [160]. Việc loại bỏ thùy khứu giác đã được báo cáo là làm giảm norepinerprin và acid 5-hydroxyindolacetic (5-HIAA) trong vỏ não trước và làm tăng serotonin trong hạch hạnh nhân (amygdala) [236].

Cao OS 400 mg/kg có tác dụng cải thiện đáng kể thời gian trèo của chuột OBX, cho thấy đáp ứng của chuột OBX với chất chống trầm cảm có thể thông qua thông số thời gian trèo trong FST. Cryan và cộng sự [237] đã chỉ ra các thuốc chống trầm cảm ức chế tái thu hồi chọn lọc serotonin làm tăng thời gian bơi của chuột trong khi các thuốc ức chế tái thu hồi chọn lọc norepinerprin làm tăng thời gian trèo. Đồng thời cao OS-B trong nghiên cứu cũng cho thấy tác dụng làm tăng thời gian trèo rất rõ rệt, trong khi 2 phân đoạn còn lại OS-E và OS-H cùng liều 400 mg/kg không thể hiện được tác dụng này. Do đó, các thành phần hoạt chất đang có mặt trong phân đoạn OS-B có thể chịu trách nhiệm chính cho tác dụng chống trầm cảm của OS và cơ chế tác dụng một phần thông qua hoạt động của hệ noradrenergic. Ngoài ra, nghiên cứu cũng đề xuất một một công cụ hữu ích để đánh giá tác dụng của các chất chống trầm cảm trên mô hình OBX

là thông số hành vi trèo trong FST.

Nhờ mô hình OBX với hai thử nghiệm hành vi TST và FST, một phát hiện mới đã được nghiên cứu chỉ ra là: cao OS-B có chứa các thành phần hóa học đóng góp quan trọng cho tác dụng chống trầm cảm của OS bởi vì phân đoạn này có tác dụng chống trầm cảm rất rõ rệt, trong khi hai phân đoạn còn lại không thể hiện tác dụng. Đồng thời, kết quả của thử nghiệm cũng giúp dự đoán cơ chế chống trầm cảm của OS và OS-B có thể ít nhất một phần là thông qua hệ mononergic tương tự như IMP, nhất là hệ noradrenergic.

Tuy nhiên liều dùng của OS-B trong thử nghiệm này còn cao, 400 mg/kg, tương đương liều của cao OS toàn phần. Thực tế là, nếu tính theo hiệu suất chiết, từ 4kg dược liệu khô tương ứng với 660g OS, thu được 68g OS-B, có thể thấy liều có tác dụng của OS-B không thấp hơn 42 mg/kg. Điều này định hướng cho luận án tiếp tục nghiên cứu sâu hơn nhằm làm sáng tỏ tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của phân đoạn OS-B với mức liều thấp hơn (50 mg/kg và 100 mg/kg). Để thực hiện nghiên cứu này, mô hình chuột nhắt gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS) đã được sử dụng. Có rất nhiều kiểu mô hình trầm cảm của loài gặm nhấm bắt chước nhiều khía cạnh của bệnh trầm cảm ở người nhưng không có mô hình nào thực sự là lý tưởng. Do đó, việc sử dụng đồng thời 2 mô hình, mỗi loại có điểm mạnh và điểm yếu riêng, nghiên cứu có thể khắc phục được việc thiếu đi một mô hình lý tưởng duy nhất, cho kết quả có độ tin cậy cao [238].

4.4.2. Tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của cao OS-B trên mô hình UCMS

4.4.2.1. Tác dụng chống trầm cảm của OS-B thông qua các thử nghiệm hành vi

a, Thử nghiệm tiêu thụ saccharose (SPT)

Hành vi giảm hứng thú (anhedonia), một trong hai triệu chứng cốt lõi trong chẩn đoán trầm cảm (cùng với giảm khí sắc), đã trở thành thước đo quan trọng nhất để đánh giá trầm cảm trên thực nghiệm [57]. Đối với loài gặm nhấm, anhedonia được biểu hiện thông qua hành vi giảm đáp ứng với phần thưởng (có thể là đồ ăn, thức uống có vị ngọt hoặc vị trí ngụ cư ưa thích), trong đó thông số phổ biến nhất thường dùng để nhận định hành vi này là lượng saccharose tiêu thụ [239]. Hơn nữa, thông số này có độ tin cậy rất cao khi xu hướng tiêu thụ saccarose đã được báo cáo là một hành vi độc lập đối với sự thay đổi cân nặng và nhu cầu tiêu thụ nước uống của động vật thí nghiệm [179]. Do đó,

trong nghiên cứu, thử nghiệm SPT đã được sử dụng để đánh giá hành vi giảm hứng thú của động vật thí nghiệm.

Kết quả của luận án cho thấy, chuột UCMS đã có biểu hiện hành vi giảm hứng thú với phần thưởng, thông qua sự giảm dần lượng saccharose tiêu thụ theo thời gian khi so sánh với lô sinh lý. Điều này chứng tỏ rằng, nghiên cứu đã thành công trong việc thiết lập mô hình UCMS tái hiện được hành vi giảm hứng thú anhedonia - một triệu chứng rất điển hình của bệnh nhân trầm cảm. Hành vi giảm hứng thú được cho là có liên quan đến rối loạn chức năng trong các quá trình đáp ứng với phần thưởng của não bộ [172]. Đặc biệt, hệ dopaminergic đóng một vai trò quan trọng trong việc kiến tạo các ý nghĩ về dự đoán phần thưởng của não bộ, kích thích động lực và phản ứng với các khuyến khích có điều kiện [240]. Mặt khác, sự suy giảm của hệ dopaminergic đã được báo cáo ở động vật bị stress mạn tính nhẹ [241], cũng như ở bệnh nhân trầm cảm [242].

Việc điều trị lâu dài với thuốc chứng dương imipramin đã làm giảm đáng kể biểu hiện hành vi giảm hứng thú với đồ ngọt ở chuột UCMS. Kết quả giúp khẳng định giá trị dự đoán của mô hình UCMS khi mô hình này cho thấy sự đáp ứng tốt với thuốc chống trầm cảm trên lâm sàng.

Đồng thời, OS-B (50 và 100 mg/kg) với tác dụng phụ thuộc liều cũng có xu hướng cải thiện hành vi giảm hứng thú trên chuột UCMS. Trong đó, tác dụng của OS-B 100 mg/kg thể hiện rất rõ rệt, tương đương với IMP. Theo đó, ảnh hưởng làm tăng hứng thú với đồ ngọt của OS-B và imipramin trên chuột UCMS đã gợi ý rằng OS-B có tác dụng chống trầm cảm thông qua cải thiện hành vi anhedonia và cơ chế tác dụng có thể một phần là do tác động lên hệ dopaminergic trong não.

b, Thử nghiệm TST và FST

Thử nghiệm TST và FST tiếp tục được dùng để đánh giá hành vi tuyệt vọng và hành vi trốn thoát có định hướng trên mô hình UCMS. Chuột UCMS có biểu hiện hành vi tuyệt vọng rất rõ rệt so với lô sinh lý khi kéo dài đáng kể thời gian bất động trong thử nghiệm hành vi TST và FST, đồng thời chuột UCMS cũng có biểu hiện giảm hành vi trốn thoát có định hướng thông qua thông số thời gian trèo trong FST. Như vậy, mô hình UCMS đã tái hiện rõ nét một số triệu chứng của trầm cảm trong cả hai thử nghiệm này.

Chuột UCMS được điều trị bằng IMP đã làm giảm đáng kể biểu hiện hành vi tuyệt vọng và tăng hành vi trốn thoát có định hướng, góp phần củng cố giá trị dự đoán của mô hình UCMS.

Tương tự như kết quả thu được trên mô hình OBX, tác dụng chống trầm cảm rõ rệt của OS-B đã được chứng minh với mức liều thấp hơn nhiều (50 và 100 mg/kg), thông qua giảm thời gian bất động của chuột OBX trong cả 2 thử nghiệm và tăng thời gian trèo trong FST. Hơn nữa, tác dụng chống trầm cảm của OS-B là tác dụng phụ thuộc liều, đặc biệt với mức liều 100 mg/kg. OS-B đã cho thấy tác dụng trội hơn so với thuốc chứng dương imipramin trong cả 2 thử nghiệm. Ngoài ra, kết quả của hai thử nghiệm này cũng gợi ý cơ chế tác dụng của OS-B có thể một phần thông qua hệ monoaminergic bao gồm serotonergic và noradrenergic.

c, Thử nghiệm môi trường mở (OFT)

Tác động làm giảm thời gian bất động của chuột UCMS trong TST và FST của OS-B có thể do khả năng làm tăng hoạt động kích thích tâm thần ở động vật UCMS, dẫn đến kết quả tác dụng chống trầm cảm của OS-B là dương tính giả. Tuy nhiên, giả thuyết này hoàn toàn bị bác bỏ với kết quả của thử nghiệm môi trường mở OFT. Thực vậy, kết quả đánh giá vận động tự nhiên trong OFT cho thấy, không có sự khác biệt nào được phát hiện ở cả 2 thông số hoạt động theo chiều dọc và hoạt động theo chiều ngang giữa các lô, chứng tỏ rằng, mô hình UCMS không làm thay đổi vận động tự nhiên của chuột và OS-B (ở cả 2 mức liều 50 - 100 mg/kg/ngày) cũng hoàn toàn không ảnh hưởng đến vận động tự nhiên của chuột UCMS.

Ngoài ra, trong thử nghiệm OFT này, thông số thời gian tự chải lông (self-grooming) của chuột cũng được đánh giá. Đánh giá hành vi tự chải lông trong OFT đã từng được Ken và cộng sự thực hiện [243]. Khi tự chải lông, chuột tự làm sạch cơ thể và bộ lông của mình bằng các hành vi liên quan như vuốt mặt bằng cả hai chân trước, gãi ngứa, gặm và liếm các bộ phận cơ thể. Bên cạnh việc giảm ưa thích đồ ngọt, giảm hành vi tự chải lông cũng là biểu hiện của suy giảm sự quan tâm đối với các hoạt động thường ngày hoặc giảm độ nhạy cảm với khoái cảm, một dạng biểu hiện khác của kiểu hành vi giảm hứng thú [168]. Ở loài gặm nhấm, hoạt động chải lông có thể xuất hiện trong khoảng 15-50% thời gian thức và có thể tăng lên bởi tính mới, trạng thái ướt, đau, tiếp xúc với loài săn mồi hoặc hành vi tình dục [244].

Điều thú vị là, tương ứng với kết quả ghi nhận được từ SPT, nghiên cứu đã ghi nhận UCMS làm giảm rõ rệt thời gian chải lông trên chuột. Mặc dù mối liên quan giữa việc giảm chải lông và rối loạn trầm cảm trên động vật chưa được nghiên cứu đầy đủ, kết quả của luận án đã cung cấp thêm bằng chứng mới cho thấy hoạt động chải lông hay

hành vi tự chăm sóc có khả năng phản ánh biểu hiện anhedonia trên mô hình UCMS – một triệu chứng trầm cảm của động vật thí nghiệm [243, 244]. Hành vi này có thể tương ứng với sự suy giảm các hoạt động tự chăm sóc thường ngày (như vệ sinh cá nhân) trên bệnh nhân trầm cảm nặng.

Nghiên cứu cũng chỉ ra việc điều trị lâu dài bằng OS-B và imipramin đã làm giảm đáng kể triệu chứng của anhedonia trên chuột UCMS thể hiện ở sự gia tăng của thông số thời gian chải lông trong thử nghiệm OFT. Đây là bằng chứng hỗ trợ thêm cho kết luận rằng OS-B có tác dụng cải thiện tình trạng anhedonia trên chuột UCMS, tương tự như imipramin.

4.4.2.2. Cơ chế tác dụng chống trầm cảm của cao OS-B trên mô hình UCMS

Hệ monoaminergic trong não đóng một vai trò thiết yếu trong tác dụng lâm sàng của các loại thuốc chống trầm cảm điển hình và không điển hình khác nhau bao gồm imipramin. Với mục đích tìm hiểu xem cơ chế tác dụng chống trầm cảm của OS-B có thông qua hệ monoaminergic như dự đoán hay không, α-methyl-ρ-tyrosin (AMPT) và DL-ρ-chlorophenyl alanin (PCPA), 2 chất ức chế sinh tổng hợp catecholamin và serotonin tương ứng, đã được sử dụng. Do thử nghiệm TST gây ít căng thẳng hơn FST và có độ nhạy dược lý cao hơn [174], nên TST tiếp tục được dùng cho nghiên cứu này.

a, Thông qua hệ noradrenergic và dopaminergic

Kết quả cho thấy, tác dụng giảm thời gian bất động của OS-B 100 mg/kg/ngày và IMP 8 mg/kg/ngày trên hành vi của chuột UCMS trong TST đã hoàn toàn bị loại bỏ bởi AMPT, chứng tỏ AMPT có đối kháng tác dụng với OS-B và IMP. Trong nghiên cứu trước đây, AMPT đã từng được báo cáo là làm mất tác dụng có được do điều trị lâu dài bằng IMP trên mô hình bất lực đã học ở chuột (Learned Helplessness, LH) [245]. AMPT là một chất ức chế tyrosine hydroxylase, enzym chuyển đổi tyrosin thành 3,4-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA). Tiếp theo, L-DOPA được chuyển đổi thành dopamin nhờ L-amino acid decarboxylase và thành norepinephrin nhờ dopamin-β-hydroxylase [246]. Bằng chứng lâm sàng cho thấy tổng hợp dopamin và norepinerprin bị giảm bởi AMPT, điều này dẫn đến gia tăng các triệu chứng trầm cảm ở bệnh nhân [247, 248]. Như vậy, có thể chỉ ra rằng cơ chế tác dụng chống trầm cảm của OS-B có sự tham gia ít nhất một phần bởi sự gia tăng các chất dẫn truyền thần kinh của hệ noradrenergic và dopaminergic.

b, Thông qua hệ serotonergic

Tác dụng của AMPT lên nồng độ và sự vận chuyển monoamin chỉ tồn tại trong một thời gian ngắn và sau đó sẽ mất đi. Sự phục hồi của monoamin về mức bình thường sau khi dùng AMPT đã được chứng minh mất khoảng 2 đến 7 ngày [249]. Vì vậy, PCPA đã được sử dụng ở tuần 11 sau khi dùng AMPT (tuần 9) ít nhất 10 ngày để đảm bảo rằng AMPT và tác dụng của nó đã được loại bỏ hoàn toàn trước khi sử dụng PCPA.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, PCPA đã làm mất tác dụng làm giảm thời gian bất động trong TST của cả OS-B và IMP, chứng tỏ PCPA cũng có đối kháng tác dụng với OS-B và IMP. PCPA là một chất ức chế chọn lọc tryptophan hydroxylase (TPH) tham gia vào quá trình sinh tổng hợp serotonin (5-HT), làm giảm hoạt động của TPH ở cả thân tế bào và các vùng đầu dây thần kinh nơi chứa các tế bào 5-HT [250]. Nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, sự suy giảm 5-HT (78–82%) khi sử dụng PCPA, đã ngăn chặn khả năng làm giảm thời gian bất động của thuốc chống trầm cảm trong TST [251]. Do đó, kết quả nghiên cứu cho thấy tác dụng chống trầm cảm của OS-B phụ thuộc vào sự sẵn có của serotonin trong khe hở khớp thần kinh, bằng cách tác động lên hệ serotonergic.

Tóm lại, tác dụng chống trầm cảm của OS-B trên chuột UCMS theo cơ chế phụ thuộc vào mức độ các monoamin nội sinh, cụ thể là tăng cường hoạt động của hệ noradrenergic, dopaminergic và serotonergic trong não. Phát hiện mới này của luận án cũng góp phần giải thích cho cơ chế tác dụng cải thiện của OS-B đối với chứng giảm hứng thú ở động vật UCMS đã trình bày ở trên.

4.4.3. Bàn luận chung về tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của OS-B

Bằng cả hai mô hình OBX và UCMS, nghiên cứu đã tìm ra cao phân đoạn OS-B có tác dụng chống trầm cảm rõ rệt với mức liều khá thấp 100 mg/kg và nó có thể chứa các thành phần hoạt chất tiềm năng đóng góp quan trọng vào tác dụng chống trầm cảm của OS. Cụ thể là, OS-B đã cải thiện được hành vi tuyệt vọng và hành vi giảm trốn thoát có định hướng trên cả mô hình OBX và mô hình UCMS. Đồng thời, OS-B cũng cải thiện được hành vi giảm hứng thú bao gồm giảm đáp ứng với phần thưởng và giảm chải lông trên mô hình UCMS.

Những phát hiện của nghiên cứu hiện tại cũng chỉ ra cơ chế tác dụng chống trầm cảm của OS-B, là một phần thông qua tăng cường các chất dẫn truyền thần kinh monoamin nội sinh của hệ noradrenergic, dopaminergic và serotonergic trong não,

tương tự như IMP. Đồng thời, ở giai đoạn trước, luận án đã chứng minh cao OS làm tăng số lượng tế bào dương tính với DCX ở hồi hải mã não chuột OBX. Nhiều bằng chứng cho thấy quá trình tăng sinh liên tục tế bào thần kinh ở vùng hồi răng của hồi hải mã không chỉ đóng vai trò quan trọng trong chức năng ghi nhớ, học tập [252], mà còn tác động đến hành vi cảm xúc [253], đồng thời có mối liên hệ phức tạp trong cơ chế bệnh sinh trầm cảm [254]. Sự tăng sinh tế bào thần kinh hồi hải mã đáp ứng rõ nét với các mô hình gây trầm cảm trên động vật và các thuốc chống trầm cảm hiện có [255]. Điều này gợi ý rằng, tác dụng chống trầm cảm của OS quan sát được trên chuột OBX ở các thử nghiệm hành vi trong nghiên cứu trước đây [16], có thể một phần là nhờ khả năng cải thiện mức độ tăng sinh và thúc đẩy sự phát triển các tế bào tiền thân thần kinh. Ngoài ra, theo E. J Richard và cộng sự, tác dụng chống stress của cao chiết *Ocimum sanctum* chuẩn hóa (ociglycosid-I (> 0,1% kl/kl), (2) acid rosmarinic (> 0,2% kl/kl), và các acid triterpen như (3) acid oleanolic và (4) acid ursolic (> 2,5% kl/kl)) trên mô hình chuột cống gây stress mạn tính đa dạng (chronic variable stress rats) có thể thông qua cơ chế ức chế giải phóng cortisol trong máu, khóa thụ thể của hormon giải phóng corticotropin typ 1, cũng như cản trở hoạt động của 11β-hydroxysteroid dehydrogenase typ 1 và catechol-O-methyltransferase trên *in vitro* [15]. Vì vậy, không thể phủ nhận rằng, cơ chế tác dụng của OS-B không chỉ phụ thuộc vào hệ monoaminergic mà còn có thể do những cơ chế khác nữa.

4.4.4. Dự đoán thành phần hóa học có thể đóng vai trò quan trọng trong tác dụng chống trầm cảm của OS

Sau khi xác định được cao OS-B có tác dụng chống trầm cảm rõ nhất, 6 thành phần hoạt chất của OS-B đã phân lập được bao gồm: apigenin (1), luteolin (2), luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid (3), apigenin-7-*O*-*β*-D-glucuronid (4), acid oleanolic (5) và acid ursolic (6) *(Phụ lục 2 – Bảng 1)*. Theo đó, những thành phần này rất có thể đã tham gia đóng góp ít nhất một phần vào tác dụng chống trầm cảm của OS với cơ chế thông qua hệ monoaminergic. Căn cứ vào kết quả định lượng các chất phân lập trong cao OS-B, thành phần có hàm lượng cao nhất là luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid với 5,82% và apigenin-7-*O*-*β*-D-glucuronid với 2,26%. Tuy nhiên, luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid cũng có hàm lượng rất cao trong phân đoạn OS-E (7,75%) *(Phụ lục 2 – Bảng 1)* mà phân đoạn OS-E lại không thể hiện tác dụng chống trầm cảm. Như vậy, thành phần đóng góp vai trò quan trọng đối với tác dụng chống trầm cảm của OS-B có thể là apigenin-7-*O*-*β*-D-glucuronid

hoặc là các thành phần hoạt chất trong OS-B cùng hiệp đồng tác dụng chống trầm cảm. Ngoài ra, một số nghiên cứu dược lý đã báo cáo rằng apigenin có hoạt tính chống trầm cảm và tác dụng lên hóa học thần kinh liên quan đến trầm cảm như tăng hoạt tính của norepinephrin, ức chế hoạt động của MAO, kích thích hấp thu L-tyrosin [256]; làm giảm các thay đổi về nồng độ serotonin (5-HT), chất chuyển hóa của nó là 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), dopamin (DA) và tỷ lệ 5-HIAA / 5-HT trong não do stress nhẹ trường diễn (CMS) [257]. Luteolin cũng có tác dụng giống như thuốc chống trầm cảm, một phần do cơ chế ức chế và điều hòa chất vận chuyển monoamin qua màng sinh chất [258].

Tổng hợp lại, luận án đã có đóng góp mới về cơ chế tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía một phần thông qua hệ serotonergic, noradrenergic và dopaminergic. Hơn nữa, luteolin, apigenin và apigenin-7-*O*-*β*-D-glucuronid được phân lập từ phân đoạn n-buthanol của hương nhu tía có thể là những hợp chất có hoạt tính chống trầm cảm tiềm năng, cần được làm sáng tỏ trong những nghiên cứu tiếp theo.

4.5. Bàn luận chung

Hương nhu tía là dược liệu được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền đồng thời cũng đã được chứng minh có tác dụng trên tâm thần và thần kinh. Tuy nhiên, trong luận án này, lần đầu tiên hương nhu tía 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.

Thứ nhất, nghiên cứu là một trong số ít công trình đã triển khai thành công cả hai mô hình chuột nhắt 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 trèo và trong thử nghiệm OFT là thời gian chải lông.

Thứ hai, 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 cồn hương nhu tía đã được đưa ra như:

- Với tác dụng cải thiện trí nhớ: tăng cường hệ cholinergic (ức chế AChE và tăng số lượng tế bào ChAT vách ngăn 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.

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

- 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 [62], giãn rộng não thất bên hoặc teo cục bộ thùy trán đã được ghi nhận trên bệnh nhân trầm cảm [63].

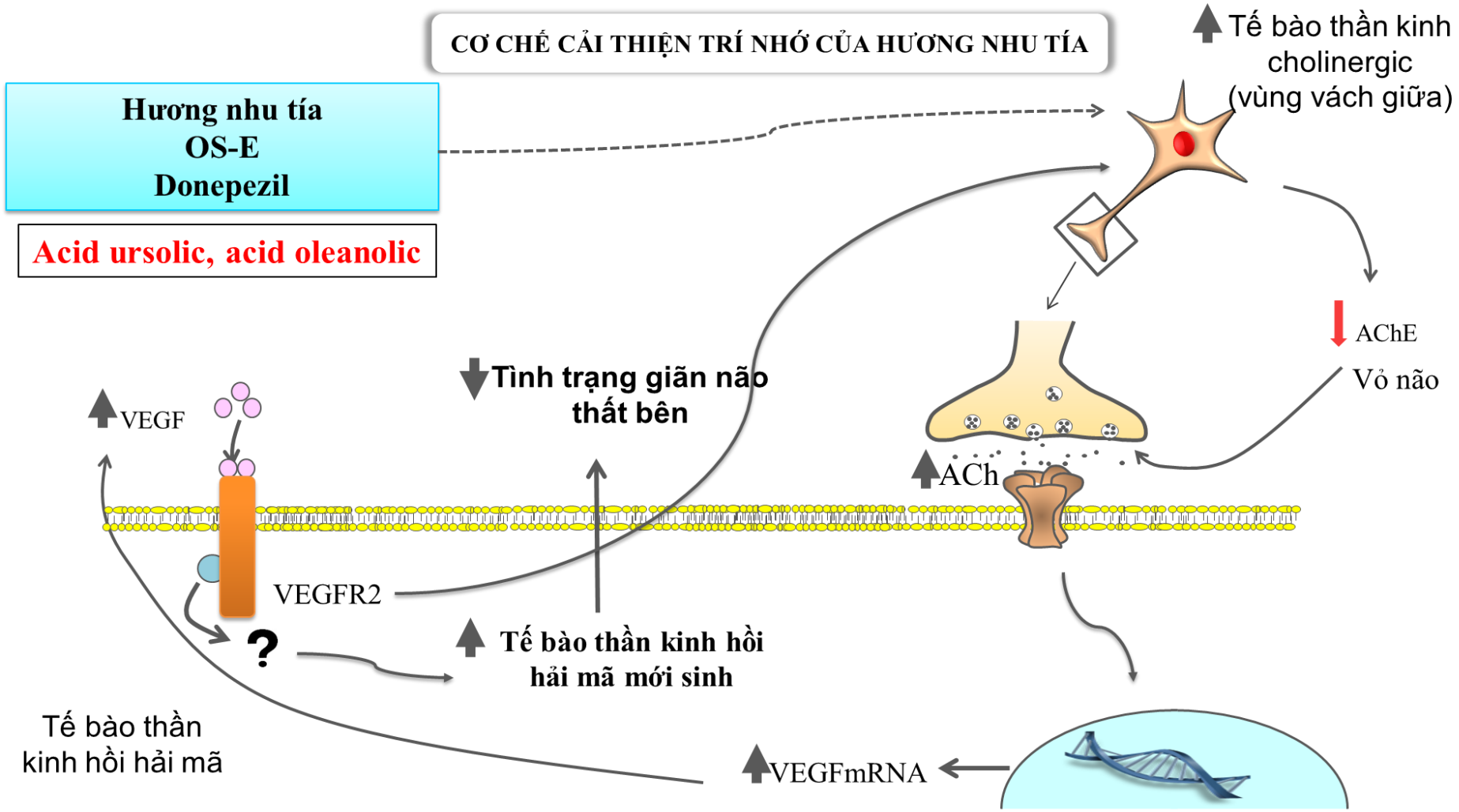
Đây là một phát hiện rất có giá trị về tiềm năng rất lớn của hương nhu tía trong điều trị lâm sàng, vì suy giảm trí nhớ và trầm cảm có quan hệ mật thiết và thường hay đi kèm với nhau. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra mối liên hệ giữa trầm cảm và suy giảm nhận thức ở những người lớn tuổi [6]. Trầm cảm có thể là một tình trạng bệnh đi kèm, có trước chứng sa sút trí tuệ và có xu hướng xảy ra ở 50% bệnh nhân AD với nguyên nhân chính là do suy giảm norepinephrin và serotonin trong não [7]. Ngược lại, ngày càng có nhiều bằng chứng về rối loạn chức năng nhận thức trong các rối loạn trầm cảm và lo âu [8, 9]. Nghiên cứu trên lâm sàng cho thấy thể tích hồi hải mã điều chỉnh mối liên hệ theo chiều dọc giữa các triệu chứng trầm cảm và nhận thức, đóng góp ít nhất một phần vai trò đối với các con đường liên quan, có thể bao gồm thoái hóa thần kinh qua

trung gian Tau, tăng thể tích máu hoặc phản ứng viêm [259]. 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.

Thứ ba, 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. Như vậy, nghiên cứu đã tạo cơ sở tin cậy cho công tác tiêu chuẩn hóa thành phần hoạt chất trong các chế phẩm có tác dụng cải thiện trí nhớ, hoặc chống trầm cảm, hoặc cả hai tác dụng nêu trên. Thêm vào đó, đã có một số nghiên cứu chứng minh thành phần tinh dầu trong hương nhu tía như eugenol có tác dụng chống viêm [260], chống oxy hóa [261]. Stress oxy hóa là một dấu hiệu phổ biến được quan sát thấy của các rối loạn thoái hóa thần kinh [262]. Do đó, thành phần tinh dầu trong hương nhu tía cũng có thể có tiềm năng bảo vệ thần kinh, làm chậm sự tiến triển và hạn chế mức độ mất tế bào thần kinh trong những rối loạn này.

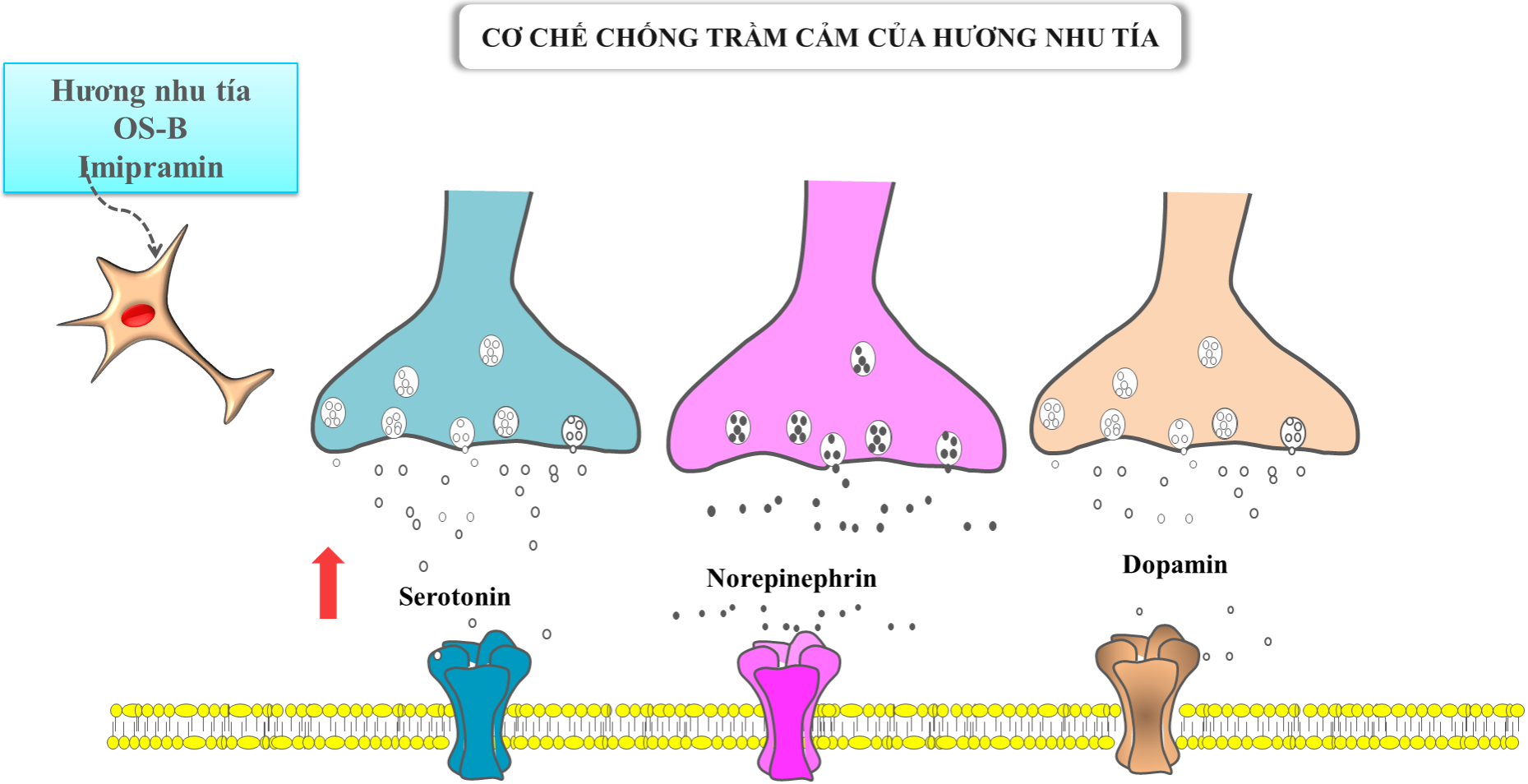
Có thể sơ đồ hóa tác dụng và cơ chế tác dụng của hương nhu tía như *Hình 4.1. và 4.2.*

Tóm lại, các kết quả của luận án đã góp phần tạo cơ sở khoa học vững chắc cho việc sử dụng hương nhu tía, một dược liệu sẵn có, đã được trồng rộng rãi và khai thác theo tiêu chuẩn của Việt Nam, trong dự phòng và điều trị sa sút trí tuệ và trầm cảm. Đồng thời, 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.



Hình 4.1. *Tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ của hương nhu tía*

(Mũi tên ⬆ chỉ sự gia tăng, mũi tên ⬇ chỉ sự giảm các yếu tố trong não)



Hình 4.2. *Tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của hương nhu tía*

(Mũi tên màu đỏ chỉ sự gia tăng các chất dẫn truyền thần kinh gồm serotonin, norepinephrin và dopamin trong não)

KẾT LUẬN

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

- Cao chiết cồn 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 (trong thử nghiệm nhận diện vật thể và thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến) trên chuột OBX.

- Một số cơ chế tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ của cao chiết cồn 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 cao chiết phân đoạn ethyl acetat là acid ursolic và acid oleanolic đã được chứng minh có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ không gian ngắn hạn (trong thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến) và dài hạn (trong thử nghiệm mê lộ nước Morris) 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 độ 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 chiết cồn 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 chiết phân đoạn n-butanol (50 và 100 mg/kg/ngày, đường uống) có tác dụng chống trầm cảm phụ thuộc liều trên chuột UCMS. Trong đó, cao chiết phân đoạn

n-butanol 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 chiết phân đoạn n-butanol 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 cao chiết phân đoạn n-butanol trên chuột UCMS một phần thông qua tác động lên hệ monoaminergic, cụ thể là hệ serotonergic (thử nghiệm sử dụng chất đối kháng DL-ρ-chlorophenyl alanin (PCPA)), noradrenergic và domapinergic (thử nghiệm sử dụng chất đối kháng α-methyl-ρ-tyrosin (AMPT)).

ĐỀ XUẤT

Các kết quả trong luận án cho thấy, hương nhu tía có khả năng cải thiện trí nhớ và chống trầm cảm trên thực nghiệm. Hiện nay, nguồn dược liệu hương nhu tía trong nước khá dồi dào, đã được trồng quy mô và theo tiêu chuẩn hóa. Để có thể khai thác và sử dụng hương nhu tía có hiệu quả hơn nữa trong công tác dự phòng và điều trị các bệnh lý rối loạn tâm thần – thần kinh như trầm cảm và Alzheimer, tác giả xin đề xuất:

- 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 độc tính cấp và độc tính 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.

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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Australia, D, Baker, S, and Banerjee, S (2019), "Alzheimer's disease international. World Alzheimer report 2019: Attitudes to dementia", *Alzheimer's Disease International; Alzheimer's Disease International: London, UK*.
2. Association, Alzheimer's (2021), *2021 Alzheimer's disease facts and figures*, Alzheimers Dement.
3. Depression, WHO (2017), "Other common mental disorders: Global health estimates", *Geneva: World Health Organization*, pp. 1-24.
4. Nguyễn Bích Ngọc (2014), "Chất lượng cuộc sống của bệnh nhân Alzheimer, người chăm sóc và đánh giá hiệu quả của một số biện pháp can thiệp không dùng thuốc", *Luận án Tiến sĩ Y học*.
5. Bộ Y tế (2017), "Niên giám Thống kê Y tế".
6. Wilson, Robert S, Capuano, Ana W, Boyle, Patricia A, Hoganson, George M, Hizel, Loren P, Shah, Raj C, Nag, Sukriti, Schneider, Julie A, Arnold, Steven E, and Bennett, David A (2014), "Clinical-pathologic study of depressive symptoms and cognitive decline in old age", *Neurology*. 83(8), pp. 702-709.
7. Modrego, Pedro J (2010), "Depression in Alzheimer's disease. Pathophysiology, diagnosis, and treatment", *Journal of Alzheimer's Disease*. 21(4), pp. 1077-1087.
8. Dybedal, Gro Strømnes, Tanum, Lars, Sundet, Kjetil, Gaarden, Torfinn Lødøen, and Bjølseth, Tor Magne (2013), "Neuropsychological functioning in late-life depression", *Frontiers in psychology*. 4, p. 381.
9. Castaneda, Anu E, Tuulio-Henriksson, Annamari, Marttunen, Mauri, Suvisaari, Jaana, and Lönnqvist, Jouko (2008), "A review on cognitive impairments in depressive and anxiety disorders with a focus on young adults", *Journal of affective disorders*. 106(1-2), pp. 1-27.
10. Ahmad, Ajmal, Khan, Mohd Moshahid, Raza, Syed Shadab, Javed, Hayate, Ashafaq, Mohammad, Islam, Farah, Safhi, Mohammed M, and Islam, Fakhrul (2012), "*Ocimum sanctum* attenuates oxidative damage and neurological deficits following focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats", *Neurological sciences*. 33(6), pp. 1239-1247.
11. Joshi, Hanumanthachar and Parle, Milind (2006), "Evaluation of nootropic potential of *Ocimum sanctum* Linn. in mice".
12. Sampath, Suneetha, Mahapatra, SC, Padhi, MM, Sharma, Ratna, and Talwar, Anjana (2015), "Holy basil (*Ocimum sanctum* Linn.) leaf extract enhances

specific cognitive parameters in healthy adult volunteers: A placebo controlled study", *Indian J Physiol Pharmacol*. 59(1), pp. 69-77.

13. Kusindarta, Dwi Liliek, Wihadmadyatami, Hevi, and Haryanto, Aris (2016), "*Ocimum sanctum* Linn. stimulate the expression of choline acetyltransferase on the human cerebral microvascular endothelial cells", *Veterinary world*. 9(12), p. 1348.
14. Năng, Trần Đình, Nguyễn Hoàng Giao, Dương Phước An, Nguyễn Thị Thu Vân, and Yến, Trần Phi Hoàng (2011), "Khảo sát khả năng cải thiện sự suy giảm trí nhớ của cao chiết lá Hương nhu tía (*Ocimum sanctum*) trên chuột nhắt", *Y Học TP. Hồ Chí Minh*. 15(Phụ bản số 1), pp. 124-129.
15. Jothie Richard, Edwin, Illuri, Ramanaiah, Bethapudi, Bharathi, Anandhakumar, Senthilkumar, Bhaskar, Anirban, Chinampudur Velusami, Chandrasekaran, Mundkinajeddu, Deepak, and Agarwal, Amit (2016), "Anti-stress activity of *Ocimum sanctum*: Possible effects on Hypothalamic–Pituitary–Adrenal axis", *Phytotherapy Research*. 30(5), pp. 805-814.
16. Le Thi Xoan, Nguyen Ha Anh (2015), "Antidepressant-like effect of *Ocimum sanctum* in Olfactory bulbectomized mice", *Tạp chí Dược liệu*. 20(5), pp. 311-316.
17. Bi, Christopher, Bi, Stephanie, and Li, Bin (2019), "Processing of mutant β-amyloid precursor protein and the clinicopathological features of familial Alzheimer's disease", *Aging and disease*. 10(2), p. 383.
18. H Ferreira-Vieira, Talita, M Guimaraes, Isabella, R Silva, Flavia, and M Ribeiro, Fabiola (2016), "Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system", *Current neuropharmacology*. 14(1), pp. 101-115.
19. DeBay, Drew R and Darvesh, Sultan (2020), "Butyrylcholinesterase as a biomarker in Alzheimer's disease", *Diagnosis and Management in Dementia*, Elsevier, pp. 263-280.
20. Wenk, Gary L (2003), "Neuropathologic changes in Alzheimer's disease", *Journal of Clinical Psychiatry*. 64, pp. 7-10.
21. Khyade, Vitthalrao B, Khyade, Sunanda V, and Jagtap, Sharad G (2016), "Alzheimer's disease: Overview", *International Academic Journal of Social Sciences*. 3(12), pp. 23-38.
22. Priller, Christina, Bauer, Thomas, Mitteregger, Gerda, Krebs, Bjarne, Kretzschmar, Hans A, and Herms, Jochen (2006), "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein", *Journal of Neuroscience*. 26(27), pp. 7212-7221.

23. Iqbal, Khalid, Alonso, Alejandra del C, Chen, She, Chohan, M Omar, El-Akkad, Ezzat, Gong, Cheng-Xin, Khatoon, Sabiha, Li, Bin, Liu, Fei, and Rahman, Abdur (2005), "Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1739(2-3), pp. 198-210.
24. Li, Xueyuan, Bao, Xinjie, and Wang, Renzhi (2016), "Experimental models of Alzheimer's disease for deciphering the pathogenesis and therapeutic screening", *International journal of molecular medicine*. 37(2), pp. 271-283.
25. Udo, Hiroshi, Yoshida, Yuka, Kino, Takako, Ohnuki, Koichiro, Mizunoya, Wataru, Mukuda, Takao, and Sugiyama, Hiroyuki (2008), "Enhanced adult neurogenesis and angiogenesis and altered affective behaviors in mice overexpressing vascular endothelial growth factor 120", *Journal of Neuroscience*. 28(53), pp. 14522-14536.
26. Inada, Chikako, Niu, Yimin, Matsumoto, Kinzo, Le, Xoan Thi, and Fujiwara, Hironori (2014), "Possible involvement of VEGF signaling system in rescuing effect of endogenous acetylcholine on NMDA-induced long-lasting hippocampal cell damage in organotypic hippocampal slice cultures", *Neurochemistry international*. 75, pp. 39-47.
27. Mateo, I, Llorca, J, Infante, J, Rodríguez-Rodríguez, E, Fernández-Viadero, C, Pena, N, Berciano, J, and Combarros, O (2007), "Low serum VEGF levels are associated with Alzheimer's disease", *Acta Neurologica Scandinavica*. 116(1), pp. 56-58.
28. Provias, John and Jeynes, Brian (2014), "Reduction in vascular endothelial growth factor expression in the superior temporal, hippocampal, and brainstem regions in Alzheimer's disease", *Current neurovascular research*. 11(3), pp. 202-209.
29. Garcia, Karina de Oliveira, Ornellas, Felipe Leite, Matsumoto, Priscila, Patti, Camilla de Lima, Mello, Luiz E, Frussa-Filho, Roberto, Han, Sang Won, and Longo, Beatriz Monteiro (2014), "Therapeutic effects of the transplantation of VEGF overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells in the hippocampus of murine model of Alzheimer's disease", *Frontiers in aging neuroscience*. 6, p. 30.
30. Wang, Ping, Xie, Zhao-Hong, Guo, Yu-Ji, Zhao, Cui-Ping, Jiang, Hao, Song, Yan, Zhu, Zheng-Yu, Lai, Chao, Xu, Shun-Liang, and Bi, Jian-Zhong (2011), "VEGF-induced angiogenesis ameliorates the memory impairment in APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease", *Biochemical and biophysical research communications*. 411(3), pp. 620-626.

31. Hohman, Timothy J, Bell, Susan P, Jefferson, Angela L, and Initiative, Alzheimer's Disease Neuroimaging (2015), "The role of vascular endothelial growth factor in neurodegeneration and cognitive decline: exploring interactions with biomarkers of Alzheimer disease", *JAMA neurology*. 72(5), pp. 520-529.
32. Rodríguez, José J and Verkhratsky, Alexei (2011), "Neurogenesis in Alzheimer's disease", *Journal of anatomy*. 219(1), pp. 78-89.
33. Kulason, Sue, Xu, Eileen, Tward, Daniel J, Bakker, Arnold, Albert, Marilyn, Younes, Laurent, and Miller, Michael I (2020), "Entorhinal and transentorhinal atrophy in preclinical Alzheimer's disease", *Frontiers in Neuroscience*. 14, p. 804.
34. Tönnies, Eric and Trushina, Eugenia (2017), "Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease", *Journal of Alzheimer's Disease*. 57(4), pp. 1105-1121.
35. Bevan-Jones, W Richard, Cope, Thomas E, Jones, P Simon, Kaalund, Sanne S, Passamonti, Luca, Allinson, Kieren, Green, Oliver, Hong, Young T, Fryer, Tim D, and Arnold, Robert (2020), "Neuroinflammation and protein aggregation co-localize across the frontotemporal dementia spectrum", *Brain*. 143(3), pp. 1010-1026.
36. Stampfer, MJ (2006), "Cardiovascular disease and Alzheimer's disease: common links", *Journal of internal medicine*. 260(3), pp. 211-223.
37. Cholerton, Brenna, Baker, Laura D, and Craft, Suzanne (2013), "Insulin, cognition, and dementia", *European journal of pharmacology*. 719(1-3), pp. 170-179.
38. Gorelick, Philip B, Scuteri, Angelo, Black, Sandra E, DeCarli, Charles, Greenberg, Steven M, Iadecola, Costantino, Launer, Lenore J, Laurent, Stephane, Lopez, Oscar L, and Nyenhuis, David (2011), "Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association", *Stroke*. 42(9), pp. 2672-2713.
39. Association, Alzheimer's (2013), "2013 Alzheimer's disease facts and figures", *Alzheimer's & dementia*. 9(2), pp. 208-245.
40. Food, US (2021), Drug Administration FDA grants accelerated approval for Alzheimer's drug.
41. May, Patrick C, Dean, Robert A, Lowe, Stephen L, Martenyi, Ferenc, Sheehan, Scott M, Boggs, Leonard N, Monk, Scott A, Mathes, Brian M, Mergott, Dustin J, and Watson, Brian M (2011), "Robust central reduction of amyloid-β in

humans with an orally available, non-peptidic β-secretase inhibitor", *Journal of Neuroscience*. 31(46), pp. 16507-16516.

42. Golde, Todd E, Koo, Edward H, Felsenstein, Kevin M, Osborne, Barbara A, and Miele, Lucio (2013), "γ-Secretase inhibitors and modulators", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1828(12), pp. 2898-2907.
43. MacLeod, Ruth, Hillert, Ellin-Kristina, Cameron, Ryan T, and Baillie, George S (2015), "The role and therapeutic targeting of α-, β-and γ-secretase in Alzheimer's disease", *Future science OA*. 1(3).
44. Hefti, Franz, Goure, William F, Jerecic, Jasna, Iverson, Kent S, Walicke, Patricia A, and Krafft, Grant A (2013), "The case for soluble Aβ oligomers as a drug target in Alzheimer's disease", *Trends in Pharmacological Sciences*. 34(5), pp. 261-266.
45. Yamaguchi, Masamitsu (2018), *Drosophila models for human diseases*, Vol. 1076, Springer.
46. Dey, Abhijit, Bhattacharya, Raktim, Mukherjee, Anuradha, and Pandey, Devendra Kumar (2017), "Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions", *Biotechnology Advances*. 35(2), pp. 178-216.
47. Chauhan, Neelima B (2006), "Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg2576", *Journal of ethnopharmacology*. 108(3), pp. 385-394.
48. Park, Se Jin, Jung, Jun Man, Lee, Hyung Eun, Lee, Young Woo, Kim, Dong Hyun, Kim, Jong Min, Hong, Jin Gyu, Lee, Chang Hwan, Jung, In Ho, and Cho, Yong-Baik (2012), "The memory ameliorating effects of INM-176, an ethanolic extract of *Angelica gigas*, against scopolamine-or Aβ1–42-induced cognitive dysfunction in mice", *Journal of ethnopharmacology*. 143(2), pp. 611-620.
49. Zhang, Zhaoxu, Zhao, Ruiping, Qi, Jiping, Wen, Shirong, Tang, Ying, and Wang, Desheng (2011), "Inhibition of glycogen synthase kinase-3β by *Angelica sinensis* extract decreases β-amyloid-induced neurotoxicity and tau phosphorylation in cultured cortical neurons", *Journal of Neuroscience Research*. 89(3), pp. 437-447.
50. Kim, Hye-Kyung Kim' and Shinate, Dong-Hoon (2000), "Inhibitory effect of *Artemisia asiatica* alkaloids on acetylcholinesterase activity from rat PC12 cells", *Mol Cells*. 10(3), pp. 253-62.
51. Le, Xoan Thi, Pham, Hang Thi Nguyet, Van Nguyen, Tai, Nguyen, Khoi Minh, Tanaka, Ken, Fujiwara, Hironori, and Matsumoto, Kinzo (2015), "Protective effects of *Bacopa monnieri* on ischemia-induced cognitive deficits in mice: the

possible contribution of bacopaside I and underlying mechanism", *Journal of ethnopharmacology*. 164, pp. 37-45.

52. Ruan, Can-Jun, Si, Jian-Yong, Zhang, Li, Chen, Di-Hua, Du, Guan-Hua, and Sun, Lan (2009), "Protective effect of stilbenes containing extract-fraction from *Cajanus cajan* L. on Aβ25–35-induced cognitive deficits in mice", *Neuroscience letters*. 467(2), pp. 159-163.
53. Lee, Jae Woong, Lee, Yong Kyoung, Ban, Jung Ok, Ha, Tae Youl, Yun, Yeo Pyo, Han, Sang Bae, Oh, Ki Wan, and Hong, Jin Tae (2009), "Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits β-amyloid-induced cognitive dysfunction through modification of secretase activity via inhibition of ERK and NF-κ B pathways in mice", *The Journal of nutrition*. 139(10), pp. 1987-1993.
54. Mazza, Marianna, Capuano, Alessandro, Bria, Pietro, and Mazza, Salvatore (2006), "*Ginkgo biloba* and donepezil: a comparison in the treatment of Alzheimer's dementia in a randomized placebo-controlled double-blind study", *European Journal of Neurology*. 13(9), pp. 981-985.
55. Lee, Soon-Tae, Chu, Kon, Sim, Ji-Young, Heo, Jae-Hyeok, and Kim, Manho (2008), "*Panax ginseng* enhances cognitive performance in Alzheimer disease", *Alzheimer disease & associated disorders*. 22(3), pp. 222-226.
56. Ogbo, Felix Akpojene, Mathsyaraja, Sruthi, Koti, Rajeendra Kashyap, Perz, Janette, and Page, Andrew (2018), "The burden of depressive disorders in South Asia, 1990–2016: findings from the global burden of disease study", *BMC psychiatry*. 18(1), pp. 1-11.
57. Association, American Psychiatric (2013), "Diagnostic and statistical manual of mental disorders", *BMC Med*. 17, pp. 133-137.
58. Czeisler, Mark É, Lane, Rashon I, Petrosky, Emiko, Wiley, Joshua F, Christensen, Aleta, Njai, Rashid, Weaver, Matthew D, Robbins, Rebecca, Facer-Childs, Elise R, and Barger, Laura K (2020), "Mental health, substance use, and suicidal ideation during the COVID-19 pandemic—United States, June 24–30, 2020", *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 69(32), p. 1049.
59. Wang, Qingzhong, Timberlake II, Matthew A, Prall, Kevin, and Dwivedi, Yogesh (2017), "The recent progress in animal models of depression", *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 77, pp. 99-109.
60. Elhwuegi, Abdalla Salem (2004), "Central monoamines and their role in major depression", *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 28(3), pp. 435-451.

61. Castrén, Eero and Rantamäki, Tomi (2010), "The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: reactivation of developmental plasticity", *Developmental neurobiology*. 70(5), pp. 289-297.
62. Bremner, J Douglas, Narayan, Meena, Anderson, Eric R, Staib, Lawrence H, Miller, Helen L, and Charney, Dennis S (2000), "Hippocampal volume reduction in major depression", *American Journal of Psychiatry*. 157(1), pp. 115-118.
63. Videbech, Poul (1997), "MRI findings in patients with affective disorder: a meta-analysis", *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 96(3), pp. 157-168.
64. Altshuler, Lori L, Bauer, Michael, Frye, Mark A, Gitlin, Michael J, Mintz, Jim, Szuba, Martin P, Leight, Kristin L, and Whybrow, Peter C (2001), "Does thyroid supplementation accelerate tricyclic antidepressant response? A review and meta-analysis of the literature", *American Journal of Psychiatry*. 158(10), pp. 1617-1622.
65. Fournier, Neil M and Duman, Ronald S (2012), "Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: implications for the pathophysiology and treatment of depression", *Behavioural brain research*. 227(2), pp. 440-449.
66. Belmaker, RH and Agam, Galila (2008), "Major depressive disorder", *New England Journal of Medicine*. 358(1), pp. 55-68.
67. Tran, Pierre V, Bymaster, Frank P, McNamara, Robert K, and Potter, William Z (2003), "Dual monoamine modulation for improved treatment of major depressive disorder", *Journal of clinical psychopharmacology*. 23(1), pp. 78-86.
68. Brunton, Laurence L, Chabner, Bruce, and Knollmann, Björn C (2018), *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, McGraw-Hill Education New York, NY, USA:.
69. Liu, Lei, Liu, Changhong, Wang, Yicun, Wang, Pu, Li, Yuxin, and Li, Bingjin (2015), "Herbal medicine for anxiety, depression and insomnia", *Current neuropharmacology*. 13(4), pp. 481-493.
70. Xu, Changjiang, Teng, Jijun, Chen, Weidong, Ge, Qiang, Yang, Zhiqi, Yu, Chunying, Yang, Zirong, and Jia, William (2010), "20 (S)-protopanaxadiol, an active ginseng metabolite, exhibits strong antidepressant-like effects in animal tests", *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 34(8), pp. 1402-1411.
71. Mao, Qingqiu, Huang, Zhen, Ip, Siupo, and Che, Chuntao (2008), "Antidepressant-like effect of ethanol extract from *Paeonia lactiflora* in mice", *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological*

and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 22(11), pp. 1496-1499.

72. Kim, Ji-Hyun, Kim, Sun Yeou, Lee, Seok-Yong, and Jang, Choon-Gon (2007), "Antidepressant-like effects of *Albizzia julibrissin* in mice: involvement of the 5-HT1A receptor system", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 87(1), pp. 41-47.
73. Mizuki, Daishu, Matsumoto, Kinzo, Tanaka, Ken, Le, Xoan Thi, Fujiwara, Hironori, Ishikawa, Tsutomu, and Higuchi, Yoshihiro (2014), "Antidepressant-like effect of *Butea superba* in mice exposed to chronic mild stress and its possible mechanism of action", *Journal of ethnopharmacology*. 156, pp. 16-25.
74. Yu, Ok-Cheol, Jung, Boyoung, Go, Hoyeon, Park, Minjung, and Ha, In-Hyuk (2020), "Association between dementia and depression: a retrospective study using the Korean National Health Insurance Service-National Sample Cohort database", *BMJ open*. 10(10), p. e034924.
75. Zubenko, George S, Zubenko, Wendy N, McPherson, Susan, Spoor, Eleanor, Marin, Deborah B, Farlow, Martin R, Smith, Glenn E, Geda, Yonas E, Cummings, Jeffrey L, and Petersen, Ronald C (2003), "A collaborative study of the emergence and clinical features of the major depressive syndrome of Alzheimer's disease", *American Journal of Psychiatry*. 160(5), pp. 857-866.
76. Steffens, David C and Potter, GG (2008), "Geriatric depression and cognitive impairment", *Psychological medicine*. 38(2), pp. 163-175.
77. Rapp, Michael A, Schnaider-Beeri, Michal, Wysocki, Michael, Guerrero-Berroa, Elizabeth, Grossman, Hillel T, Heinz, Andreas, and Haroutunian, Vahram (2011), "Cognitive decline in patients with dementia as a function of depression", *The American Journal of Geriatric Psychiatry*. 19(4), pp. 357-363.
78. Diniz, Breno S, Butters, Meryl A, Albert, Steven M, Dew, Mary Amanda, and Reynolds, Charles F (2013), "Late-life depression and risk of vascular dementia and Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of community-based cohort studies", *The British Journal of Psychiatry*. 202(5), pp. 329-335.
79. Alexopoulos, George S (2003), "Vascular disease, depression, and dementia".
80. Sierksma, Annerieke SR, van den Hove, Daniel LA, Steinbusch, Harry WM, and Prickaerts, Jos (2010), "Major depression, cognitive dysfunction and Alzheimer's disease: is there a link?", *European Journal of Pharmacology*. 626(1), pp. 72-82.
81. Green, Kim N, Billings, Lauren M, Roozendaal, Benno, McGaugh, James L, and LaFerla, Frank M (2006), "Glucocorticoids increase amyloid-β and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease", *Journal of Neuroscience*. 26(35), pp. 9047-9056.

82. Caraci, Filippo, Copani, Agata, Nicoletti, Ferdinando, and Drago, Filippo (2010), "Depression and Alzheimer's disease: neurobiological links and common pharmacological targets", *European journal of pharmacology*. 626(1), pp. 64-71.
83. Berger, Thomas, Lee, Hyunah, Young, Allan H, Aarsland, Dag, and Thuret, Sandrine (2020), "Adult hippocampal neurogenesis in major depressive disorder and Alzheimer's disease", *Trends in molecular medicine*. 26(9), pp. 803-818.
84. Toni, Nicolas and Schinder, Alejandro F (2016), "Maturation and functional integration of new granule cells into the adult hippocampus", *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 8(1), p. a018903.
85. Moreno-Jiménez, Elena P, Flor-García, Miguel, Terreros-Roncal, Julia, Rábano, Alberto, Cafini, Fabio, Pallas-Bazarra, Noemí, Ávila, Jesús, and Llorens-Martín, María (2019), "Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease", *Nature medicine*. 25(4), pp. 554-560.
86. Gatt, Ariana, Ekonomou, Antigoni, Somani, Alyma, Thuret, Sandrine, Howlett, David, Corbett, Anne, Johnson, Mary, Perry, Elaine, Attems, Johannes, and Francis, Paul (2017), "Importance of proactive treatment of depression in Lewy body dementias: the impact on hippocampal neurogenesis and cognition in a post-mortem study", *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 44(5-6), pp. 283-293.
87. Pelton, Gregory H, Harper, Oliver L, Tabert, Matthias H, Sackeim, Harold A, Scarmeas, Nikolaos, Roose, Steven P, and Devanand, DP (2008), "Randomized double-blind placebo-controlled donepezil augmentation in antidepressant-treated elderly patients with depression and cognitive impairment: a pilot study", *International Journal of Geriatric Psychiatry: A journal of the psychiatry of late life and allied sciences*. 23(7), pp. 670-676.
88. Puzzo, Daniela, Gulisano, Walter, Palmeri, Agostino, and Arancio, Ottavio (2015), "Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery", *Expert opinion on drug discovery*. 10(7), pp. 703-711.
89. Hannan, Shabab B, Dräger, Nina M, Rasse, Tobias M, Voigt, Aaron, and Jahn, Thomas R (2016), "Cellular and molecular modifier pathways in tauopathies: the big picture from screening invertebrate models", *Journal of neurochemistry*. 137(1), pp. 12-25.
90. Newman, Morgan, Ebrahimie, Esmaeil, and Lardelli, Michael (2014), "Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research", *Frontiers in genetics*. 5, p. 189.

91. Drummond, Eleanor and Wisniewski, Thomas (2017), "Alzheimer's disease: experimental models and reality", *Acta neuropathologica*. 133(2), pp. 155-175.
92. Stepanichev, Mikhail, Lazareva, Natalia, Tukhbatova, Gulnur, Salozhin, Sergey, and Gulyaeva, Natalia (2014), "Transient disturbances in contextual fear memory induced by Aβ (25–35) in rats are accompanied by cholinergic dysfunction", *Behavioural brain research*. 259, pp. 152-157.
93. San Tang, Kim (2019), "The cellular and molecular processes associated with scopolamine-induced memory deficit: A model of Alzheimer's biomarkers", *Life sciences*, p. 116695.
94. Moiseeva, Yu V, Onufriev, MV, Lazareva, NA, Stepanichev, MY, and Gulyaeva, NV (2001), "Free radical mechanisms of septo-hippocampal neurodegeneration caused by cholinotoxin AF64A in rats *in vivo*", *Neirokhimiya*. 18, pp. 287-289.
95. Sain, H, Sharma, B, Jaggi, AS, and Singh, N (2011), "Pharmacological investigations on potential of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in hyperhomocysteinemia-induced vascular dementia in rats", *Neuroscience*. 192, pp. 322-333.
96. Kamat, Pradip K, Rai, Shivika, and Nath, Chandishwar (2013), "Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology", *Neurotoxicology*. 37, pp. 163-172.
97. Song, Cai and Leonard, Brian E (2005), "The olfactory bulbectomised rat as a model of depression", *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 29(4-5), pp. 627-647.
98. Hendriksen, Hendrikus, Korte, S Mechiel, Olivier, Berend, and Oosting, Ronald S (2015), "The olfactory bulbectomy model in mice and rat: one story or two tails?", *European journal of pharmacology*. 753, pp. 105-113.
99. Almeida, Roberto Farina, Nonose, Yasmine, Ganzella, Marcelo, Loureiro, Samanta Oliveira, Rocha, Andréia, Machado, Daniele Guilhermano, Bellaver, Bruna, Fontella, Fernanda Urruth, Leffa, Douglas T, and Pettenuzzo, Letícia Ferreira (2021), "Antidepressant-like effects of chronic guanosine in the olfactory bulbectomy mouse model", *Frontiers in Psychiatry*. 12.
100. Sithisarn, Pongtip, Rojsanga, Piyanuch, Jarikasem, Siripen, Tanaka, Ken, and Matsumoto, Kinzo (2013), "Ameliorative effects of *Acanthopanax trifoliatus* on cognitive and emotional deficits in olfactory bulbectomized mice: an animal model of depression and cognitive deficits", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013.

101. Zou, Yong-ming, Da Lu, Li-ping Liu, Zhang, Hui-hong, and Zhou, Yu-ying (2016), "Olfactory dysfunction in Alzheimer's disease", *Neuropsychiatric disease and treatment*. 12, p. 869.
102. Cha, Hyegyeong, Kim, Sisook, and Son, Yedong (2021), "Associations between cognitive function, depression, and olfactory function in elderly people with dementia in Korea", *Frontiers in Aging Neuroscience*. 13.
103. Tonacci, Alessandro, Bruno, Rosa M, Ghiadoni, Lorenzo, Pratali, Lorenza, Berardi, Nicoletta, Tognoni, Gloria, Cintoli, Simona, Volpi, Leda, Bonuccelli, Ubaldo, and Sicari, Rosa (2017), "Olfactory evaluation in Mild Cognitive Impairment: correlation with neurocognitive performance and endothelial function", *European Journal of Neuroscience*. 45(10), pp. 1279-1288.
104. Coronas-Sámano, G, Portillo, W, Campos, V Beltrán, Medina-Aguirre, GI, Paredes, RG, and Diaz-Cintra, S (2014), "Deficits in odor-guided behaviors in the transgenic 3xTg-AD female mouse model of Alzheimer′ s disease", *Brain research*. 1572, pp. 18-25.
105. Bobkova, NV, Dana, E, Nesterov, VI, Aleksandrova, I Yu, Medvinskaya, NI, Samokhin, AN, Nesterova, IV, and Dana, R (2004), "Morphofunctional changes in neurons in the temporal cortex of the brain in relation to spatial memory in bulbectomized mice after treatment with mineral ascorbates", *Neuroscience and behavioral physiology*. 34(7), pp. 671-676.
106. Yamada, Marina, Hayashida, Miki, Zhao, Qi, Shibahara, Naotoshi, Tanaka, Ken, Miyata, Takeshi, and Matsumoto, Kinzo (2011), "Ameliorative effects of yokukansan on learning and memory deficits in olfactory bulbectomized mice", *Journal of ethnopharmacology*. 135(3), pp. 737-746.
107. Le, Xoan Thi, Pham, Hang Thi Nguyet, Do, Phuong Thi, Fujiwara, Hironori, Tanaka, Ken, Li, Feng, Van Nguyen, Tai, Nguyen, Khoi Minh, and Matsumoto, Kinzo (2013), "*Bacopa monnieri* ameliorates memory deficits in olfactory bulbectomized mice: possible involvement of glutamatergic and cholinergic systems", *Neurochemical research*. 38(10), pp. 2201-2215.
108. Mizuki, Daishu, Qi, Zhao, Tanaka, Ken, Fujiwara, Hironori, Ishikawa, Tsutomu, Higuchi, Yoshihiro, and Matsumoto, Kinzo (2014), "*Butea superba*–induced amelioration of cognitive and emotional deficits in olfactory bulbectomized mice and putative mechanisms underlying its actions", *Journal of pharmacological sciences*. 124(4), pp. 457-467.
109. Aleksandrova, I Yu, Kuvichkin, VV, Kashparov, IA, Medvinskaya, NI, Nesterova, IV, Lunin, SM, Samokhin, AN, and Bobkova, NV (2004), "Increased

level of β-amyloid in the brain of bulbectomized mice", *Biochemistry (Moscow)*. 69(2), pp. 176-180.

110. Wynn, Zakiya J and Cummings, Jeffrey L (2004), "Cholinesterase inhibitor therapies and neuropsychiatric manifestations of Alzheimer's disease", *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 17(1-2), pp. 100-108.
111. Harper, Alex (2010), "Mouse models of neurological disorders—a comparison of heritable and acquired traits", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1802(10), pp. 785-795.
112. Saiz-Sanchez, Daniel, Flores-Cuadrado, Alicia, Ubeda-Banon, Isabel, de la Rosa-Prieto, Carlos, and Martinez-Marcos, Alino (2016), "Interneurons in the human olfactory system in Alzheimer's disease", *Experimental neurology*. 276, pp. 13-21.
113. Djordjevic, Jelena, Jones-Gotman, Marilyn, De Sousa, Kathy, and Chertkow, Howard (2008), "Olfaction in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease", *Neurobiology of aging*. 29(5), pp. 693-706.
114. Hollis, Fiona and Kabbaj, Mohamed (2014), "Social defeat as an animal model for depression", *ILAR journal*. 55(2), pp. 221-232.
115. Mumtaz, Faiza, Khan, Muhammad Imran, Zubair, Muhammad, and Dehpour, Ahmad Reza (2018), "Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—A comprehensive review", *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 105, pp. 1205-1222.
116. Matsumoto, Kinzo, Pinna, Graziano, Puia, Giuli, Guidotti, Alessandro, and Costa, Erminio (2005), "Social isolation stress-induced aggression in mice: a model to study the pharmacology of neurosteroidogenesis", *Stress*. 8(2), pp. 85-93.
117. Nishi, Mayumi, Horii-Hayashi, Noriko, Sasagawa, Takayo, and Matsunaga, Wataru (2013), "Effects of early life stress on brain activity: implications from maternal separation model in rodents", *General and comparative endocrinology*. 181, pp. 306-309.
118. Walther, Diego J, Peter, Jens-Uwe, Bashammakh, Saleh, Hörtnagl, Heide, Voits, Mechthild, Fink, Heidrun, and Bader, Michael (2003), "Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform", *Science*. 299(5603), pp. 76-76.
119. Gutknecht, Lise, Popp, Sandy, Waider, Jonas, Sommerlandt, Frank MJ, Göppner, Corinna, Post, Antonia, Reif, Andreas, van den Hove, Daniel, Strekalova, Tatyana, and Schmitt, Angelika (2015), "Interaction of brain 5-HT synthesis deficiency, chronic stress and sex differentially impact emotional behavior in Tph2 knockout mice", *Psychopharmacology*. 232(14), pp. 2429-2441.

120. Fukui, Masato, Rodriguiz, Ramona M, Zhou, Jiechun, Jiang, Sara X, Phillips, Lindsey E, Caron, Marc G, and Wetsel, William C (2007), "Vmat2 heterozygous mutant mice display a depressive-like phenotype", *Journal of Neuroscience*. 27(39), pp. 10520-10529.
121. Hellweg, Rainer, Zueger, Maha, Fink, Katharina, Hörtnagl, Heide, and Gass, Peter (2007), "Olfactory bulbectomy in mice leads to increased BDNF levels and decreased serotonin turnover in depression-related brain areas", *Neurobiology of disease*. 25(1), pp. 1-7.
122. Brigitta, Bondy (2002), "Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment", *Dialogues in clinical neuroscience*. 4(1), p. 7.
123. Katz, Richard J (1982), "Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 16(6), pp. 965-968.
124. Willner, Paul, Towell, Anthony, Sampson, D, Sophokleous, S, and Muscat, R al (1987), "Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant", *Psychopharmacology*. 93(3), pp. 358-364.
125. Solomon, Matia B, Furay, Amy R, Jones, Kenneth, Packard, Amy EB, Packard, Benjamin A, Wulsin, Aynara C, and Herman, James P (2012), "Deletion of forebrain glucocorticoid receptors impairs neuroendocrine stress responses and induces depression-like behavior in males but not females", *Neuroscience*. 203, pp. 135-143.
126. Võ Văn Chi (2004), "Từ điển thực vật thông dụng". 2, pp. 1808-1810.
127. Viện Dược liệu (2006), "Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam". 1, pp. 1027 - 1029.
128. Pattanayak, Priyabrata, Behera, Pritishova, Das, Debajyoti, and Panda, Sangram K (2010), "*Ocimum sanctum* Linn. A reservoir plant for therapeutic applications: An overview", *Pharmacognosy reviews*. 4(7), p. 95.
129. Bộ Y tế (2017), "Dược điển Việt Nam V".
130. Gupta, SK, Prakash, Jai, and Srivastava, Sushma (2002), "Validation of traditional claim of Tulsi, *Ocimum sanctum* Linn. as a medicinal plant", *Indian J Exp Biol*. 40(7), p. 9.
131. Vrinda, B and Devi, P Uma (2001), "Radiation protection of human lymphocyte chromosomes in vitro by orientin and vicenin", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 498(1-2), pp. 39-46.
132. Endo, Akinori, Matsumoto, Masaki, Inada, Toshifumi, Yamamoto, Akitsugu, Nakayama, Keiichi I, Kitamura, Naomi, and Komada, Masayuki (2009),

"Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitylating enzyme USP36", *J Cell Sci*. 122(5), pp. 678-686.

133. Silva, M Goretti, Vieira, Icaro, Mendes, Francisca, Albuquerque, Irineu, Dos Santos, Rogério, Silva, Fábio, and Morais, Selene (2008), "Variation of ursolic acid content in eight *Ocimum* species from northeastern Brazil", *Molecules*. 13(10), pp. 2482-2487.
134. Lê Đình Sáng (2010), "Bách khoa Y học".
135. Vats, V, Yadav, SP, and Grover, JK (2004), "Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin-induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats", *Journal of ethnopharmacology*. 90(1), pp. 155-160.
136. Giridharan, Vijayasree Vayalanellore, Thandavarayan, Rajarajan Amirthalingam, Mani, Vasudevan, Ashok Dundapa, Taranalli, Watanabe, Kenichi, and Konishi, Tetsuya (2011), "*Ocimum sanctum* Linn. leaf extracts inhibit acetylcholinesterase and improve cognition in rats with experimentally induced dementia", *Journal of medicinal food*. 14(9), pp. 912-919.
137. Bathala, Lakshmana Rao, Rao, Ch Vekateswara, Manjunath, SM, Vinuta, S, and Vemulapalli, Raghu (2012), "Efficacy of *Ocimum sanctum* for relieving stress: a preclinical study", *J Contemp Dent Pract*. 13(6), pp. 782-786.
138. Chatterjee, Manavi, Verma, Pinki, Maurya, Rakesh, and Palit, Gautam (2011), "Evaluation of ethanol leaf extract of *Ocimum sanctum* in experimental models of anxiety and depression", *Pharmaceutical biology*. 49(5), pp. 477-483.
139. Sembulingam, K, Sembulingam, Prema, and Namasivayam, A (2005), "Effect of *Ocimum sanctum* Linn on the changes in central cholinergic system induced by acute noise stress", *Journal of ethnopharmacology*. 96(3), pp. 477-482.
140. Gupta, Prasoon, Yadav, Dinesh Kumar, Siripurapu, Kiran Babu, Palit, Guatam, and Maurya, Rakesh (2007), "Constituents of *Ocimum sanctum* with antistress activity", *Journal of natural products*. 70(9), pp. 1410-1416.
141. Ahmad, Ausaf, Rasheed, Naila, Chand, Kailash, Maurya, Rakesh, Banu, Naheed, and Palit, Gautam (2012), "Restraint stress-induced central monoaminergic & oxidative changes in rats & their prevention by novel *Ocimum sanctum* compounds", *The Indian journal of medical research*. 135(4), p. 548.
142. Machado, DG, Neis, VB, Balen, GO, Colla, A, Cunha, MP, Dalmarco, JB, Pizzolatti, MG, Prediger, RD, and Rodrigues, ALS (2012), "Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: evidence for the involvement of the dopaminergic system", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 103(2), pp. 204-211.

143. González-Cortazar, Manáses, Maldonado-Abarca, Ana, Jiménez-Ferrer, Enrique, Marquina, Silvia, Ventura-Zapata, Elsa, Zamilpa, Alejandro, Tortoriello, Jaime, and Herrera-Ruiz, Maribel (2013), "Isosakuranetin-5-*O*-rutinoside: a new flavanone with antidepressant activity isolated from *Salvia elegans* Vahl", *Molecules*. 18(11), pp. 13260-13270.
144. Shivananjappa, Mahesh and Joshi, Manoj (2012), "Aqueous extract of tulsi (*Ocimum sanctum*) enhances endogenous antioxidant defenses of human hepatoma cell line (HepG2)", *Journal of herbs, spices & medicinal plants*. 18(4), pp. 331-348.
145. Gupta, Shweta, Mediratta, Pramod K, Singh, Surender, Sharma, KK, and Shukla, Rimi (2006), "Antidiabetic, antihypercholesterolaemic and antioxidant effect of *Ocimum sanctum* (Linn) seed oil".
146. Shah, KOMAL and Verma, Ramtej J (2012), "Protection against butyl p-hydroxybenzoic acid induced oxidative stress by *Ocimum sanctum* extract in mice liver", *Acta Pol Pharm*. 69(5), pp. 865-70.
147. Rastogi, Shipra, Shukla, Yogeshwer, Paul, Bhola N, Chowdhuri, D Kar, Khanna, Subhash K, and Das, Mukul (2007), "Protective effect *of Ocimum sanctum* on 3-methylcholanthrene, 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene and aflatoxin B1 induced skin tumorigenesis in mice", *Toxicology and applied pharmacology*. 224(3), pp. 228-240.
148. Cohen, Marc Maurice (2014), "Tulsi-*Ocimum sanctum*: A herb for all reasons", *J Ayurveda Integr Med*. 5(4), p. 251.
149. Narendhirakannan, RT, Subramanian, S, and Kandaswamy, M (2006), "Biochemical evaluation of antidiabetogenic properties of some commonly used Indian plants on streptozotocin-induced diabetes in experimental rats", *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 33(12), pp. 1150-1157.
150. Hannan, JMA, Marenah, L, Ali, L, Rokeya, B, Flatt, PR, and Abdel-Wahab, YHA (2006), "*Ocimum sanctum* leaf extracts stimulate insulin secretion from perfused pancreas, isolated islets and clonal pancreatic β-cells", *Journal of Endocrinology*. 189(1), pp. 127-136.
151. Gholap, S and Kar, A (2004), "Hypoglycaemic effects of some plant extracts are possibly mediated through inhibition in corticosteroid concentration", *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 59(11), pp. 876-878.
152. Sharma, Meenu, Kishore, Kamal, Gupta, Suresh K, Joshi, Sujata, and Arya, Dharamvir S (2001), "Cardioprotective potential of *Ocimum sanctum* in

isoproterenol induced myocardial infarction in rats", *Molecular and cellular biochemistry*. 225(1-2), pp. 75-83.

153. Sood, S, Narang, D, Dinda, AK, and Maulik, SK (2005), "Chronic oral administration of *Ocimum sanctum* Linn. augments cardiac endogenous antioxidants and prevents isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats", *Journal of pharmacy and pharmacology*. 57(1), pp. 127-133.
154. Sood, S, Narang, D, Thomas, MK, Gupta, YK, and Maulik, SK (2006), "Effect of *Ocimum sanctum* Linn. on cardiac changes in rats subjected to chronic restraint stress", *Journal of ethnopharmacology*. 108(3), pp. 423-427.
155. Dhandayuthapani, Sivanesan, Azad, Hasan, and Rathinavelu, Appu (2015), "Apoptosis induction by *Ocimum sanctum* extract in LNCaP prostate cancer cells", *Journal of medicinal food*. 18(7), pp. 776-785.
156. Satapathy, Swayamjeet, Das, Namrata, Bandyopadhyay, Debapriya, Mahapatra, Sushil Chandra, Sahu, Dip Sundar, and Meda, Mruthyumjayarao (2017), "Effect of Tulsi (*Ocimum sanctum* Linn.) supplementation on metabolic parameters and liver enzymes in young overweight and obese subjects", *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 32(3), pp. 357-363.
157. Bromley-Brits, Kelley, Deng, Yu, and Song, Weihong (2011), "Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice", *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(53), p. e2920.
158. Morris, Richard GM (1981), "Spatial localization does not require the presence of local cues", *Learning and motivation*. 12(2), pp. 239-260.
159. Steru, Lucien, Chermat, Raymond, Thierry, Bernard, and Simon, Pierre (1985), "The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice", *Psychopharmacology*. 85(3), pp. 367-370.
160. Aksoz, Elif, Aksoz, Tolga, Bilge, S Sirri, Ilkaya, Fatih, Celik, Suleyman, and Diren, H Baris (2008), "Antidepressant-like effects of echo-planar magnetic resonance imaging in mice determined using the forced swimming test", *Brain research*. 1236, pp. 194-199.
161. Porsolt, RD, Bertin, A, and Jalfre, MJAIP (1977), "Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants", *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*. 229(2), pp. 327-336.
162. Daodee, Supawadee, Monthakantirat, Orawan, Ruengwinitwong, Kanlaya, Gatenakorn, Kankrittanon, Maneenet, Juthamart, Khamphukdee, Charinya, Sekeroglu, Nazim, Chulikhit, Yaowared, and Kijjoa, Anake (2019), "Effects of the ethanol extract of *Dipterocarpus alatus* leaf on the unpredictable chronic mild

stress-induced depression in ICR mice and its possible mechanism of action", *Molecules*. 24(18), p. 3396.

163. Inada, Chikako, Le, Xoan Thi, Tsuneyama, Koichi, Fujiwara, Hironori, Miyata, Takeshi, and Matsumoto, Kinzo (2013), "Endogenous acetylcholine rescues NMDA-induced long-lasting hippocampal cell damage via stimulation of muscarinic M1 receptors: Elucidation using organic hippocampal slice cultures", *European journal of pharmacology*. 699(1-3), pp. 150-159.
164. Ellman, George L, Courtney, K Diane, Andres Jr, Valentino, and Featherstone, Robert M (1961), "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochemical pharmacology*. 7(2), pp. 88-95.
165. Colla, André RS, Oliveira, Ágatha, Pazini, Francis L, Rosa, Julia M, Manosso, Luana M, Cunha, Mauricio P, and Rodrigues, Ana Lúcia S (2014), "Serotonergic and noradrenergic systems are implicated in the antidepressant-like effect of ursolic acid in mice", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 124, pp. 108-116.
166. Kimura, Kyoko, Matsumoto, Kinzo, Ohtake, Hironori, Oka, Jun-Ichiro, and Fujiwara, Hironori (2018), "Endogenous acetylcholine regulates neuronal and astrocytic vascular endothelial growth factor expression levels via different acetylcholine receptor mechanisms", *Neurochemistry international*. 118, pp. 42-51.
167. Murray, Ana P, Faraoni, María Belén, Castro, María Julia, Alza, Natalia Paola, and Cavallaro, Valeria (2013), "Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy", *Current neuropharmacology*. 11(4), pp. 388-413.
168. Frisbee, Jefferson C, Brooks, Steven D, Stanley, Shyla C, and d'Audiffret, Alexandre C (2015), "An unpredictable chronic mild stress protocol for instigating depressive symptoms, behavioral changes and negative health outcomes in rodents", *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(106), p. e53109.
169. Venuprasad, MP, Kandikattu, Hemanth Kumar, Razack, Sakina, Amruta, Narayanappa, and Khanum, Farhath (2017), "Chemical composition of *Ocimum sanctum* by LC-ESI–MS/MS analysis and its protective effects against smoke induced lung and neuronal tissue damage in rats", *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 91, pp. 1-12.
170. Wang, Fengwu, Wang, Feng, and Chen, Tiejun (2021), "Secondary metabolites of *Galactomyces geotrichum* from *Laminaria japonica* ameliorate cognitive

deficits and brain oxidative stress in D-galactose induced Alzheimer’s disease mouse model", *Natural Product Research*. 35(23), pp. 5323-5328.

171. Geldmacher, David S (2003), "Long-term cholinesterase inhibitor therapy for Alzheimer's disease: practical considerations for the primary care physician", *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*. 5(6), p. 251.
172. Willner, Paul (2017), "The chronic mild stress (CMS) model of depression: history, evaluation and usage", *Neurobiology of stress*. 6, pp. 78-93.
173. Ripoll, Nadège, David, Denis Joseph Paul, Dailly, Eric, Hascoët, Martine, and Bourin, Michel (2003), "Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test", *Behavioural brain research*. 143(2), pp. 193-200.
174. Cryan, John F, Mombereau, Cedric, and Vassout, Annick (2005), "The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice", *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 29(4-5), pp. 571-625.
175. Bahar-Fuchs, Alex, Chételat, Gael, Villemagne, Victor L, Moss, Simon, Pike, Kerryn, Masters, Colin L, Rowe, Christopher, and Savage, Greg (2010), "Olfactory deficits and amyloid-β burden in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and healthy aging: a PiB PET study", *Journal of Alzheimer's Disease*. 22(4), pp. 1081-1087.
176. Morales-Medina, JC, Iannitti, T, Freeman, A, and Caldwell, HK (2017), "The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: The hippocampal pathway", *Behavioural Brain Research*. 317, pp. 562-575.
177. Breuer, ME, Van Gaalen, MM, Wernet, W, Claessens, SEF, Oosting, RS, Behl, B, Korte, SM, Schoemaker, H, Gross, G, and Olivier, B (2009), "SSR149415, a non-peptide vasopressin V 1b receptor antagonist, has long-lasting antidepressant effects in the olfactory bulbectomy-induced hyperactivity depression model", *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 379(1), pp. 101-106.
178. Hsuchou, Hung, Ho, Ying-Jui, Shui, Hao-Ai, Tai, Mei-Yun, Chen, Kuang-Ho, and Tsai, Yuan-Feen (2002), "Effects of incisor-cutting on muricidal behavior induced by olfactory bulbectomy in rats", *Physiology & behavior*. 76(4-5), pp. 669-675.
179. Phạm Đức Vịnh (2017), "Nghiên cứu tác dụng chống trầm cảm thực nghiệm của L-tetrahydropalmatin trên mô hình stress nhẹ, kéo dài, không báo trước", *Luận văn Thạc sĩ*.

180. Saunders, Nichole LJ and Summers, Mathew J (2010), "Attention and working memory deficits in mild cognitive impairment", *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*. 32(4), pp. 350-357.
181. Hozumi, Soichi, Nakagawasai, Osamu, Tan-No, Koichi, Niijima, Fukie, Yamadera, Fumihiro, Murata, Atsunobu, Arai, Yuichiro, Yasuhara, Hajime, and Tadano, Takeshi (2003), "Characteristics of changes in cholinergic function and impairment of learning and memory-related behavior induced by olfactory bulbectomy", *Behavioural brain research*. 138(1), pp. 9-15.
182. Kwon, Kyoung Ja, Kim, Min Kyeong, Lee, Eun Joo, Kim, Jung Nam, Choi, Bo-Ryoung, Kim, Soo Young, Cho, Kyu Suk, Han, Jung-Soo, Kim, Hahn Young, and Shin, Chan Young (2014), "Effects of donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, on neurogenesis in a rat model of vascular dementia", *Journal of the neurological sciences*. 347(1-2), pp. 66-77.
183. Nakagawasai, Osamu, Nemoto, Wataru, Onogi, Hiroshi, Moriya, Takahiro, Lin, Jia-Rong, Odaira, Takayo, Yaoita, Fukie, Ogawa, Takumi, Ohta, Kiminori, and Endo, Yasuyuki (2016), "BE360, a new selective estrogen receptor modulator, produces antidepressant and antidementia effects through the enhancement of hippocampal cell proliferation in olfactory bulbectomized mice", *Behavioural Brain Research SreeTestContent1*. 297, pp. 315-322.
184. Boldrini, Maura, Fulmore, Camille A, Tartt, Alexandria N, Simeon, Laika R, Pavlova, Ina, Poposka, Verica, Rosoklija, Gorazd B, Stankov, Aleksandar, Arango, Victoria, and Dwork, Andrew J (2018), "Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging", *Cell stem cell*. 22(4), pp. 589-599. e5.
185. Mu, Yangling and Gage, Fred H (2011), "Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease", *Molecular neurodegeneration*. 6(1), pp. 1-9.
186. Pham, Hang Thi Nguyet, Tran, Hong Nguyen, Nguyen, Phuong Thi, Le, Xoan Thi, Nguyen, Khoi Minh, Phan, Sinh Viet, Yoneyama, Masanori, Ogita, Kiyokazu, Yamaguchi, Taro, and Folk, William R (2020), "*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Extract improves memory performance via promotion of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adolescent mice", *International journal of molecular sciences*. 21(9), p. 3365.
187. Demars, Michael, Hu, Yuan-Shih, Gadadhar, Archana, and Lazarov, Orly (2010), "Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice", *Journal of neuroscience research*. 88(10), pp. 2103-2117.
188. Pham, Hang Thi Nguyet, Phan, Sinh Viet, Tran, Hong Nguyen, Phi, Xuyen Thi, Le, Xoan Thi, Nguyen, Khoi Minh, Fujiwara, Hironori, Yoneyama, Masanori,

Ogita, Kiyokazu, and Yamaguchi, Taro (2019), "*Bacopa monnieri* (L.) ameliorates cognitive deficits caused in a trimethyltin-induced neurotoxicity model mice", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 42(8), pp. 1384-1393.

189. Cooper-Kuhn, Christiana M, Winkler, Jürgen, and Kuhn, H Georg (2004), "Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat", *Journal of neuroscience research*. 77(2), pp. 155-165.
190. TAJack, CR, Shiung, MM, Gunter, JL, O'brien, PC, Weigand, SD, Knopman, DS, Boeve, BF, Ivnik, RJ, Smith, GE, and Cha, RH (2004), "Comparison of different MRI brain atrophy rate measures with clinical disease progression in AD", *Neurology*. 62(4), pp. 591-600.
191. Silbert, Lisa C, Quinn, JF, Moore, MM, Corbridge, E, Ball, MJ, Murdoch, G, Sexton, G, and Kaye, JA (2003), "Changes in premorbid brain volume predict Alzheimer's disease pathology", *Neurology*. 61(4), pp. 487-492.
192. Nestor, Sean M, Rupsingh, Raul, Borrie, Michael, Smith, Matthew, Accomazzi, Vittorio, Wells, Jennie L, Fogarty, Jennifer, Bartha, Robert, and Initiative, Alzheimer's Disease Neuroimaging (2008), "Ventricular enlargement as a possible measure of Alzheimer's disease progression validated using the Alzheimer's disease neuroimaging initiative database", *Brain*. 131(9), pp. 2443-2454.
193. Gong, Yushi, Liu, Liegang, Xie, Bijun, Liao, Yongcheng, Yang, Erling, and Sun, Zhida (2008), "Ameliorative effects of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive deficits and oxidative damage in senescence-accelerated mice", *Behavioural Brain Research*. 194(1), pp. 100-107.
194. Cao, Lei, Jiao, Xiangyang, Zuzga, David S, Liu, Yuhong, Fong, Dahna M, Young, Deborah, and During, Matthew J (2004), "VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory", *Nature genetics*. 36(8), pp. 827-835.
195. Wang, Yaoming, Kilic, Ertugrul, Kilic, Ülkan, Weber, Bruno, Bassetti, Claudio L, Marti, Hugo H, and Hermann, Dirk M (2005), "VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena", *Brain*. 128(1), pp. 52-63.
196. Acosta, Lourdes, Morcuende, Sara, Silva-Hucha, Silvia, Pastor, Angel M, and De La Cruz, Rosa R (2018), "Vascular endothelial growth factor (VEGF) prevents the downregulation of the cholinergic phenotype in axotomized motoneurons of the adult rat", *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 11, p. 241.

197. Liang, W., Zhao, X., Feng, J., Song, F., and Pan, Y. (2016), "Ursolic acid attenuates beta-amyloid-induced memory impairment in mice", *Arq Neuropsiquiatr*. 74(6), pp. 482-8.
198. Tang, Feng Ru, Loke, Weng Keong, Wong, Peiyan, and Khoo, Boo Cheong (2017), "Radioprotective effect of ursolic acid in radiation-induced impairment of neurogenesis, learning and memory in adolescent BALB/c mouse", *Physiology & behavior*. 175, pp. 37-46.
199. Wang, Kai, Sun, Weiming, Zhang, Linlin, Guo, Wei, Xu, Jiachun, Liu, Shuang, Zhou, Zhen, and Zhang, Yulian (2018), "Oleanolic acid ameliorates Aβ25-35 injection-induced memory deficit in Alzheimer's disease model rats by maintaining synaptic plasticity", *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 17(5), pp. 389-399.
200. Zhao, Le, Wang, Jun-Li, Liu, Rui, Li, Xiao-Xu, Li, Jian-Fei, and Zhang, Lu (2013), "Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer's disease mouse model", *Molecules*. 18(8), pp. 9949-9965.
201. Yoo, Dae Young, Choi, Jung Hoon, Kim, Woosuk, Nam, Sung Min, Jung, Hyo Young, Kim, Jong Hwi, Won, Moo-Ho, Yoon, Yeo Sung, and Hwang, In Koo (2013), "Effects of luteolin on spatial memory, cell proliferation, and neuroblast differentiation in the hippocampal dentate gyrus in a scopolamine-induced amnesia model", *Neurological research*. 35(8), pp. 813-820.
202. Matsumoto, Takashi, Kaneko, Atsushi, Koseki, Junichi, Matsubara, Yosuke, Aiba, Setsuya, and Yamasaki, Kenshi (2018), "Pharmacokinetic study of bioactive flavonoids in the traditional Japanese medicine Keigairengyoto exerting antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*", *International journal of molecular sciences*. 19(2), p. 328.
203. Ferlemi, Anastasia-Varvara, Katsikoudi, Antigoni, Kontogianni, Vassiliki G, Kellici, Tahsin F, Iatrou, Grigoris, Lamari, Fotini N, Tzakos, Andreas G, and Margarity, Marigoula (2015), "Rosemary tea consumption results to anxiolytic- and anti-depressant-like behavior of adult male mice and inhibits all cerebral area and liver cholinesterase activity; phytochemical investigation and *in silico* studies", *Chemico-biological interactions*. 237, pp. 47-57.
204. Vorhees, Charles V and Williams, Michael T (2014), "Assessing spatial learning and memory in rodents", *ILAR journal*. 55(2), pp. 310-332.
205. Clark, Robert E, Broadbent, Nicola J, and Squire, Larry R (2007), "The hippocampus and spatial memory: findings with a novel modification of the water maze", *Journal of Neuroscience*. 27(25), pp. 6647-6654.

206. Burns, A and Iliffe, S (2009), Alzheimer's disease. BMJ 338, b158.
207. JC Furtado, Niege A, Pirson, Laetitia, Edelberg, Hélène, M Miranda, Lisa, Loira-Pastoriza, Cristina, Preat, Véronique, Larondelle, Yvan, and André, Christelle M (2017), "Pentacyclic triterpene bioavailability: an overview of *in vitro* and *in vivo* studies", *Molecules*. 22(3), p. 400.
208. Gao, YS, Yuan, Y, Song, G, and Lin, SQ (2016), "Inhibitory effect of ursolic acid and oleanolic acid from *Eriobotrya fragrans* on A549 cell viability *in vivo*", *Genet. Mol. Res*. 15, pp. 1-8.
209. Jeong, Dong Won, Kim, Young Hoon, Kim, Hui Hyun, Ji, Hye Young, Yoo, Sun Dong, Choi, Won Rack, Lee, Soo Min, Han, Chang-Kyun, and Lee, Hye Suk (2007), "Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats", *Biopharmaceutics & drug disposition*. 28(2), pp. 51-57.
210. Ge, Zhi-Qiang, Du, Xin-Ying, Huang, Xiao-Nan, and Qiao, Bin (2015), "Enhanced oral bioavailability of ursolic acid nanoparticles via antisolvent precipitation with TPGS1000 as a stabilizer", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 29, pp. 210-217.
211. Shanmugam, Muthu K, Ong, Tina H, Kumar, Alan Prem, Lun, Chang K, Ho, Paul C, Wong, Peter TH, Hui, Kam M, and Sethi, Gautam (2012), "Ursolic acid inhibits the initiation, progression of prostate cancer and prolongs the survival of TRAMP mice by modulating pro-inflammatory pathways", *PloS one*. 7(3), p. e32476.
212. Chen, Qinhua, Luo, Shangwen, Zhang, Yulin, and Chen, Zilin (2011), "Development of a liquid chromatography–mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: application to the pharmacokinetic and tissue distribution study", *Analytical and bioanalytical chemistry*. 399(8), pp. 2877-2884.
213. Chung, Yo-Kyung, Heo, Ho-Jin, Kim, Eun-Ki, Kim, Hye-Kyung, Huh, Tae-Lin, Lim, Yoongho, Kim, Sung-Koo, and Shin, Dong-Hoon (2001), "Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase", *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*. 11(2).
214. Hut, RA and Van der Zee, EA (2011), "The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory", *Behavioural brain research*. 221(2), pp. 466-480.
215. Kashyap, Dharambir, Tuli, Hardeep Singh, and Sharma, Anil K (2016), "Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential", *Life sciences*. 146, pp. 201-213.

216. Finkel, Sanford I (2004), "Effects of rivastigmine on behavioral and psychological symptoms of dementia in Alzheimer's disease", *Clinical therapeutics*. 26(7), pp. 980-990.
217. Zhang, Nan and Gordon, Marc L (2018), "Clinical efficacy and safety of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease in Chinese patients", *Clinical interventions in aging*. 13, p. 1963.
218. Son, Minky, Park, Chanin, Rampogu, Shailima, Zeb, Amir, and Lee, Keun Woo (2019), "Discovery of novel acetylcholinesterase inhibitors as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease", *International journal of molecular sciences*. 20(4), p. 1000.
219. Claassen, Jurgen AHR and Jansen, René WMM (2006), "Cholinergically mediated augmentation of cerebral perfusion in alzheimer's disease and related cognitive disorders: the cholinergic–vascular hypothesis", *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 61(3), pp. 267-271.
220. Onor, Maria Luisa, Trevisiol, Marianna, and Aguglia, Eugenio (2007), "Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update", *Clinical interventions in aging*. 2(1), p. 17.
221. Klafki, Hans-Wolfgang, Staufenbiel, Matthias, Kornhuber, Johannes, and Wiltfang, Jens (2006), "Therapeutic approaches to Alzheimer's disease", *Brain*. 129(11), pp. 2840-2855.
222. Kumar, Rajnish, Kumar, Amit, Långström, Bengt, and Darreh-Shori, Taher (2017), "Discovery of novel choline acetyltransferase inhibitors using structure-based virtual screening", *Scientific reports*. 7(1), pp. 1-17.
223. Kim, Ae-Ri, Rylett, R Jane, and Shilton, Brian H (2006), "Substrate binding and catalytic mechanism of human choline acetyltransferase", *Biochemistry*. 45(49), pp. 14621-14631.
224. Mahoney, Emily R, Dumitrescu, Logan, Moore, Annah M, Cambronero, Francis E, De Jager, Philip L, Koran, Mary Ellen I, Petyuk, Vladislav A, Robinson, Renã AS, Goyal, Sandeep, and Schneider, Julie A (2019), "Brain expression of the vascular endothelial growth factor gene family in cognitive aging and alzheimer's disease", *Molecular psychiatry*, pp. 1-9.
225. Ruiz de Almodovar, Carmen, Lambrechts, Diether, Mazzone, Massimiliano, and Carmeliet, Peter (2009), "Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system", *Physiological reviews*. 89(2), pp. 607-648.
226. Spuch, Carlos, Antequera, Desiree, Portero, Aitziber, Orive, Gorka, Hernández, Rosa Ma, Molina, Jose A, Bermejo-Pareja, Felix, Pedraz, José L, and Carro, Eva

(2010), "The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease", *Biomaterials*. 31(21), pp. 5608-5618.

227. Caballero, Beatrice, Sherman, Scott J, and Falk, Torsten (2017), "Insights into the mechanisms involved in protective effects of VEGF-B in dopaminergic neurons", *Parkinson's Disease*. 2017.
228. Sugimoto, Hachiro, Yamanish, Y, Iimura, Youichi, and Kawakami, Yoshiyuki (2000), "Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitors", *Current medicinal chemistry*. 7(3), pp. 303-339.
229. Ogura, H, Kosasa, T, Kuriya, Y, and Yamanishi, Y (2000), "Comparison of inhibitory activities of donepezil and other cholinesterase inhibitors on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase *in vitro*", *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 22(8), pp. 609-614.
230. Brunton, Laurence L, Knollmann, Björn C, and Hilal-Dandan, Randa (2018), *Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics, 13e*, McGraw-Hill Education LLC.
231. Linge, Raquel, Pazos, Angel, and Diaz, Alvaro (2013), "Social isolation differentially affects anxiety and depressive-like responses of bulbectomized mice", *Behavioural brain research*. 245, pp. 1-6.
232. Mucignat-Caretta, Carla, Bondí, Michela, and Caretta, Antonio (2006), "Time course of alterations after olfactory bulbectomy in mice", *Physiology & behavior*. 89(5), pp. 637-643.
233. Han, Feng, Nakano, Tetsuo, Yamamoto, Yui, Shioda, Norifumi, Lu, Ying-Mei, and Fukunaga, Kohji (2009), "Improvement of depressive behaviors by nefiracetam is associated with activation of CaM kinases in olfactory bulbectomized mice", *Brain research*. 1265, pp. 205-214.
234. Takahashi, Kohei, Nakagawasai, Osamu, Nemoto, Wataru, Kadota, Shogo, Isono, Jinichi, Odaira, Takayo, Sakuma, Wakana, Arai, Yuichiro, Tadano, Takeshi, and Tan-No, Koichi (2018), "Memantine ameliorates depressive-like behaviors by regulating hippocampal cell proliferation and neuroprotection in olfactory bulbectomized mice", *Neuropharmacology*. 137, pp. 141-155.
235. Smaga, Irena, Pomierny, Bartosz, Krzyżanowska, Weronika, Pomierny-Chamioło, Lucyna, Miszkiel, Joanna, Niedzielska, Ewa, Ogórka, Agata, and Filip, Małgorzata (2012), "N-acetylcysteine possesses antidepressant-like activity through reduction of oxidative stress: behavioral and biochemical analyses in rats", *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 39(2), pp. 280-287.

236. Roche, Michelle, Kerr, DM, Hunt, SP, and Kelly, JP (2012), "Neurokinin-1 receptor deletion modulates behavioural and neurochemical alterations in an animal model of depression", *Behavioural brain research*. 228(1), pp. 91-98.
237. Cryan, John F, Page, Michelle E, and Lucki, Irwin (2005), "Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment", *Psychopharmacology*. 182(3), pp. 335-344.
238. Becker, Maria, Pinhasov, Albert, and Ornoy, Asher (2021), "Animal models of depression: what can they teach us about the human disease?", *Diagnostics*. 11(1), p. 123.
239. Sequeira-Cordero, Andrey, Salas-Bastos, Adrián, Fornaguera, J, and Brenes, JC (2019), "Behavioural characterisation of chronic unpredictable stress based on ethologically relevant paradigms in rats", *Scientific reports*. 9(1), pp. 1-21.
240. Der-Avakian, Andre and Markou, Athina (2012), "The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits", *Trends in neurosciences*. 35(1), pp. 68-77.
241. Di Chiara, Gaetano and Tanda, Gianluigi (1997), "Blunting of reactivity of dopamine transmission to palatable food: a biochemical marker of anhedonia in the CMS model?".
242. Pruessner, Jens C, Champagne, Frances, Meaney, Michael J, and Dagher, Alain (2004), "Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life maternal care: a positron emission tomography study using [11C] raclopride", *Journal of Neuroscience*. 24(11), pp. 2825-2831.
243. Ebihara, Ken, Fujiwara, Hironori, Awale, Suresh, Dibwe, Dya Fita, Araki, Ryota, Yabe, Takeshi, and Matsumoto, Kinzo (2017), "Decrease in endogenous brain allopregnanolone induces autism spectrum disorder (ASD)-like behavior in mice: A novel animal model of ASD", *Behavioural brain research*. 334, pp. 6-15.
244. Smolinsky, Amanda N, Bergner, Carisa L, LaPorte, Justin L, and Kalueff, Allan V (2009), "Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety, and depression", *Mood and anxiety related phenotypes in mice*, Springer, pp. 21-36.
245. De Montis, Maria Graziella, Gambarana, Carla, and Meloni, Domenico (1993), "α-methyl-para-tyrosine antagonizes the effect of chronic imipramine on learned helplessness in rats", *European journal of pharmacology*. 249(2), pp. 179-183.
246. Daubner, S Colette, Le, Tiffany, and Wang, Shanzhi (2011), "Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis", *Archives of biochemistry and biophysics*. 508(1), pp. 1-12.

247. Miller, Helen L, Delgado, Pedro L, Salomon, Ronald M, Heninger, George R, and Charney, Dennis S (1996), "Effects of α-methyl-para-tyrosine (AMPT) in drug-free depressed patients", *Neuropsychopharmacology*. 14(3), pp. 151-157.
248. Lam, Raymond W, Tam, Edwin M, Grewal, Arvinder, and Yatham, Lakshmi N (2001), "Effects of alpha-methyl-para-tyrosine-induced catecholamine depletion in patients with seasonal affective disorder in summer remission", *Neuropsychopharmacology*. 25(1), pp. S97-S101.
249. Thomas, David M, Francescutti-Verbeem, Dina M, and Kuhn, Donald M (2008), "The newly synthesized pool of dopamine determines the severity of methamphetamine-induced neurotoxicity", *Journal of neurochemistry*. 105(3), pp. 605-616.
250. Park, DH, Stone, DM, Baker, H, Kim, KS, and Joh, TH (1994), "Early induction of rat brain tryptophan hydroxylase (TPH) mRNA following parachlorophenylalanine (PCPA) treatment", *Molecular brain research*. 22(1-4), pp. 20-28.
251. O'Leary, Olivia F, Bechtholt, Anita J, Crowley, James J, Hill, Tiffany E, Page, Michelle E, and Lucki, Irwin (2007), "Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test", *Psychopharmacology*. 192(3), pp. 357-371.
252. Brann, Darrell W, Dhandapani, Krishnan, Wakade, Chandramohan, Mahesh, Virendra B, and Khan, Mohammad M (2007), "Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications", *Steroids*. 72(5), pp. 381-405.
253. Gould, Elizabeth, McEwen, Bruce S, Tanapat, Patima, Galea, Liisa AM, and Fuchs, Eberhard (1997), "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation", *Journal of Neuroscience*. 17(7), pp. 2492-2498.
254. Jacobs, Barry L, Van Praag, H, and Gage, FH (2000), "Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression", *Molecular psychiatry*. 5(3), pp. 262-269.
255. Malberg, Jessica E, Eisch, Amelia J, Nestler, Eric J, and Duman, Ronald S (2000), "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus", *Journal of Neuroscience*. 20(24), pp. 9104-9110.
256. Nakazawa, Takahiro, Yasuda, Takaaki, Ueda, Joji, and Ohsawa, Keisuke (2003), "Antidepressant-like effects of apigenin and 2, 4, 5-trimethoxycinnamic acid from *Perilla frutescens* in the forced swimming test", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 26(4), pp. 474-480.

257. Yi, Li-Tao, Li, Jian-Mei, Li, Yu-Cheng, Pan, Ying, Xu, Qun, and Kong, Ling-Dong (2008), "Antidepressant-like behavioral and neurochemical effects of the citrus-associated chemical apigenin", *Life sciences*. 82(13-14), pp. 741-751.
258. Zhu, Shujie, Lei, Shaowei, Zhou, Sisi, Jin, Lisha, Zeng, Su, Jiang, Huidi, and Zhou, Hui (2019), "Luteolin shows antidepressant-like effect by inhibiting and downregulating plasma membrane monoamine transporter (PMAT, Slc29a4)", *Journal of Functional Foods*. 54, pp. 440-448.
259. Gatchel, Jennifer R, Rabin, Jennifer S, Buckley, Rachel F, Locascio, Joseph J, Quiroz, Yakeel T, Yang, Hyun-Sik, Vannini, Patrizia, Amariglio, Rebecca E, Rentz, Dorene M, and Properzi, Michael (2019), "Longitudinal association of depression symptoms with cognition and cortical amyloid among community-dwelling older adults", *JAMA network open*. 2(8), pp. e198964-e198964.
260. Manaharan, Thamilvaani, Thirugnanasampandan, Ramaraj, Jayakumar, Rajarajeswaran, Ramya, Gunasekar, Ramnath, Gogul, and Kanthimathi, MS (2014), "Antimetastatic and anti-inflammatory potentials of essential oil from edible *Ocimum sanctum* leaves", *The Scientific World Journal*. 2014.
261. Beatović, Damir, Jelačić, Slavica, Oparnica, Čedo, Krstić-Milošević, Dijana, Glamočlija, Jasmina M, Ristić, Mihailo S, and Šiljegović, Jovana D (2013), "Chemical composition, antioxidative and antimicrobial activity of essential oil of *Ocimum sanctum* L", *Hemijska industrija*. 67(3), pp. 427-435.
262. Giridharan, Vijayasree V, Thandavarayan, Rajarajan A, and Konishi, Tetsuya (2015), "*Ocimum sanctum* Linn.(Holy Basil) to improve cognition", *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*, Elsevier, pp. 1049-1058.

PHỤ LỤC 1

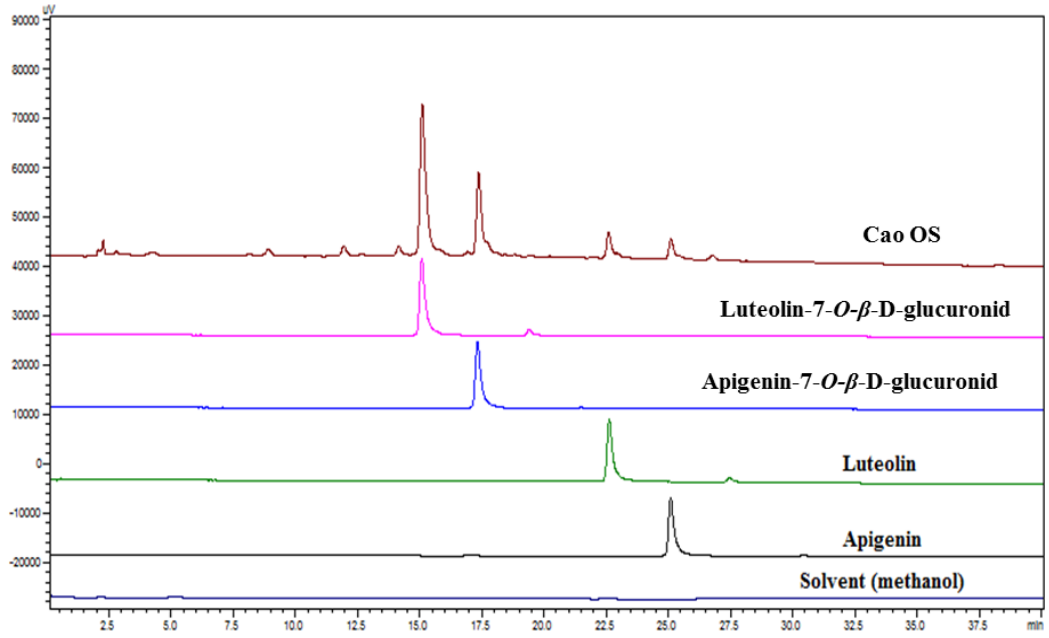
KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC CỦA CÂY HƯƠNG NHU TÍA

Hình 1. *Ảnh chụp tiêu bản cây Hương nhu tía (Ocimum sanctum L.) lưu tại khoa Tài nguyên, Viện Dược liệu*

PHỤ LỤC 2

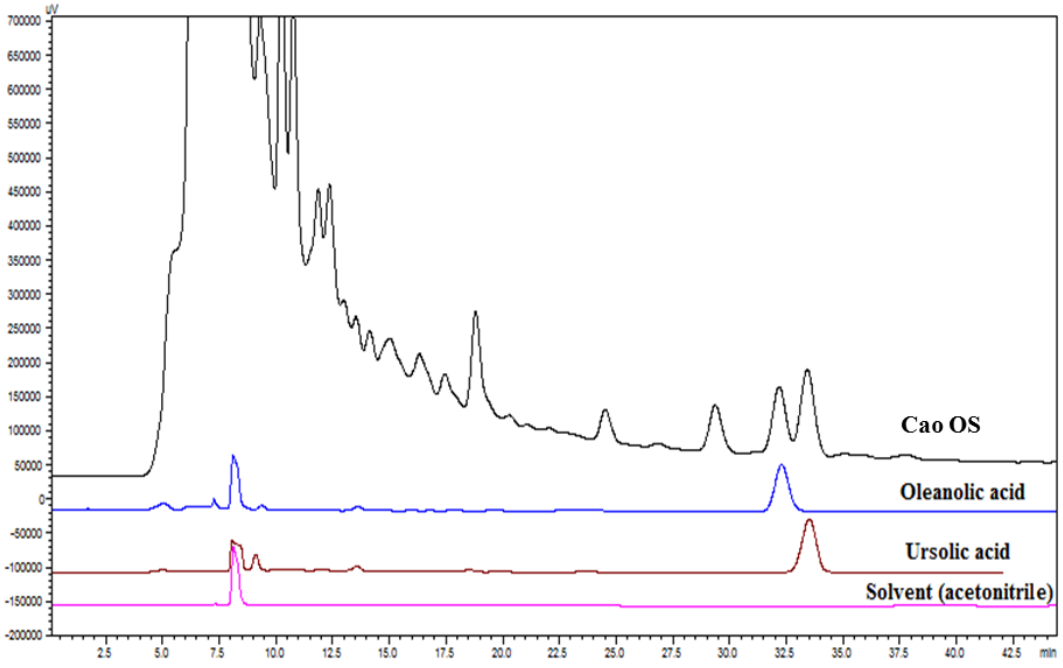
KẾT QUẢ ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG BẰNG HPLC CÁC HỢP CHẤT MARKER TRONG HƯƠNG NHU TÍA

1. Sắc ký đồ các chất phân lập từ cao chiết cồn hương nhu tía



(A)

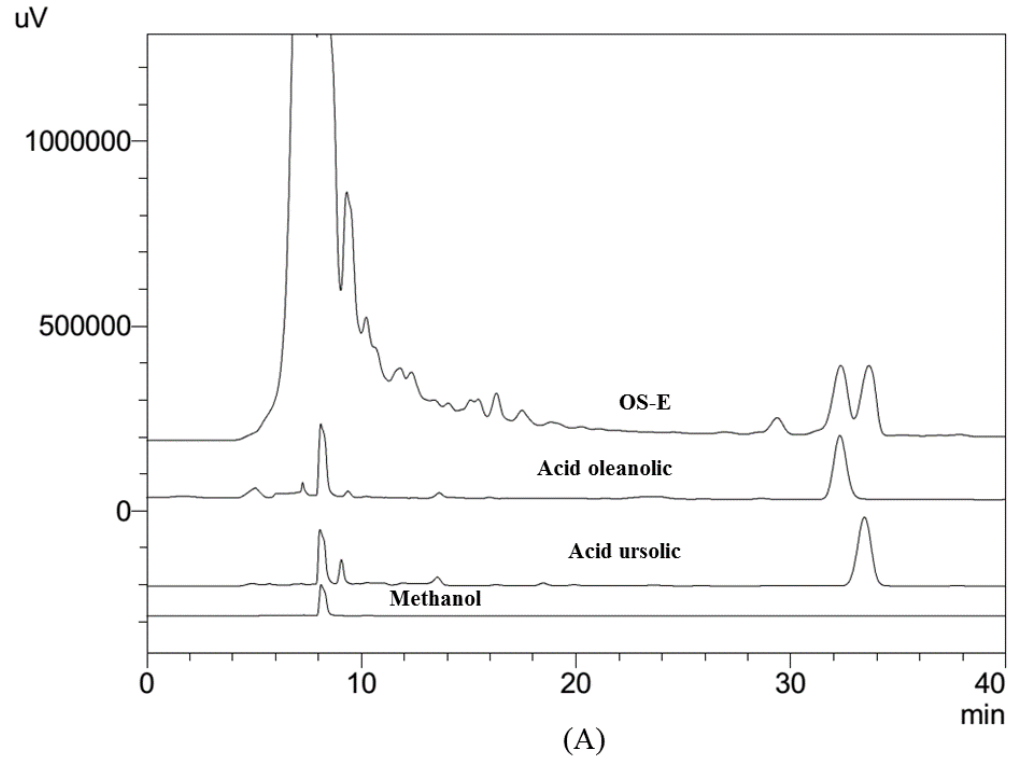
Hình 2A. *Sắc ký đồ của cao OS, luteolin, apigenin, luteolin-7-O-β-D-glucoronid và apigenin-7-O-β-D-glucoronid*



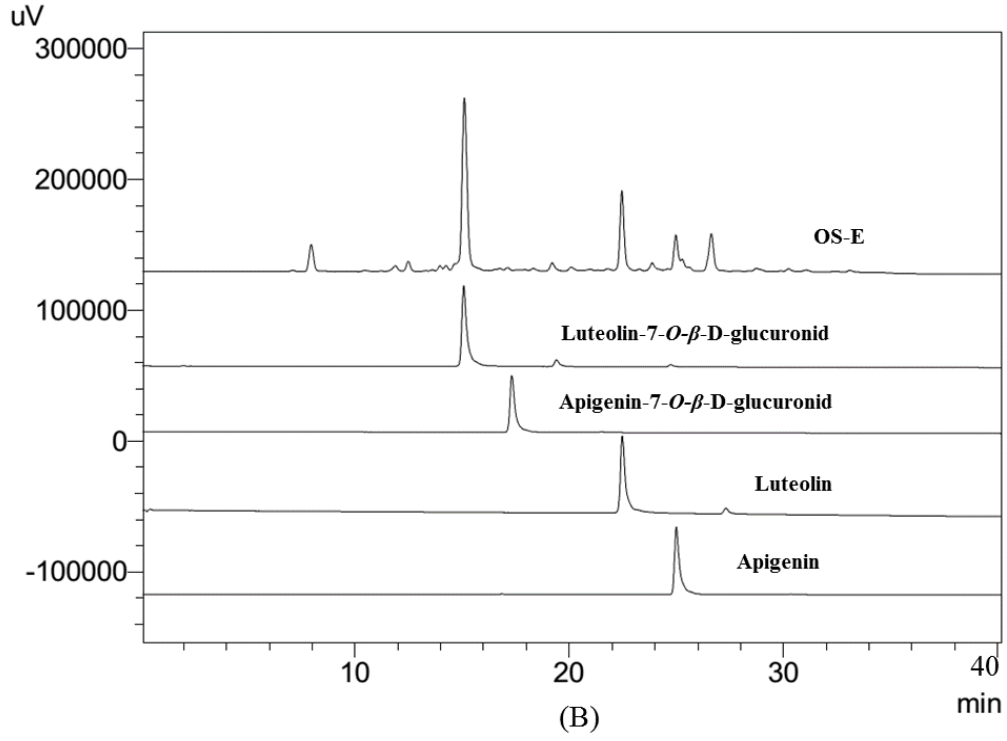
(B)

Hình 2B. *Sắc ký đồ của cao OS, acid ursolic và acid oleanolic*

2. Sắc ký đồ các chất phân lập từ cao ethyl acetat

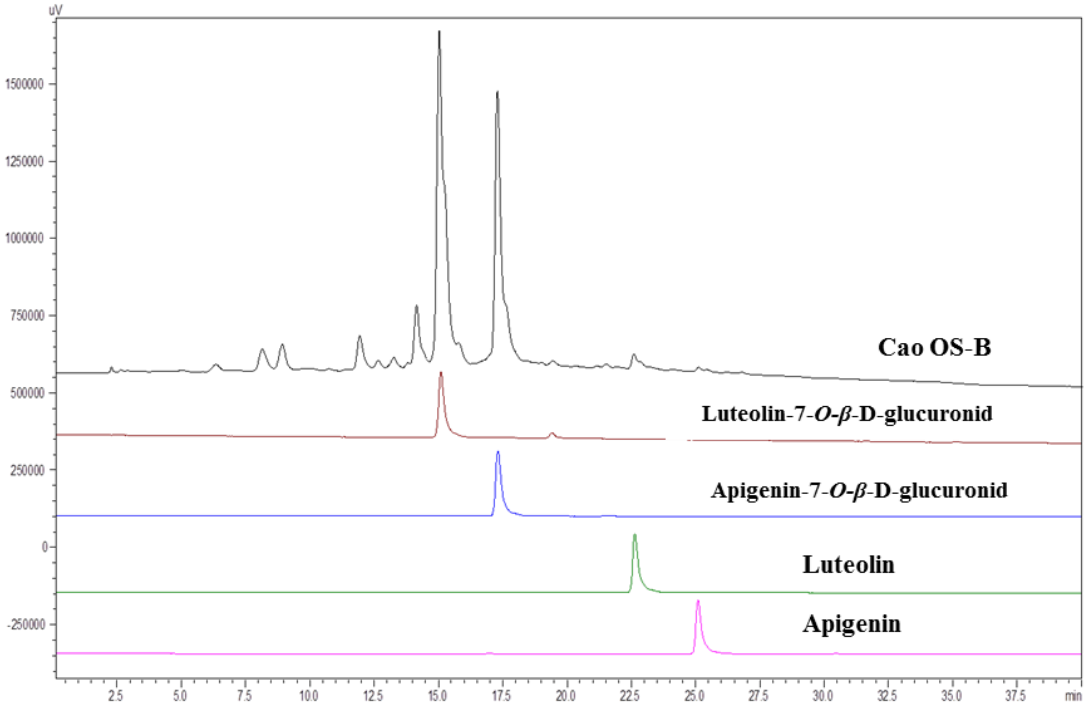


Hình 3A. *Sắc ký đồ của cao OS-E, acid ursolic và acid oleanolic*



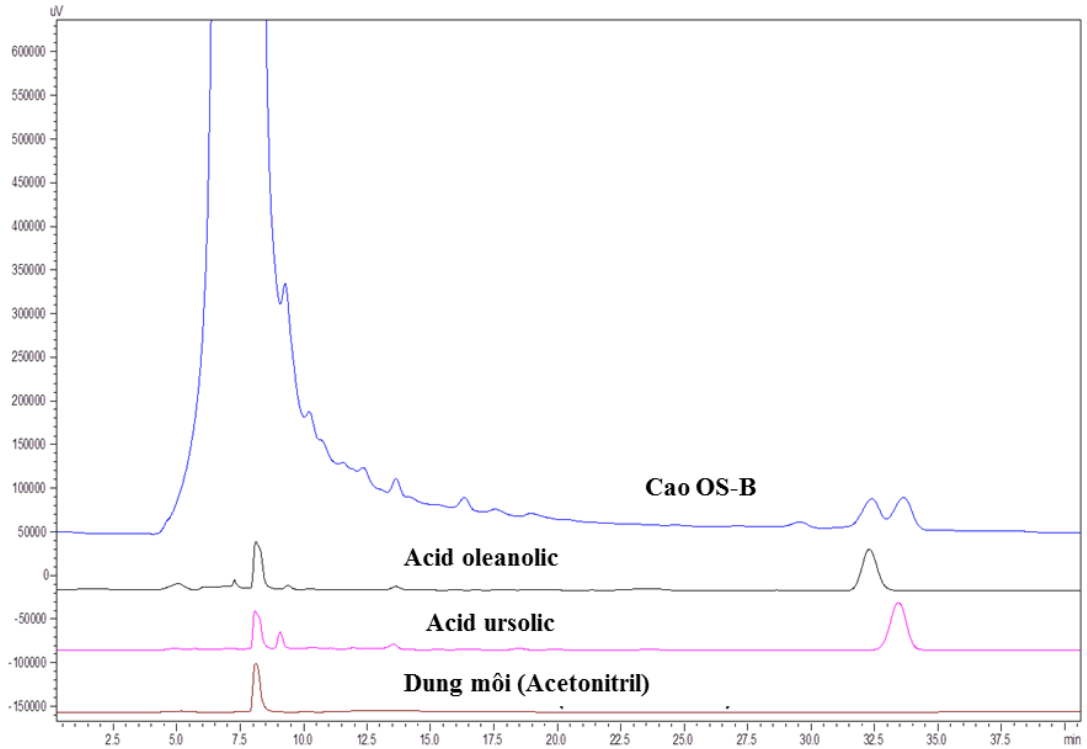
Hình 3B. *Sắc ký đồ của cao OS-E, apigenin, luteolin, apigenin-7-O-β-D-glucuronid, luteolin-7-O-β-D-glucuronid*

3. Sắc ký đồ các chất phân lập từ cao n-butanol



(A)

Hình 4A. *Sắc ký đồ của cao OS-B, apigenin, luteolin, apigenin-7-O-β-D-glucuronid, luteolin-7-O-β-D-glucuronid*



(B)

Hình 4B. *Sắc ký đồ của cao OS-B, acid ursolic và acid oleanolic*

4. Kết quả phân lập các chất trong hương nhu tía được trình bày ở *Bảng 1:*

Bảng 1. *Kết quả phân tích định lượng một số hoạt chất chính trong cao chiết OS và các phân đoạn bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)*

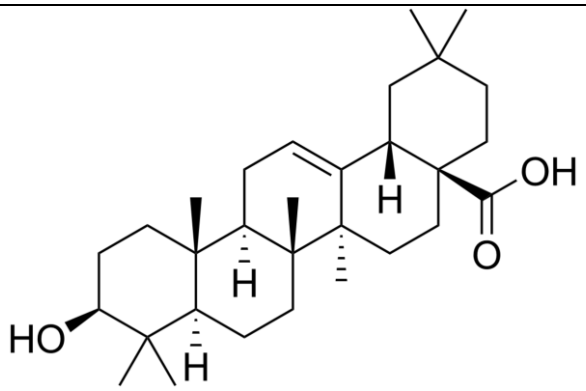
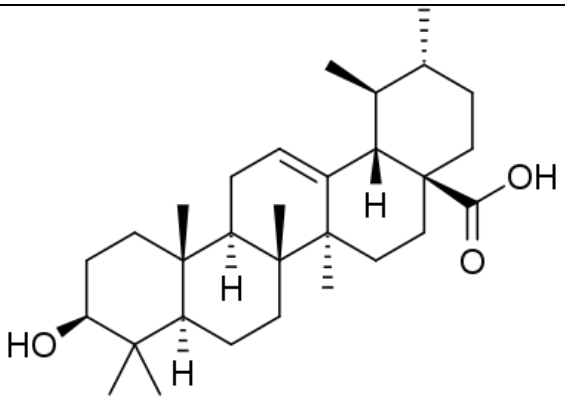
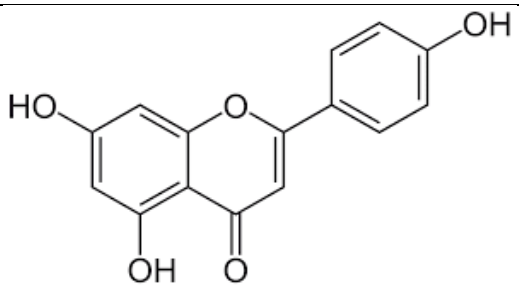
Cao chiết	**Luteolin (%)**	**Apigenin (%)**	**Luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid (%)**	**Apigenin-7-*O*-*β*-D-glucuronid (%)**	**Acid oleanolic (%)**	**Acid ursolic (%)**
Cồn OS tổng số	0.11	0.13	3.06	0.85	1.48	1.02
Hexan	0.04	0.03	-	-	1.22	1.06
EtOAc	1.18	0.82	7.75	-	**10.27**	**11.00**
n-BuOH	0.45	0.15	5.82	2.26	0.87	1.00

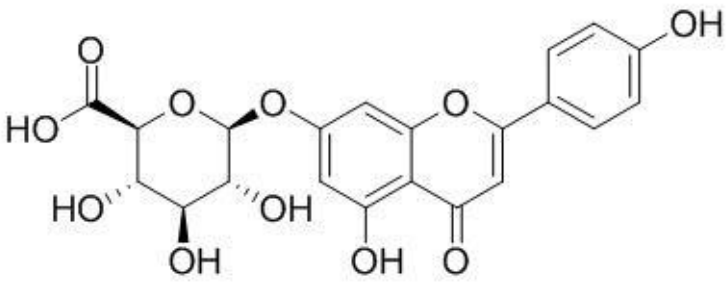
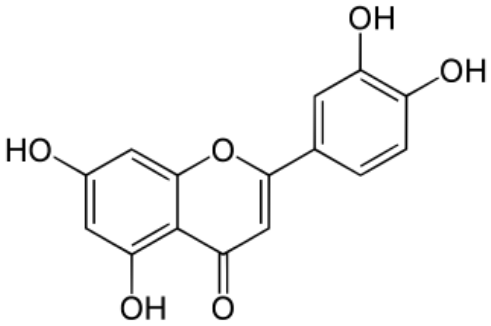
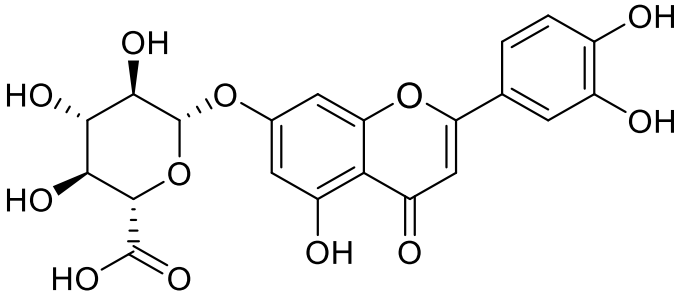
PHỤ LỤC 3

CÔNG THỨC CẤU TẠO CÁC CHẤT PHÂN LẬP TRONG HƯƠNG NHU TÍA

Công thức cấu tạo các chất phân lập trong hương nhu tía được trình bày ở *Bảng 2:*

Bảng 2. *Công thức cấu tạo các chất phân lập trong hương nhu tía*

STT	Tên hợp chất	Công thức cấu tạo
1	Acid oleanolic	
2	Acid ursolic	
3	Apigenin	

STT	Tên hợp chất	Công thức cấu tạo
4	Apigenin-7-*O*-*β*-D-glucuronid	
5	Luteolin	
6	Luteolin-7-*O*-*β*-D-glucuronid	

BỘ Y TẾ
VIỆN DƯỢC LIỆU
Số: 1219 /QĐ-VDL

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 26 tháng 9 năm 2022

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án Tiến sĩ cấp Viện

VIỆN TRƯỞNG VIỆN DƯỢC LIỆU

Căn cứ Quyết định số 4886/QĐ-BYT ngày 18/10/2019 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành Quy chế Tổ chức và Hoạt động của Viện Dược liệu;

Căn cứ Quyết định số 93/TTg ngày 20/3/1979 của Hội đồng Bộ trưởng giao trách nhiệm đào tạo sau đại học trong nước cho Viện Dược liệu;

Căn cứ Thông tư số 18/2021/TT-BGDĐT ngày 28/06/2021 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành "Quy chế Tuyển sinh và Đào tạo trình độ tiến sĩ";

Căn cứ Quyết định số 1150/QĐ-VDL ngày 26/11/2021 của Viện trưởng Viện Dược liệu ban hành "Quy chế đào tạo trình độ tiến sĩ của Viện Dược liệu";

Căn cứ Quyết định số 805/QĐ-VDL ngày 12/09/2016 của Viện trưởng Viện Dược liệu về việc công nhận nghiên cứu sinh năm 2016;

Căn cứ Quyết định số 1175/QĐ-VDL ngày 04/12/2018 của Viện trưởng Viện Dược liệu về việc thay đổi tên đề tài luận án và tập thể hướng dẫn của NCS;

Căn cứ Quyết định số 757/QĐ-VDL ngày 21/08/2021 của Viện trưởng Viện Dược liệu về việc gia hạn thời gian học tập của NCS;;

Căn cứ biên bản họp Hội đồng bảo vệ luận án cấp Cơ sở của Nghiên cứu sinh ngày 21/04/2022 theo Quyết định thành lập Hội đồng số 368/QĐ-VDL ngày 21/03/2022 của Viện trưởng Viện Dược liệu;

Căn cứ Đơn xin bảo vệ cấp Viện của Nghiên cứu sinh;

Theo đề nghị của Trưởng phòng Khoa học và Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận án Tiến sĩ cấp Viện cho NCS Nguyễn Thu Hiền.

Tên đề tài: **"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

(Danh sách Hội đồng kèm theo)

Điều 2. Hội đồng có nhiệm vụ đánh giá luận án Tiến sĩ cấp Viện cho NCS Nguyễn Thu Hiền theo đúng quy định hiện hành.

Điều 3. Quyết định này có hiệu lực từ ngày ký. Hội đồng đánh giá luận án Tiến sĩ cấp Viện ở trên sẽ tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 4. Các thành viên Hội đồng, phòng KH&ĐT, nghiên cứu sinh, các cá nhân và đơn vị liên quan chịu trách nhiệm thi hành quyết định này./.

Nơi nhận:
- Như Điều 4;
- Lưu: P.KH&ĐT, VT.

VIỆN TRƯỞNG

VIỆN DƯỢC LIỆU

Nguyễn Minh Khởi

BỘ Y TẾ
VIỆN DƯỢC LIỆU

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG
ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP VIỆN

(Kèm theo Quyết định số 1219/QĐ-VDL ngày 26/ 9 /2022)

Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thu Hiền

Tên đề tài: **"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

Người hướng dẫn: PGS.TSKH. Nguyễn Minh Khởi
TS. Lê Thị Xoan

TT	Họ và tên	Đơn vị công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1	PGS.TS. Nguyễn Trọng Thông	Trường Đại học Y Hà Nội	Chủ tịch hội đồng
2	PGS.TS. Phạm Thị Vân Anh	Trường Đại học Y Hà Nội	Phản biện 1
3	PGS. TS. Nguyễn Thị Thu Hương	Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng	Phản biện 2
4	PGS. TS. Cấn Văn Mão	Học viện Quân Y	Phản biện 3
5	PGS. TS. Trần Mạnh Hùng	Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh	Ủy viên hội đồng
6	PGS. TS. Đào Thị Vui	Trường Đại học Dược Hà Nội	Ủy viên hội đồng
7	PGS. TS. Bùi Thanh Tùng	Đại học Y Dược – Đại học Quốc gia Hà Nội	Ủy viên - Thư ký

Thư ký hành chính: ThS. Phí Thị Xuyến – Phòng Khoa học và Đào tạo

BỘ Y TẾ
VIỆN DƯỢC LIỆU

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

VIỆN DƯỢC LIỆU

Hà Nội, ngày 27 tháng 10 năm 2022

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP VIỆN

Họ và tên NCS: **Nguyễn Thu Hiền**

Tên 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"**

Chuyên ngành: Dược lý - Dược lâm sàng Mã số: 9720205

Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Viện gồm 07 thành viên sau đây:

STT	Họ và tên	Trách nhiệm trong Hội đồng	Chữ ký
1	PGS.TS. Nguyễn Trọng Thông	Chủ tịch Hội đồng	
2	PGS.TS. Phạm Thị Vân Anh	Phản biện 1	
3	PGS. TS. Nguyễn Thị Thu Hương	Phản biện 2	
4	PGS. TS. Cấn Văn Mão	Phản biện 3	
5	PGS. TS. Trần Mạnh Hùng	Ủy viên hội đồng	
6	PGS. TS. Đào Thị Vui	Ủy viên hội đồng	
7	PGS. TS. Bùi Thanh Tùng	Ủy viên thư ký	

BỘ Y TẾ
VIỆN DƯỢC LIỆU

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 27 tháng 10 năm 2022

BIÊN BẢN VÀ NGHỊ QUYẾT CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC CẤP VIỆN

Họ và tên nghiên cứu sinh: **Nguyễn Thu Hiền** Khoá: 2016
Tên đề tài 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"**
Chuyên ngành: Dược lý - Dược lâm sàng Mã số: 9720205
Buổi bảo vệ luận án tổ chức tại Hội trường tầng 4 - Viện Dược liệu vào hồi 14h00, ngày 27 tháng 10 năm 2022.

Hội đồng được thành lập theo quyết định số: 1219/QĐ-VDL ngày 26/09/2022 của Viện trưởng Viện Dược liệu.

Thành phần tham dự buổi bảo vệ:

- Về phía Hội đồng (danh sách, chức nhiệm thành viên Hội đồng có mặt):

1.	PGS.TS. Nguyễn Trọng Thông	Trường Đại học Y Hà Nội	Chủ tịch hội đồng
2.	PGS.TS. Phạm Thị Vân Anh	Trường Đại học Y Hà Nội	Phản biện 1
3.	PGS. TS. Nguyễn Thị Thu Hương	Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng	Phản biện 2
4.	PGS. TS. Cấn Văn Mão	Học viện Quân Y	Phản biện 3
5.	PGS. TS. Trần Mạnh Hùng	Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh	Ủy viên hội đồng
6.	PGS. TS. Đào Thị Vui	Trường Đại học Dược Hà Nội	Ủy viên hội đồng
7.	PGS. TS. Bùi Thanh Tùng	Đại học Y Dược – Đại học Quốc gia Hà Nội	Ủy viên - Thư ký

- Tập thể hướng dẫn:
  + PGS.TSKH. Nguyễn Minh Khởi
  + TS. Lê Thị Xoan
- Đại biểu tham dự:
  + Cán bộ nghiên cứu tại Viện Dược liệu;
  + Bạn bè, đồng nghiệp của NCS.
- Đại biểu khác:
  + Các nghiên cứu sinh của Viện Dược liệu;
  + Các nhà khoa học trong và ngoài Viện quan tâm.

A. NỘI DUNG BUỔI BẢO VỆ

Hội đồng đã nghe:

- Công bố quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận án cấp Viện;
- Tóm tắt Lý lịch khoa học và Kết quả học tập của NCS;

- Điều kiện để NCS bảo vệ luận án.
- NCS trình bày luận án trong thời gian 30 phút.

1. Đánh giá của các phản biện

Tóm tắt các ý kiến đánh giá chính, quan trọng và các câu hỏi đặt ra của từng phản biện.

PGS.TS Phạm Thị Vân Anh:

Đề tài có tính khoa học, cấp thiết và giá trị thực tiễn cao, đặc biệt phát triển nguồn dược liệu sẵn có tại Việt Nam. Đề tài không có sự trùng lặp của đề tài trong nước và quốc tế. Đề tài có hai mục tiêu và kết quả đã bao phủ được hai nội dung, bao gồm chuẩn hóa dược liệu nghiên cứu, các mẫu nghiên cứu cao chiết, các phân đoạn, các hợp chất tinh khiết phân lập được, sử dụng các mô hình dược lý kinh điển, hiện đại để đánh giá tác dụng và tìm hiểu sơ bộ cơ chế tác dụng, các thử nghiệm đánh giá hành vi. Các chỉ tiêu theo dõi và đánh giá: hợp lý, đầy đủ, logic và hiện đại. Đảm bảo tính khoa học và tin cậy trong các nghiên cứu. Đề tài được tiếp cận theo hướng dược lý thực nghiệm một cách có hệ thống và toàn diện, thu được nhiều kết quả có ý nghĩa khoa học và có tính thực tiễn. Bố cục luận án tương đối cân đối.

Kết quả thu được bao gồm:

Tác dụng cải thiện trí nhớ:

- Cao chiết cồn hương nhu tía 400 mg/kg/ngày, đường uống và cao chiết phân đoạn ethyl acetat 200 và 400 mg/kg/ngày, đường uống có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ làm việc trên chuột bị loại bỏ thùy khứu giác.
- Một số cơ chế tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ: 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, ngăn chặn sự suy giảm biểu hiện gen và protein VEGF vùng hồi hải mã trên chuột bị loại bỏ thùy khứu giác.
- Hai chất tinh khiết là acid ursolic và acid oleanolic có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ không gian ngắn hạn và dài hạn trên mô hình chuột bị loại bỏ thùy khứu giác. acid ursolic có tác dụng rõ rệt ở liều 6 và 12 mg/kg/ngày, đường uống, Acid oleanolic 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, tăng cường biểu hiện protein yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu trong hồi hải mã của chuột bị loại bỏ thùy khứu giác.

Tác dụng chống trầm cảm:

- Cao toàn phần và cao chiết phân đoạn n-butanol liều 400 mg/kg/ngày, đường uống có tác dụng giảm hành vi tuyệt vọng trong thử nghiệm treo đuôi và tăng hành vi trốn thoát có định hướng trong thử nghiệm bơi cưỡng bức trên chuột bị loại bỏ thùy khứu giác.
- Cao chiết phân đoạn n-butanol (50 và 100 mg/kg/ngày, đường uống) có tác dụng chống trầm cảm. OS-B liều 100 mg/kg/ngày làm giảm các biểu hiện trầm cảm trên chuột chuột bị gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước một cách rõ rệt.
- Cơ chế tác dụng chống trầm cảm của OS-B trên chuột chuột bị gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước: thông qua tác động lên hệ monoaminergic, cụ thể là hệ serotonergic, noradrenergic và dopaminergic.

Một số đề nghị chỉnh sửa và câu hỏi bao gồm:

- Tổng quan dài tuy nhiên mối liên quan giữa sa sút trí tuệ và trầm cảm theo y học hiện đại trong các nhóm thuốc điều trị chưa được phân tích và hệ thống.
- Tài liệu tham khảo chưa được cập nhật, tỷ lệ trong 5 năm gần đây thấp
- Đánh giá hoạt động của chuột gồm hoạt động ngang, dọc do máy tự động ghi lại bằng hệ thống cảm ứng hồng ngoại, lồng chuột cống hay nhắt sẽ khác nhau. Tại sao trong phần phương pháp mô tả cần camera và người đánh giá để làm gì? Hơn nữa các thông số này rất nhiễu vì hoạt động của chuột phụ thuộc sáng hay tối, phòng yên tĩnh hay không, thời nào. Vậy làm thế nào để khắc phục các yếu tố nhiễu này?
- Các phần thiết bị tự chế như Morris, Tmaze, mê lộ chữ Y, thanh treo chuột, bể nước hình trụ cần bổ sung kích thước và tài liệu tham khảo ở trang 40. Vì nếu không đúng kích cỡ và thiết kế sẽ không đảm bảo đánh giá được trí nhớ không gian, thời gian, cũng như không gây được stress.
- Các nghiên cứu trên thế giới công bố liên quan đến trầm cảm thường 12 tuần. Thời gian 6 tuần đã đảm bảo được gây ra trầm cảm và rối loạn hành vi cho chuột chưa?
- Có nhóm thuốc hóa dược hoặc dược liệu nào được cấp phép cho chỉ định cả cho sa sút trí tuệ và chống trầm cảm chưa?

PGS.TS Nguyễn Thị Thu Hương:

Các kết quả của luận án đã cung cấp những minh chứng khoa học, góp phần tạo cơ sở cho việc phát triển sản phẩm từ cây hương nhu tía, một dược liệu sẵn có, đã được trồng rộng rãi và khai thác theo tiêu chuẩn của Việt Nam, trong dự phòng và điều trị sa sút trí tuệ và bệnh trầm cảm. Nội dung luận án không trùng lặp với các công trình công bố trong và ngoài nước. Các luận điểm khoa học được trình bày dựa trên trích dẫn 263 tài liệu tham khảo rõ ràng và đầy đủ. Các nội dung nghiên cứu phù hợp với tên luận án và mã số chuyên ngành. Đề tài được thực hiện với những phương pháp thường quy về hóa thực vật (chiết xuất cao tổng, cao phân đoạn) và dược lý thực nghiệm nên có độ tin cậy khoa học. Các nghiên cứu dược lý được thực hiện phối hợp các khảo sát *in vitro, ex vivo* và *in vivo* trên chuột. Kết quả nghiên cứu có độ lập lại, được phân tích thống kê so sánh với chứng âm (không điều trị) và chứng dương (điều trị bằng thuốc đối chiếu) nên các kết luận có độ tin cậy khoa học. Luận án có cấu trúc phù hợp, format đúng theo quy chế hướng dẫn với phần tổng quan tài liệu được trình bày chi tiết, tương đối đầy đủ; phần phương pháp và kết quả được trình bày logic, phù hợp với nội dung nghiên cứu, có dung lượng các kết quả nhiều, có phân tích/biện giải và so sánh thống kê. Các kết quả có tính mới được bàn luận sâu theo hướng phát triển nghiên cứu. Tuy nhiên việc trích dẫn tài liệu được cập nhật trong vòng 5 năm gần đây chiếm tỷ lệ thấp 25,1% (có 66/263 tài liệu). Bản Tóm tắt phản ánh ngắn gọn các nội dung chính của luận án, tuy nhiên phần tổng quan về đối tượng nghiên cứu là hương nhu tía liên quan đến hướng nghiên cứu còn quá ít. Còn có một số lỗi về trình bày.

Một số yêu cầu chỉnh sửa bao gồm:

Bổ sung Danh mục chữ viết tắt hoặc diễn giải ngay trong đoạn văn (nếu chỉ xuất hiện 1 lần); Chương Tổng quan: Nên đề cập vài dòng đến butyrylcholinesterase (BuChE) cũng là một mục tiêu trong điều trị bệnh lý thoái hóa tế bào thần kinh và là biomarker trong bệnh Alzheimer (AD); Nên đề cập mối liên quan giữa stress oxy hóa do gốc tự do với

bệnh AD. Chương Nguyên liệu và Phương pháp nghiên cứu: Xem lại tính thống nhất trong phương pháp tạo cao khô phân đoạn ở bản Tóm tắt và trong luận án. Bổ sung sơ đồ thiết kế nghiên cứu phối hợp các tác nhân để gây stress nhẹ trường diễn không đoán trước. Trong Thử nghiệm bơi cưỡng bức (FST) để nhiệt độ nước về 20 ± 1°C là hơi thấp và có thể ảnh hưởng đến hành vi. Cần nêu biện pháp kiểm soát sai số trong phân lập các vùng não chuột (vỏ não, hồi hải mã) cho các thử nghiệm khảo sát cơ chế tác động.

Chương Kết quả nghiên cứu: Hình 3.5A-trang 70: Chưa thấy có sự khác biệt giữa số lượng tế bào dương tính với ChAT (có màu nâu) giữa chứng sinh lý và chứng bệnh OBX; Tác giả có khảo sát tác dụng của cao tổng OS trên mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước có cải tiến? Kết quả biểu thị ở mục 3.2.2-trang 89-97 là tác dụng và cơ chế tác động của cao phân đoạn n-BuOH trên mô hình này.

Chương Bàn luận: Cần bàn luận về cơ chế bảo vệ tế bào thần kinh trước tổn thương oxy hóa (gây thoái hóa tế bào thần kinh) của các hợp chất phenol tổng và flanonoid trong thành phần hóa học cao phân đoạn OS-E (luteolin, apigenin và luteolin-7-O-β-D-glucuronid); Hoạt tính ức chế AChE in vitro của acid ursolic (IC_{50} = 106,5 μM) thấp hơn nhiều so với donepezil (IC_{50} = 8,23 μM) (trang 85). Tuy nhiên acid ursolic (6-12 mg/kg) thể hiện tác dụng ức chế AChE trong vỏ não (ex vivo) tương đương với donepezil (trang 82)? Giải trình tính chưa nhất quán trong lựa chọn liều khảo sát của OS-B ở các mô hình OBX (liều OS-B 400 mg/kg) và mô hình UCMS (liều OS-B là 50-100 mg/kg)?; Tác giả bàn luận vai trò của các hợp chất luteolin, apigenin (đều có hàm lượng cao hơn trong OS-E) là chưa hợp lý. Nên chọn apigenin-7-O-β-D-glucuronid có thể là hợp chất quyết định tác dụng chống trầm cảm của OS-B (do hợp chất này không được phát hiện trong OS-E)? Tác giả có suy nghĩ gì về khả năng ứng dụng của mô hình OBX trong sàng lọc ứng viên tiềm năng kháng SARS-CoV (mất khứu giác/sương mù não)?

PGS.TS Cấn Văn Mão:

Đề tài nghiên cứu có ý nghĩa khoa học trong tìm hiểu cơ chế tác dụng và ý nghĩa thực tế trong việc tìm kiếm các loại dược liệu có nguồn gốc tự nhiên, có khả năng cải thiện suy giảm trí nhớ và chống trầm cảm. Không trùng lặp so với các công trình nghiên cứu ở trong và ngoài nước; Luận án nghiên cứu tác dụng và cơ chế cải thiện suy giảm trí nhớ và chống trầm cảm của Hương nhu tía là phù hợp với chuyên ngành Dược lý – Dược lâm sàng. Số liệu nghiên cứu được phân tích, đánh giá bằng các trang thiết bị, phần mềm hiên đại, có tính định lượng, có độ tin cậy cao. Một số chỉnh sửa bao gồm:

- Phần Tổng quan cũng nên có một đoạn nói về phần mềm Any maze, Phần đối tượng nghiên cứu thì nêu rõ các tiêu chí động vật trong bài tập chữ Y, trong bài tập mê lộ nước.

- Phần kết quả cần ghi các ký hiệu và giải thích cho các hình như hình 3.2, 3.3…3.6 như (*p<0,05 khi so sánh lô sinh lý với lô bệnh và #p<0,05 khi so sánh các lô thuốc với lô bệnh lý) nên sửa là (*p<0,05 so sánh với lô sinh lý và #p<0,05 so sánh với lô bệnh lý). Cần chỉnh sửa lại một số bàn luận ở các trang 86, 87, 93, 97, 98; bàn luận mục 4.1.1 còn dài dòng, một số nội dung như liều dùng cao chiết, cách chọn thuốc chứng dương, mô hình động vật có thể lồng vào phần bàn luận; bàn luận về lý do tại sao lại chọn các bài tập hành vi khác nhau khi đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ cũng như trong đánh giá tác dụng chống trầm cảm?

2. Đánh giá của các nhà khoa học ngoài Hội đồng:

Tổng hợp các ý kiến thông qua bản tóm tắt luận án.

Thư ký đọc đầy đủ bản tổng hợp các ý kiến nhận xét tóm tắt luận án tiến sĩ (xem phụ lục) bảng tổng hợp. Nội dung các bản nhận xét của các nhà khoa học đều thống nhất đánh giá cao kết quả nghiên cứu thu được của NCS. Nguyễn Thu Hiền. Nội dung nghiên cứu hợp lý, phù hợp với tên đề tài và mục tiêu đề ra, phù hợp với mã số chuyên ngành Dược liệu - Dược học cổ truyền.

Các chuyên gia đều đồng ý nhất trí NCS. Nguyễn Thu Hiền sau khi bảo vệ cấp Viện và sửa chữa xứng đáng nhận học vị tiến sĩ Dược học.

3. Đánh giá của các thành viên khác của hội đồng:

Tóm tắt các ý kiến đánh giá chính, quan trọng và các câu hỏi đặt ra của từng thành viên.

PGS.TS Trần Mạnh Hùng

Luận án đáp ứng được tính cấp thiết, tính thời sự cũng như ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Luận án có những công bố mới về các kết quả trên nên không trùng lặp với các công trình trong nước và nước ngoài. Đề tài phù hợp với chuyên ngành và mã số chuyên ngành là Dược lý – Dược lâm sàng. Giữa tên đề tài và nội dung, mục tiêu cụ thể có sự phù hợp. Luận án có ưu điểm trình bày rõ ràng, nội dung bám sát mục tiêu nghiên cứu, hình ảnh, bảng biểu, phụ lục, số liệu tương đối đầy đủ. Một số điểm đề nghị chỉnh sửa:

Hình thức: một số lỗi thuật ngữ trong bảng chữ viết tắt, phương pháp nghiên cứu: bổ sung mô tả phương pháp đo tính vận động của chuột thí nghiệm ở các thử nghiệm sau khi loại bỏ thùy khứu giác, các thử nghiệm nhận diện vật thể, mê lộ chữ Y, mê lộ nước, …

- Việc đánh giá các tế bào bắt màu thuốc nhuộm DAB trong các thử nghiệm hóa mô miễn dịch với vật kính 10 thường chưa đủ tính thuyết phục cao vì chưa cho thấy rõ thân và trục của các tế bào thần kinh, khó phân biệt giữa các tế bào bắt màu và màu không đặc hiệu.
- Chưa thấy kết quả xác định hoạt tính acetylcholinesterase trong dịch đồng thể trước khi tiến hành thử nghiệm ức chế hoạt tính enzym; chưa thấy việc định lượng protein trước khi sử dụng dịch đồng thể (thường lấy theo đồng lượng protein hơn là đồng thể tích)
- Thiết kế thử nghiệm tác động của hương nhu tía mang tính dự phòng, chưa thấy thiết kế mang tính tác động sau khi các tổn thương thần kinh hoặc biểu hiện hành vi xảy ra, ví dụ ngay sau khi loại bỏ thùy khứu giác hoặc vài tuần sau khi loại bỏ,...
- Chưa mô tả thời gian và số lần sử dụng AMPT, PCPA trong thử nghiệm về cơ chế tác động trên hệ monoaminergic

Một số kết quả và nhận xét cần cân nhắc để đưa ra kết luận mang tính khách quan hơn:

- Kết quả đánh giá giãn não thất cần minh chứng bằng các hình ảnh có vị trí cắt giống nhau. OBX và OBX/DNP cắt hơi về phía trước nên não thất rộng hơn các vị trí sau như OBX/OS.
- Hình chụp ở hồi răng vùng hồi hải mã các tế bào biểu hiện DCX chưa rõ và có vẻ lô sinh lý bắt màu rõ hơn, cần độ phóng đại to hơn để chắc chắn vết màu là tế bào thần kinh thay vì tế bào bắt màu không đặc hiệu hoặc các vết màu. Mặt khác, hình ảnh hồi răng cho thấy vị trí vết cắt không tương đồng nhau nên số lượng tế bào biểu hiệu DCX cũng có thể khác nhau.

- Hình chụp ở vách giữa các tế bào biểu hiện ChAT cũng chưa rõ và có vẻ OBX/OS, OBX/DNP có số lượng tế bào biểu hiện ChAT và nhuộm hematoxylin còn ít hơn cả OBX.
- Nếu số lượng tế bào biểu hiện ChAT giảm có nghĩa ACh giảm và vì thế hoạt độ AChE cũng ít có khả năng tăng lên như kết quả tìm ra trong luận án, điều nàyhơi khó giải thích, vì thế việc định lượng ACh sẽ phản ánh kết quả rõ ràng hơn là xác định hoạt độ AChE
- Kết quả về biểu hiện VEGF và VEGF2 receptor cũng khó giải thích khi hương nhu tía làm tăng biểu hiện VEGF nhưng lại không làm tăng VEGF2 receptor, vậy VEGF tăng cũng không có ý nghĩa gì.
- Trong thử nghiệm SPT, dấu hiệu giảm ưa thích saccharose xảy ra sau 4 tuần do đó thiết kế thử nghiệm quá sớm (tuần đầu) sẽ làm giảm tính chính xác khi đánh giá kết quả. Cũng cần kéo dài thêm thời gian thử nghiệm SPT thay vì chỉ ngưng ở tuần thứ 4

PGS.TS Đào Thị Vui

Đề tài có tính cấp thiết có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn góp phần phát triển nguồn nguyên liệu dồi dào này thành thuốc chữa bệnh phục vụ được đông đảo người bệnh. Đề tài không có sự trùng lắp với các công trình, luận văn, luận án đã công bố trong và ngoài nước. Trích dẫn tài liệu tham khảo tương đối đầy đủ, trung thực, rõ ràng và chính xác. Nội dung nghiên cứu phù hợp với tên đề tài và mục tiêu đặt ra. Nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành và mã số chuyên ngành Dược lý - Dược lâm sàng. Kết cấu luận án tương đối phù hợp, tương đối. Kết quả nghiên cứu phong phú, kết quả thu được có nhiều giá trị cả về khoa học và thực tiễn góp phần đáng kể vào nâng cao học thuật cho chuyên ngành.

Một số góp ý: Phần Tổng quan: Nên gộp các mục 1,1; 1.2 và 1.3 vào một mục lớn thành "Tổng quan về SSTN và trầm cảm"; tách riêng nội dung "Các mô hình dược lý nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ và chống trầm cảm" và nội dung về Các nghiên cứu về sa sút trí nhớ và trầm cảm của hương nhu tía thành các mục riêng.

Về nội dung tổng quan của "Hội chứng sa sút trí tuệ ..." phần nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh, Một số mô hình dược lý gây suy giảm trí nhớ trên thực nghiệm hiện tại tác giả đang chỉ trình bày theo hướng bệnh Alzheimer còn thiếu các nội dung liên quan đến các thể sa sút trí tuệ khác vì vậy cần bổ sung cho đầy đủ.

Đối tượng và PPNC

Sơ đồ nghiên cứu trình bày quá nhiều thứ và không tương xứng với phương pháp nghiên cứu và kết quả nghiên cứu.

Phần phương pháp nghiên cứu dược lý cần rà soát trình bày lại theo 2 mục tiêu. Trình bày về thiết kế các nghiên cứu trước rồi mới trình bày về gây mô hình và các thông số nghiên cứu riêng cho từng mô hình ứng với từng nội dung nghiên cứu. Về phần thiết kế nghiên cứu, cần trình bày rõ nguyên tắc của mô hình, đã tham khảo từ đâu? Mục 2.2.3.1. Mô hình cắt bỏ thuỳ khứu giác (cũng như các mô hình khác): để phần thiết kế có tính logic nên có phần nguyên tắc của mô hình: trình bày vắn tắt về vai trò vùng khứu giác và ý nghĩa của việc gây mô hình loại bỏ vùng khứu giác dùng cho nghiên cứu. Đồng thời ra soát lại trình bày cho rõ ràng hơn

Kết quả nghiên cứu: LA trình bày chủ yếu là hình ít bảng số liệu; Các hình kết quả NC cần thống nhất tên lô của phần kết quả giống phần PPNC; Lô chứng bệnh ở thí nghiệm tác dụng chống trầm cảm còn đặt tên lô là chưa chính xác. Phần dẫn dắt và nhận xét kết quả quá dài chỉ nên nhận xét ngắn gọn và không nên bàn luận ở phần kết quả vì đã có mục Bàn luận riêng.

Bàn luận: Phần Bàn luận cần sát hơn vào các nội dung nghiên cứu. Phần bàn luận về cơ chế tác dụng cần thận trọng hơn ví dụ Hình 4.2. tác giả chưa xác định nồng độ serotonin vì vậy không thể khẳng định mẫu NC làm tăng nồng độ serotonin được. Đặc biệt cách trình bày, văn phong còn nặng về văn dịch lủng củng chưa được trau chuốt.

PGS.TS. Bùi Thanh Tùng

Luận án này có tính cấp thiết, có ý nghĩa khoa học và có giá trị thực tiễn. Đề tài không có sự trùng lặp so với các công trình nghiên cứu trước đây trong và ngoài nước. Tên đề tài và nội dung là phù hợp; phù hợp với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

Câu hỏi 1: Theo kết quả của luận án trình bày hàm lượng hai axit này trong EtOAc là 11% và 10,27%, do đó, với liều 200 mg/kg của EtOAc thì có ít nhất khoảng 20 mg/kg của cả hai axit, thì tác dụng của phân đoạn EtOAc so với hai axit sẽ như thế nào, liệu cao hơn không?

Câu hỏi 2: Lý giải như thế nào để thấy EtOAc có tác dụng trên cải thiện trí nhớ và BuOH có tác dụng chống trầm cảm, và cao OS có cả hai tác dụng này với liều 400 mg/kg?

Câu hỏi 3: Liều sử dụng Hương nhu tía trên người theo dân gian là bao nhiêu? Từ kết quả thu được của luận án, thì liều sử dụng cao chiết dự kiến trên người sẽ là bao nhiêu? Cao chiết toàn phần hay cao phân đoạn sẽ được ưu tiên sử dụng cho hỗ trợ điều trị suy giảm trí nhớ, chống trầm cảm?

PGS.TS Nguyễn Trọng Thông

Đề tài nghiên cứu vừa có tính cấp thiết vừa ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

Kết quả nghiên cứu là những đóng góp mới, không trùng lặp với các luận văn, luận án đã công bố, phù hợp với mã số đào tạo Dược lý-Dược lâm sàng.

Một số góp ý cần chỉnh sửa và một số câu hỏi:

Tên thuốc không nên viết tắt, hiện trong luận án quá nhiều chữ viết tắt.

Tên hình 3.26. trang 96 viết sai tên hoạt chất: PCPA p-clophenylalanin không phải α-methyl-p-tyrosin?

Tại sao tác giả không xác định cơ chế tác dụng của acid oleanolic? Tác giả dự đoán acid oleanolic cơ chế tác dụng gì?

Tại sao nghiên cứu chống trầm cảm của phân đoạn n-butanol nghiên cứu sinh không dùng imipramin đường uống cho cũng 1 điều kiện nghiên cứu mà lại tiêm phúc mạc?

Trong nghiên cứu này kết quả nào của tác giả chứng minh sự thể hiện mối liên hệ mật thiết và thường song hành giữa suy giảm trí nhớ và trầm cảm?

4. Nhận xét/ đánh giá của các đại biểu dự bảo vệ (nếu có):

5. NCS giải trình và trả lời các câu hỏi của Hội đồng và đại biểu:

NCS đã giải trình chi tiết, đầy đủ được một số câu hỏi của các thành viên Hội đồng và tiếp thu các góp ý chỉnh sửa của Hội đồng.

6. Hội đồng họp bỏ phiếu nhận xét luận án tiến sĩ:

Kết quả được ghi trong Biên bản họp Ban kiểm phiếu của Hội đồng.

B. NGHỊ QUYẾT CỦA HỘI ĐỒNG

Sau khi thảo luận, Hội đồng đã nhất trí thông qua Nghị quyết của Hội đồng như sau:

1. Đánh giá chung của Hội đồng:

1.1.Tên đề tài luận án có phù hợp với nội dung và mã số chuyên ngành, có trùng lặp về tên đề tài và nội dung với các luận án đã bảo vệ hay không.

Đề tài và nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành Dược lý – Dược lâm sàng và không trùng lắp với những đề tài nghiên cứu, luận văn, luận án đã công bố ở Việt Nam.

1.2. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài.

Cung cấp một phương pháp luận khoa học tương đối đầy đủ và chặt chẽ trong nghiên cứu dược lý cây thuốc theo hướng điều trị bệnh lý rối loạn tâm thần – thần kinh với sự kết hợp logic các thực nghiệm đánh giá *in vitro, ex vivo* và *in vivo*.

Đóng góp thêm mô hình nghiên cứu *in vivo* về dược lý thần kinh có độ tin cậy khoa học:

- Nghiên cứu đã triển khai thành công cả hai mô hình chuột nhắt loại bỏ thùy khứu giác (được dùng để nghiên cứu bệnh lý suy giảm nhận thức, thoái hóa thần kinh và sàng lọc các chất chống trầm cảm tiềm năng) và mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước có cải tiến để áp dụng tại Việt Nam.
- Nghiên cứu đã đề xuất thêm công cụ hữu ích để đánh giá hành vi trong thử nghiệm bơi cưỡng bức là thời gian trèo và trong thử nghiệm môi trường mở là thời gian chải lông.

Trong luận án này, lần đầu tiên tác dụng dược lý hướng thần kinh cùng cơ chế tác động của hương nhu tía được nghiên cứu một cách có hệ thống và toàn diện, cung cấp nhiều kết quả có ý nghĩa khoa học cũng như có tính ứng dụng cao của hương nhu tía trong thực tiễn điều trị.

- Công bố về cơ chế tác dụng hướng thần kinh của cao chiết cồn toàn phần hương nhu tía: Với tác dụng cải thiện trí nhớ như tăng cường hệ cholinergic, 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. Với tác dụng chống trầm cảm cũng xác định cơ chế tương tự như cải thiện tình trạng giãn não thất bên, tăng sinh tế bào thần kinh mới hồi hải mã bên cạnh tác động tăng cường hệ dẫn truyền thần kinh monoamine.
- Xác định/dự đoán thành phần hợp chất đóng vai trò quan trọng đối với tác dụng hướng thần kinh của hương nhu tía, đặc biệt các hợp chất có trong phân đoạn ethyl acetat (acid ursolic và acid oleanolic).

1.3. Những kết quả nghiên cứu và kết quả mới NCS đạt được.

➢ Cao chiết cồn hương nhu tía 400 mg/kg/ngày và cao chiết phân đoạn ethyl acetat 200 và 400 mg/kg/ngày, đường uống có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ trên chuột bị loại bỏ thùy khứu giác (OBX) thông qua tác dụng 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 enzym 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 acid ursolic và acid oleanolic có hàm lượng cao nhất trong phân đoạn ethylacetat cũng có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ không gian ngắn hạn (mê lộ chữ Y cải tiến) và dài hạn (mê lộ nước Morris) trên mô hình chuột loại bỏ thùy khứu giác khi dùng đường uống. Tác dụng phụ thuộc liều. Acid ursolic có tác dụng rõ rệt ởl iều thấp cả 6 và 12mg/kg/ngày, trong khi acid oleanolic chỉ có tác dụng ở mức liều 24 mg/kg/ngày.

- Tác dụng cải thiện trí nhớ của acid ursolic thông qua tăng cường hệ cholinergic do ức chế hoạt động enzym 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 bị loại bỏ thùy khứu giác (OBX).
- Cao OS và cao chiết phân đoạn n-butanol (OS-B) liều 400 mg/kg/ngày, đường uống có tác dụng chống trầm cảm thể hiện 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 phá hủy thùy khứu giác.
- Tác dụng chống trầm cảm của cao chiết phân đoan n-butanol (OS-B) phụ thuộc liều trên chuột bị stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS).
- Cơ chế tác dụng chống trầm cảm của phân đoạn butanol trên chuột UCMS có thể do thông qua tác động lên hệ monoaminergic.

1.4. Phương pháp nghiên cứu, độ tin cậy của phương pháp.

Đề tài được thực hiện với những phương pháp thường quy về hóa thực vật (chiết xuất cao tổng, cao phân đoạn) và dược lý thực nghiệm nên có độ tin cậy khoa học. Các nghiên cứu dược lý được thực hiện phối hợp các khảo sát *in vitro, ex vivo* và *in vivo* trên chuột. Các mô hình thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu được triển khai trong luận án có tính hiện đại và tính mới.

1.5. Công bố kết quả nghiên cứu

Kết quả được công bố trên 4 bài báo trên tạp chí có uy tín phản ánh trung thành những nội dung chính trong luận án toàn văn. Các công bố trên các tạp chí trong nước (Journal of Medicinal Materials; Vietnam Journal Science, Technology and Engineering) đều được biên tập bằng tiếng Anh và là những tạp chí chuyên ngành có uy tín khoa học.

Đánh giá về các tạp chí ngoài nước mà tác giả đã đăng bài là các tạp chí chuyên ngành có uy tín khoa học, cụ thể:

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: H index = 100, IF = 2.61 (2021-2022), SCImago Journal Rank (SJR) = 0.461.

Journal of Natural Medicines: H index = 50, IF = 3.18 (2021-2022), SCImago Journal Rank (SJR) = 0.588.

1.6. Bản tóm tắt của luận án phản ánh đầy đủ, trung thực những kết quả nghiên cứu của luận án chính. Kết quả nghiên cứu trình bày trong luận án phản ánh trung thực các kết quả nghiên cứu thực nghiệm.

1.7. Những thiếu sót của luận án về nội dung và hình thức.

Luận án còn một số lỗi về Hình thức-Trình bày, một số từ Viết tắt chưa chính xác, tổng quan còn dài, tài liệu tham khảo chưa được cập nhật. Về Phương pháp nghiên cứu cần mô tả chi tiết hơn, về Phần Kết quả trong luận án cần trình bày theo bảng số liệu để thể hiện được kết quả nghiên cứu chính xác hơn; Phần Bàn luận cần sát hơn vào các nội dung nghiên cứu.

2. Kết luận của Hội đồng:

2.1. Mức độ đáp ứng yêu cầu của luận án tiến sĩ về cả nội dung và hình thức theo quy định.

Hội đồng đánh giá luận án có giá trị khoa học và thực tiễn. Các kết quả nghiên cứu trong luận án đáp ứng đầy đủ cả nội dung và hình thức theo quy định của 1 luận án tiến sĩ Dược học chuyên ngành Dược lý - Dược lâm sàng.

2.2. Những điểm cần bổ sung, sửa chữa (nếu có) trước khi nộp luận án cho Thư viện Quốc gia Việt Nam.

Hội đồng yêu cầu NCS bổ sung và sửa chữa một số điểm theo sự góp ý của các phản biện và các ủy viên Hội đồng đã ghi trong biên bản trước khi nộp luận án cho cơ quan lưu trữ (xem chi tiết trong các nhận xét của các thầy cô trong Hội đồng).

Căn cứ kết quả đánh giá của Hội đồng do Ban kiểm phiếu báo cáo, kết quả bỏ phiếu đánh giá luận án của Hội đồng cấp Viện như sau:

- Số phiếu đánh giá đạt/ Tổng số phiếu phát ra: 7/7 phiếu.
- Số phiếu không đạt (kể cả bỏ phiếu trắng): 0/7 phiếu.

Hội đồng thống nhất đề nghị ông Viện trưởng Viện Dược liệu công nhận học vị và cấp bằng Tiến sĩ Dược học cho NCS Nguyễn Thu Hiền.

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG	**CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG**
PGS. TS. Bùi Thanh Tùng	**PGS.TS. Nguyễn Trọng Thông**

VIỆN TRƯỞNG

VIỆN DƯỢC LIỆU

Nguyễn Minh Khởi

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHIÃ VIỆT NAM

Độc lập- Tự do- Hạnh phúc

NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SỸ DƯỢC HỌC CẤP VIỆN

- Tên 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**"
- Chuyên ngành: DƯỢC LÝ- DƯỢC LÂM SÀNG Mã số: 9720205
- Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thu Hiền
- Người hướng dẫn khoa học:

PGS. TSKH Nguyễn Minh Khởi

TS. Lê Thị Xoan

- Người nhận xét: PGS.TS. Nguyễn Trọng Thông

Đại học Y Hà Nội

- Chức trách trong Hội đồng: Chủ tịch Hội đồng

1.Tính cấp thiết, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án:

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 là một trong những mối quan tâm về sức khỏe toàn cầu của thế kỷ 21. 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 tìm các dược liệu có tác dụng cải thiện tình trạng suy giảm trí nhớ, chống trầm cảm đang được rất nhiều nhà khoa họctrong 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 thành phần hóa học và tác dụng cải thiện trí nhớ, chống trầm cảm và giải lo âu của các cao chiết toàn phần hương nhu tía. Tuy nhiên, nghiên cứu hiểu biết về cơ chế tác dụng

cải thiện trí nhớ, chống trầm cảm của cao chiết hương nhu tía còn rất hạn chế. Do vậy đề tài luận án: "**Nghiên cứu tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ và chống trầm cảm của Hương nhu tía (*Ocimumsanctum* L.) trên thực nghiệm**" đã được tiến hành với 2 mục tiêu nghiên cứu rõ ràng, có khả năng thực thi, phù hợp với tên đề tài, nội dung nghiên cứu và mã số chuyên ngành đào tạo nhằm bổ sung thêm cơ sở dữ liệu hóa học và cung cấp thêm các bằng chứng khoa học về tác dụng dược lý cho việc sử dụng của người dân của loài *Sanchezia nobilis* Hook.f. Do vậy, đề tài nghiên cứu vừa có tính cấp thiết vừa ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

2. *Nội dung và những đóng góp mới của luận án:*

Để thực hiện 2 mục tiêu nghiên cứu của đề tài nghiên cứu sinh đã thực hiện nghiên cứu về tác dụng cải thiện trí nhớ, tác dụng chống trầm cảm và cơ chế tác dụng của cao toàn phần, cao phân đoạn và 1 số chất tinh khiết chiết xuất từ hương nhu tía.

Các phương pháp nghiên cứu vừa kinh điển vừa hiện đại được thiết kế chặt chẽ, thực hiện ở cơ sở đào tạo và nghiên cứu trong nước và ngoài nước có uy tín nên số liệu thu được rất đáng tin cậy.

❖ Kết quả nghiên cứu là những đóng góp mới, không trùng lặp với các luận văn, luận án đã công bố, phù hợp với mã số đào tạo Dược lý - Dược lâm sàng.

Kết quả cho thấy:

➢ Cao chiết cồn hương nhu tía 400 mg/kg/ngày và cao chiết phân đoạn ethyl acetat 200 và 400 mg/kg/ngày, ***đường uống có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ trên chuột bị loại bỏ thùy khứu giác (OBX)*** thông qua tác dụng 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 enzym 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 acid ursolic và acid oleanolic có hàm lượng cao nhất trong phân đoạn ethylacetat cũng có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ không

gian ngắn hạn (mê lộ chữ Y cải tiến) và dài hạn (mê lộ nước Morris) trên mô hình chuột loại bỏ thùy khứu giác khi dùng đường uống. Tác dụng phụ thuộc liều. Acid ursolic có tác dụng rõ rệt ở liều thấp cả 6 và 12mg/kg/ngày, trong khi acid oleanolic chỉ có tác dụng ở mức liều 24mg/kg/ngày.

- Tác dụng cải thiện trí nhớ của acid ursolic thông qua tăng cường hệ cholinergic do ức chế hoạt động enzym 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 bị loại bỏ thùy khứu giác (OBX).

Cao OS và cao chiết phân đoạn n-butanol (OS-B) liều 400 mg/kg/ngày, đường uống có tác dụng chống trầm cảm thể hiện 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 phá hủy thùy khứu giác.

Tác dụng chống trầm cảm của cao chiết phân đoạn n-butanol(OS-B) phụ thuộc liều trên chuột bị stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS). Liều 100 mg/kg/ngày 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 thử nghiệm tiêu thụ saccharose, trong thử nghiệm bơi cưỡng bức và tăng hành vi trốn thoát có định hướng trong thử nghiệm bơi cưỡng bức nhưng không gây ảnh hưởng đến vận động tự nhiên của chuột trong OFT, làm giảm các biểu hiện trầm cảm trên chuột UCMS một cách rõ rệt. Liều 100 mg/kg/ngày tương đương imipramin liều 8,0 mg/kg/ngày, tiêm phúc mạc.

Cơ chế tác dụng chống trầm cảm của phân đoạn butanol trên chuột UCMS có thể do thông qua tác động lên hệ monoaminergic, vì thời gian bất động ở chuột dùng phân đoạn n-butanol 100 mg/kg, uống hoặc imipramin 8 mg/kg, IP không bị ảnh hưởng bởi α - methyl - p - tyrosin 100 mg/kg, IP, 1 chất ức chế tyrosin hydroxylase và phenylalanin chất ức chế tryptophan hydroxylase (thời gian bất động giống nhau giữa 3 lô thử nghiệm tăng rõ rệt so với chứng sinh lý).

3. Cấu trúc luận án:

Luận án gồm 133 trang, bao gồm: Đặt vấn đề (02 trang); Chương 1. Tổng quan (35 trang) có nội dung thiết thực và cập nhật đến vấn đề nghiên cứu; Chương 2. Nguyên liệu, phương tiện và phương pháp nghiên cứu (25 trang); Chương 3. Kết quả nghiên cứu (35 trang); Chương 4. Bàn luận (33 trang) lý giải tốt các kết quả nghiên cứu; Kết luận (02 trang) đã trả lời thoả đáng 2 câu hỏi mà mục tiêu nghiên cứu đặt ra và đề xuất (01 trang).

Luận án có 263 tài liệu tham khảo trong đó có 08 tài liệu tiếng Việt và 255 tài liệu tiếng Anh. Luận án có 05 bảng, 47 hình và 03 phụ lục kèm theo. Luận án được viết với văn phong rõ ràng, it lỗi in ấn với cấu trúc đúng quy định của BGD - ĐT.

4. ***Thông tin về kết quả luận án***: Kết quả nghiên cứu của luận án được công bố trên 4 bài báo trên các Tạp chí có uy tín với số liệu trung thành trong luận án toàn văn.

5. Bản tóm tắt luận án có đầy đủ chương mục theo quy định với nội dung phản ánh trung thành trong luận án toàn văn.

6. Góp ý và *câu hỏi*:

- ❖ Tên thuốc không nên viết tắt, hiện trong luận án quá nhiều chữ viết tắt.
- ❖ Tên hình 3.26. trang 96 viết sai tên hoạt chất: PCPA p- clophenylalanin không phải α- methyl-p-tyrosin?
- ❖ Tại sao tác giả không xác định cơ chế tác dụng của acid oleanolic? Tác giả dự đoán acid oleanolic cơ chế tác dụng gì?
- ❖ Tại sao nghiên cứu chống trầm cảm của phân đoạn n-butanol nghiên cứu sinh không dùng imipramin đường uống cho cũng 1 điều kiện nghiên cứu mà lại tiêm phúc mạc?
- ❖ Trong nghiên cứu này kết quả nào của tác giả chứng minh sự thể hiện mối liên hệ mật thiết và thường song hành giữa suy giảm trí nhớ và trầm cảm?

7. Kết luận:

Luận án của NCS NGUYỄN THU HIỀN về đề tài: "**Nghiên cứu tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ và chống trầm cảm của Hương nhu tía (*Ocimum***

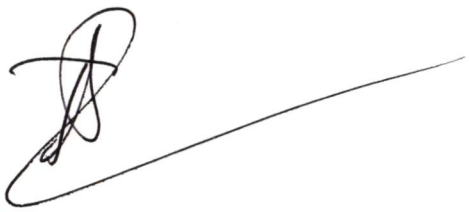
***sanctum* L.) trên thực nghiệm**"có nội dung nghiên cứu và mã số phù hợp với chuyên ngành đào tạo vừa có tính cấp thiết vừa có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

- Kết cấu luận án đúng quy định của bộ GD - ĐT.
- Kết quả nghiên cứu của luận án là những đóng góp mới, không trùng lặp với luận văn, luận án đã công bố.
- Kết luận đã trả lời thỏa đáng các câu hỏi mà mục tiêu luận án đã đặt ra.
- Kết quả được công bố trên 4 bài báo trên tạp chí có uy tín phản ánh trung thành những nội dung chính trong luận án toàn văn.

Luận án của Nghiên cứu sinh NGUYỄN THU HIỀN đáp ứng đầy đủ tiêu chuẩn của luận án Tiến sỹ Dược học cả về hình thức lẫn nội dung. Tôi đề nghị Hội đồng thông qua để Nghiên cứu sinh nhận học vị Tiến sỹ Dược học chuyên ngành Dược Lý - Dược lâm sàng.

Hà Nội, ngày 10 tháng 10 năm 2022

Người nhận xét



PGS.TS.Nguyễn Trọng Thông

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Đề tài: 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

Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thu Hiền

Người viết nhận xét: Phạm Thị Vân Anh Học vị: PGS. Tiến sỹ y học

Đơn vị công tác của người viết nhận xét: Trường Đại học Y Hà Nội

Chức danh hội đồng: Phản biện 1

I. NỘI DUNG NHẬN XÉT:

1. Sự phù hợp giữa nội dung nghiên cứu và tên luận án, mã số của chuyên ngành đào tạo:

Các bệnh lý về tâm thần như: sa sút trí tuệ, rối loạn cảm xúc, đặc biệt trầm cảm là những bệnh lý thường gặp nhất của chuyên ngành Tâm thần. Ngày nay bệnh lý này ngày càng gặp nhiều do tuổi thọ cao và áp lực cuộc sống.

Hội chứng sa sút trí tuệ và trầm cảm có mối liên quan và trong một số trường hợp có thể gặp đồng thời trên bệnh nhân. Các thuốc hóa dược điều trị chứng mất trí nhớ và trầm cảm có nhiều tác dụng không mong muốn, tương tác thuốc nghiêm trọng, trong khi bệnh nhân sa sút trí tuệ thường là người cao tuổi, nhiều bệnh nền nên việc sử dụng nhiều thuốc không thể tránh khỏi. 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 lâu đời trong y học cổ truyền Ấn Độ và các nước Đông Nam Á, Hương nhu tía tác dụng giúp cơ thể cân bằng và thích nghi với stress. Hơn nữa, hương nhu tía là nguồn dược liệu rẻ tiền, sẵn có tại 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. Các nghiên cứu còn ít và chủ yếu thực hiện trên các cao chiết toàn phần. Nghiên cứu này đánh giá sâu về cơ chế tác dụng ở mức tế bào và một phần cơ chế dưới tế bào. Vì vậy, đề tài có tính khoa học, cấp thiết và giá trị thực tiễn cao, đặc biệt phát triển nguồn dược liệu sẵn có tại Việt Nam.

2. Sự trùng lặp của đề tài:

Tại Việt Nam: không trùng lặp với các nghiên cứu khác.

Trên thế giới: không trùng lặp.

3. Độ tin cậy của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu:

Mục tiêu của luận án:

Hai mục tiêu nghiên cứu khả thi, phủ tên đề tài

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).

Để thực hiện 2 mục tiêu trên luận án đã thực hiện các nội dung công việc rất phù hợp gồm:

- Chuẩn hóa dược liệu nghiên cứu:

Chất liệu nghiên cứu là phần trên mặt đất của cây Hương nhu tía nêu rõ định danh tên khoa học, nơi thu hái, thời gian thu hái, qui trình chiết xuất cao toàn phần và phân đoạn. Đảm bảo tính thống nhất và tin cậy trong đánh giá.

- Các mẫu nghiên cứu:

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

- Sử dụng các mô hình dược lý: phù hợp, hiện đại

Mô hình chuột bị loại bỏ thùy khứu giác: để nghiên cứu tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ và chống trầm cảm của hương nhu tía.

Mô hình chuột bị gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước để nghiên cứu tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của cao phân đoạn hương nhu tía. Quá trình chuột bị gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước 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.

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); thử nghiệm môi trường mở (vận động tự nhiên và hành vi giảm hứng thú).

Nghiên cứu cơ chế tác dụng

- 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 của tế bào thần kinh mới sinh và chỉ dấu cholin acetyltransferase 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 và thụ thể VEGF-2 trong hồi hải mã chuột; dùng kỹ thuật Western blotting để đánh giá biểu hiện protein của yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu và cholin acetyltransferase trong hồi hải mã chuột; Xác định hoạt độ enzym acetylcholinesterase 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.

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 tía 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 chuột bị gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước , các lô chuột được tiêm phúc mạc α-methyl-ρ-tyrosin (100 mg/kg, 1 lần duy nhất) hoặc DL-ρ-chlorophenyl alanin (80 mg/kg/ngày, 4 ngày liên tiếp) tương ứng, sau đó tiến hành thử nghiệm treo đuôi.

Nhận xét chung: Các chỉ tiêu theo dõi và đánh giá: hợp lý, đầy đủ, logic và hiện đại. Đảm bảo tính khoa học và tin cậy trong các nghiên cứu.

4. **Những kết quả nghiên cứu mới, đóng góp mới và ưu điểm của luận án:**

Đóng góp mới của luận án:

Dược liệu hương nhu tía, một dược liệu sẵn có, đã được trồng rộng rãi tại Việt Nam. Đề tài được tiếp cận theo hướng dược lý thực nghiệm một cách có hệ thống và toàn diện, thu được nhiều kết quả có ý nghĩa khoa học và có tính thực tiễn.

Về kết quả của đề tài: đáp ứng 2 mục tiêu

- Tác dụng cải thiện trí nhớ

Cao chiết cồn hương nhu tía 400 mg/kg/ngày, đường uống và cao chiết phân đoạn ethyl acetat 200 và 400 mg/kg/ngày, đường uống có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ làm việc trên chuột bị loại bỏ thùy khứu giác .

- *Một số cơ chế tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ*: 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 (tăng số lượng tế bào dương tính với ChAT vùng vách giữa và ức chế hoạt độ enzym acetylcholinesterase ở vỏ não *ex vivo*), ngăn chặn sự suy giảm biểu hiện gen và protein VEGF vùng hồi hải mã trên chuột bị loại bỏ thùy khứu giác .

- *Hai chất tinh khiết có hàm lượng cao nhất trong OS-E* là acid ursolic và acid oleanolic có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ không gian ngắn hạn và dài hạn trên mô hình chuột bị loại bỏ thùy khứu giác. acid ursolic có tác dụng rõ rệt ở liều 6 và 12 mg/kg/ngày, đường uống, Acid oleanolic 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 (ức chế hoạt động enzym acetylcholinesterase vỏ não và cải thiện sự suy giảm mức độ biểu hiện protein ChAT vùng hồi hải mã), tăng cường biểu hiện protein yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu trong hồi hải mã của chuột bị loại bỏ thùy khứu giác .

Tác dụng chống trầm cảm

- Cao toàn phần và cao chiết phân đoạn n-butanol liều 400 mg/kg/ngày, đường uống có tác dụng giảm hành vi tuyệt vọng trong thử nghiệm treo đuôi và tăng hành vi trốn thoát có định hướng trong thử nghiệm bơi cưỡng bức trên chuột bị loại bỏ thùy khứu giác.

- Cao cao chiết phân đoạn n-butanol (50 và 100 mg/kg/ngày, đường uống) có tác dụng chống trầm cảm. OS-B liều 100 mg/kg/ngày làm giảm các biểu hiện trầm cảm trên chuột chuột bị gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước một cách rõ rệt, cải thiện hành vi giảm hứng thú gồm: giảm đáp ứng với phần thưởng trong thử nghiệm tiêu thụ saccharose và giảm hành vi chải lông trong thử nghiệm môi trường mở, giảm hành vi tuyệt vọng trong thử nghiệm treo đuôi, thử nghiêm bơi cưỡng bức và tăng hành vi trốn thoát có định hướng trong thử nghiêm bơi cưỡng bức, không gây ảnh hưởng đến vận động tự nhiên của chuột trong OFT.

- ***Cơ chế tác dụng chống trầm cảm của OS-B trên chuột chuột bị gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước***

Thông qua tác động lên hệ monoaminergic, cụ thể là hệ serotonergic, noradrenergic và dopaminergic.

Một số ưu điểm khác của luận án:

- Bố cục luận án tương đối cân đối.

-Tổng quan viết tốt và tương đối đầy đủ để phục vụ cho 2 mục tiêu của đề tài

- Viết tốt, ít sai chính tả, văn phong mạch lạc.

- Bàn luận đạt yêu cầu, bám sát kết quả nghiên cứu trên thế giới

- Các phụ lục nghiên cứu đầy đủ, rõ ràng.

- Tài liệu tham khảo đầy đủ, trích dẫn khá đầy đủ, chính xác.

5. Ý kiến đóng góp cho luận án

- Không nên viết tắt các thuật ngữ chuyên môn. Gây khó theo dõi

- Tổng quan dài tuy nhiên mối liên quan giữa sa sút trí tuệ và trầm cảm theo y học hiện đại trong các nhóm thuốc điều trị chưa được phân tchs và hệ thống.

- Tài liệu tham khảo chưa được cập nhật (Tỷ lệ trong 5 năm gần đây thấp), trích dẫn còn chưa hết.

- Đánh giá hoạt động của chuột gồm hoạt động ngang, dọc do máy tự động ghi lại bằng hệ thống cảm ứng hồng ngoại, lồng chuột cống hay nhắt sẽ khác nhau. Tại sao trong phần phương pháp mô tả cần camera và người đánh giá? Hơn nữa thông số này rất nhiễu vì hoạt động của chuột phụ thuộc sáng hay tối, phòng yên tĩnh hay không, thời nào. Vậy làm thế nào để khắc phục các yếu tố nhiễu này?

- Các phần thiết bị tự chế như Morris, Tmaze, mê lộ chữ Y, thanh treo chuột, bể nước hình trụ cần bổ sung kích thước và tài liệu tham khảo ở tr40. Vì nếu không đúng kích cỡ và thiết kế sẽ không đảm bảo đánh giá được trí nhớ không gian, thời gian, cũng như không gây được stress.

- Thời gian 6 tuần đã đảm bảo được gây ra trầm cảm và rối loạn hành vi cho chuột chưa? Các nghiên cứu trên thế giới công bố thường 12 tuần?

- Đã có nhóm thuốc hóa dược hoặc dược liệu nào được cấp phép cho chỉ định xa sút trí tuệ và chống trầm cảm chưa?

6. Đăng báo và tóm tắt luận án:

Đăng 04 bài báo phủ 2 mục tiêu nghiên cứu.

Tóm tắt luận án đạt yêu cầu.

II. KẾT LUẬN:

Công trình nghiên cứu công phu, nghiêm túc, khối lượng công việc lớn, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

Đáp ứng yêu cầu luận án tiến sỹ dược học cả nội dung và hình thức.

Luận án có thể đưa ra bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện để nhận học vị tiến sỹ Dược học.

Hà Nội, ngày 11 tháng 10 năm 2022

Người nhận xét

PGS. TS. Phạm Thị Vân Anh

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

(Dùng cho tất cả các thành viên trong Hội đồng cấp Viện)

Họ và tên người viết nhận xét: PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Hương

Đơn vị công tác: Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

Chức trách/nhiệm vụ trong Hội đồng: Phản biện 2

Số điện thoại liên lạc: 0908271305

Họ và tên Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thu Hiền

Tên đề tài: "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

NỘI DUNG BẢN NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết/cần thiết ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn của đề tài luận án

Bệnh Alzheimer là nguyên nhân hàng đầu gây nên tình trạng sa sút trí tuệ, ảnh hưởng đến suy nghĩ và hành vi của con người. Đây là một căn bệnh rất phức tạp và chưa thể ngăn chặn sự tiến triển hay điều trị khỏi hoàn toàn bằng việc dùng thuốc hoặc biện pháp can thiệp nào khác. Ngoài ra, các sang chấn tâm lý xuất phát từ stress kéo dài là nguyên nhân thường gặp dẫn đến bệnh lý trầm cảm. Trầm cảm cũng là rối loạn bệnh lý có liên quan đến tình trạng mất trí nhớ ngắn hạn và khá phổ biến ở người cao tuổi bị sa sút trí tuệ. Việc sử dụng liệu pháp điều trị tích hợp vừa cải thiện suy giảm nhận thức đồng thời với chống trầm cảm là cần thiết trên thực tế lâm sàng. Do đó, nghiên cứu tìm các liệu pháp dự phòng hoặc hỗ trợ điều trị dựa trên nền tảng nguồn nguyên liệu từ tự nhiên có cả hai tác dụng tiềm năng là cải thiện trí nhớ và chống trầm cảm đang là xu hướng chung và cũng là mục tiêu tổng quát của đề tài.

Gần đây, tác dụng bảo vệ thần kinh và cải thiện trí nhớ của hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L. hoặc *Ocimum tenuiflorum* L.) đã được tập trung nghiên cứu và đã bước đầu được chứng minh thông qua các cơ chế như: chống stress oxy hóa tế bào

thần kinh, tăng cường hoạt động của hệ thần kinh trung ương, điều chỉnh các rối loạn chức năng nhận thức, ức chế hoạt động của acetylcholinesterase, tăng cường hoạt động của cholin acetyltransferase. Tuy nhiên, hiện tại ở trong nước cũng như trên thế giới, chưa có nghiên cứu nào đánh giá toàn diện cơ chế tác dụng đồng thời phân đoạn cao chiết tiềm năng và các thành phần hoạt chất chính nào sẽ đóng góp vào tác dụng bảo vệ thần kinh, cải thiện trí nhớ và chống trầm cảm của hương nhu tía. Mục tiêu nghiên cứu cụ thể và các nội dung nghiên cứu được triển khai trong luận án đã góp phần làm sáng tỏ câu hỏi nghiên cứu này. Các kết quả của luận án đã cung cấp những minh chứng khoa học, góp phần tạo cơ sở cho việc phát triển sản phẩm từ cây hương nhu tía, một dược liệu sẵn có, đã được trồng rộng rãi và khai thác theo tiêu chuẩn của Việt Nam, trong dự phòng và điều trị sa sút trí tuệ và bệnh trầm cảm.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình nghiên cứu ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Nội dung luận án không trùng lặp với các công trình công bố trong và ngoài nước. Các luận điểm khoa học được trình bày dựa trên trích dẫn 263 tài liệu tham khảo rõ ràng và đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Các nội dung nghiên cứu phù hợp với tên luận án và mã số chuyên ngành.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại (hoặc thích hợp) của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Đề tài được thực hiện với những phương pháp thường quy về hóa thực vật (chiết xuất cao tổng, cao phân đoạn) và dược lý thực nghiệm nên có độ tin cậy khoa học. Các nghiên cứu dược lý được thực hiện phối hợp các khảo sát *in vitro, ex vivo* và *in vivo* trên chuột. Các mô hình thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu được triển khai trong luận án có tính hiện đại và tính mới (phục vụ cho nghiên cứu trong nước), như:

- Mô hình chuột bị loại bỏ thùy khứu giác (OBX).
- Mô hình chuột bị gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS).

- Phương pháp nghiên cứu mô học: Nhuộm hóa mô miễn dịch với chỉ dấu protein doublecortin (DCX) của tế bào thần kinh tân tạo và chỉ dấu cholin acetyltransferase (ChAT) của tế bào cholinergic.
- Phương pháp nghiên cứu hóa thần kinh: Áp dụng 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 (VEGF-R2) trong hồi hải mã chuột; dùng kỹ thuật Western blot 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 enzym acetylcholinesterase (AChE) trong vỏ não chuột *ex vivo*.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu có độ lập lại, được phân tích thống kê so sánh với chứng âm (không điều trị) và chứng dương (điều trị bằng thuốc đối chiếu) nên các kết luận có độ tin cậy khoa học. Đề tài có những đóng góp mới như sau:

- Cung cấp một phương pháp luận khoa học tương đối đầy đủ và chặt chẽ trong nghiên cứu dược lý cây thuốc theo hướng điều trị bệnh lý rối loạn tâm thần – thần kinh với sự kết hợp logic các thực nghiệm đánh giá *in vitro, ex vivo* và *in vivo*.
- Đóng góp thêm mô hình nghiên cứu *in vivo* về dược lý thần kinh có độ tin cậy khoa học:
    - Nghiên cứu đã triển khai thành công cả hai mô hình chuột nhắt loại bỏ thùy khứu giác (được dùng để nghiên cứu bệnh lý suy giảm nhận thức, thoái hóa thần kinh và sàng lọc các chất chống trầm cảm tiềm năng) và mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước có cải tiến để áp dụng tại Việt Nam. Đây là các mô hình thực nghiệm có giá trị dự đoán do tương đồng về cấu tạo bệnh, hành vi và đặc điểm sinh lý bệnh lâm sàng.
    - Nghiên cứu đã đề xuất thêm công cụ hữu ích để đánh giá hành vi trong thử nghiệm bơi cưỡng bức là thời gian trèo và trong thử nghiệm môi trường mở là thời gian chải lông.

- Trong luận án này, lần đầu tiên tác dụng dược lý hướng thần kinh cùng cơ chế tác động của hương nhu tía được nghiên cứu một cách có hệ thống và toàn diện, cung cấp nhiều kết quả có ý nghĩa khoa học cũng như có tính ứng dụng cao của hương nhu tía trong thực tiễn điều trị.
    - Công bố về cơ chế tác dụng hướng thần kinh của cao chiết cồn toàn phần hương nhu tía: Với tác dụng cải thiện trí nhớ như tăng cường hệ cholinergic, 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. Với tác dụng chống trầm cảm cũng xác định cơ chế tương tự như cải thiện tình trạng giãn não thất bên, tăng sinh tế bào thần kinh mới hồi hải mã bên cạnh tác động tăng cường hệ dẫn truyền thần kinh monoamine (cụ thể là các hệ serotonin, hệ giao cảm và hệ dopamin).
    - Xác định/dự đoán thành phần hợp chất đóng vai trò quan trọng đối với tác dụng hướng thần kinh của hương nhu tía, đặc biệt các hợp chất có trong phân đoạn ethyl acetat (đã xác định là biomarker: acid ursolic và acid oleanolic). Những biomarker này cũng sẽ góp phần trong việc tiêu chuẩn hóa nguyên liệu và cao chiết trong phát triển sản phẩm hỗ trợ dự phòng và điều trị sa sút trí tuệ và/hoặc trầm cảm sau này.

6. Ưu nhược điểm về nội dung, kết cấu, hình thức của luận án

6.1. Ưu-nhược điểm:

Về kết cấu: Luận án gồm 133 trang, bao gồm: Đặt vấn đề (02 trang); Chương 1. Tổng quan (35 trang); Chương 2. Nguyên liệu, Phương tiện và Phương pháp nghiên cứu (25 trang); Chương 3. Kết quả nghiên cứu (35 trang); Chương 4. Bàn luận (33 trang); Kết luận (02 trang) và Đề xuất (01 trang). Luận án có 25 trang tài liệu tham khảo gồm 263 tài liệu (8 tài liệu tiếng việt và 255 tài liệu tiếng Anh). Luận án có 05 bảng, 47 hình và 03 phụ lục kèm theo thể hiện các kết quả thực nghiệm. Bài viết ít lỗi đánh máy, hình ảnh/bảng/biểu đồ/sơ đồ được format rõ ràng và đẹp.

Tóm lại, luận án có cấu trúc phù hợp, format đúng theo quy chế hướng dẫn với phần tổng quan tài liệu được trình bày chi tiết, tương đối đầy đủ; phần phương pháp và kết quả được trình bày logic, phù hợp với nội dung nghiên cứu, có dung lượng các kết quả nhiều, có phân tích/biện giải và so sánh thống kê. Các kết quả có tính mới

được bàn luận sâu theo hướng phát triển nghiên cứu. Tuy nhiên việc trích dẫn tài liệu được cập nhật trong vòng 5 năm gần đây chiếm tỷ lệ thấp 25,1% (có 66/263 tài liệu).

Bản Tóm tắt phản ảnh ngắn gọn các nội dung chính của luận án, tuy nhiên phần tổng quan về đối tượng nghiên cứu là hương nhu tía liên quan đến hướng nghiên cứu còn quá ít.

6.2. Một số góp ý:

Về hình thức-Trình bày:

- Sửa cho đúng: fractionated extracts (Danh mục chữ viết tắt).
- Nên bỏ từ "enzyme" khi trình bày vì tiếp vĩ ngữ -ase đã mang ý nghĩa enzyme (acetylcholinesterase).
- Thống nhất thuật ngữ "bệnh đái tháo đường" (thay cho bệnh tiểu đường).
- In nghiêng: *in vivo* (trang 6).
- Tránh sử dụng từ "giết chuột" nên thay bằng "Chuột được hy sinh" (sacrified).

Về Nội dung:

- Bổ sung Danh mục chữ viết tắt hoặc diễn giải ngay trong đoạn văn (nếu chỉ xuất hiện 1 lần).
- Chương Tổng quan:
    - Tác giả nên đề cập vài dòng đến butyrylcholinesterase (BuChE) cũng là một mục tiêu trong điều trị bệnh lý thoái hóa tế bào thần kinh và là biomarker trong bệnh Alzheimer (AD). BuChE có vai trò trong tín hiệu cholinergic, thủy giải acetylcholin và bù trừ khi có sự giảm acetylcholinesterase. Biểu hiện và hoạt động của BuChE tăng trong các vùng não liên quan đến bệnh AD. Những chất ức chế BuChE (BChE inhibitors) đang được nghiên cứu như là ứng viên tiềm năng trong điều trị AD [*Tham khảo: Agneta Nordberg et al., A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease, Prim Care Companion CNS Disord. 2013; 15(2): PCC.12r01412*].
    - Nên đề cập mối liên quan giữa stress oxy hóa do gốc tự do với bệnh AD. Đây cũng là nền tảng lý thuyết cho bàn luận về cơ chế tác động của hương nhu tía trước tổn thương oxy hóa tế bào thần kinh.
    - Trang 10-dòng 3↓: Nên bỏ ý "…việc dùng thảo dược như một liệu pháp đơn trị liệu…" vì thường việc sử dụng là hỗ trợ/phối hợp.

- Đầu trang 14: …thiếu hụt các monoamine (serotonin, norepinephrine, dopamin)…
- Trang 15-dòng 3↓: Ghi cho đúng trình tự trục vùng dưới đồi-tuyến yên-tuyến thượng thận.

- Chương Nguyên liệu, Phương tiện và Phương pháp nghiên cứu:
  - Mục 2.1.2: Cần bổ sung phái tính chuột thử nghiệm.
  - Xem lại tính thống nhất trong phương pháp tạo cao khô phân đoạn ở bản Tóm tắt và sơ đồ 2.2-trang 43 (cô quay dưới áp suất giảm) và trong luận án (cô chân không- mục 22.2.2.-trang 41). Cuối trang 41 chưa đúng trình tự ý: "Dịch chiết gộp được lọc và cô đặc ở 50°C trong chân không, *thu được 2 lít dịch chiết* (?)"
  - Trang 44: Cần chi tiết tiêu chuẩn loại trừ những con chuột có thùy khứu giác bị lấy đi dưới 70%.
  - Mục 2.2.3.2: Cần bổ sung sơ đồ thiết kế nghiên cứu phối hợp các tác nhân để gây stress nhẹ trường diễn không đoán trước.
  - Trang 50-mục Thử nghiệm bơi cưỡng bức (FST) về nhiệt độ nước 20 ± 1 °C là hơi thấp và có thể ảnh hưởng đến hành vi. Nên duy trì tối thiểu là ở nhiệt độ phòng 25 ± 1 °C.
  - Cần nêu biện pháp kiểm soát sai số trong phân lập các vùng não chuột (vỏ não, hồi hải mã) cho các thử nghiệm khảo sát cơ chế tác động.
- Chương Kết quả nghiên cứu:
  - Hình 3.5A-trang 70: Chưa thấy có sự khác biệt giữa số lượng tế bào dương tính với ChAt (có màu nâu) giữa chứng sinh lý và chứng bệnh OBX.
  - Tác giả có khảo sát tác dụng của cao tổng OS trên mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước có cải tiến? Kết quả biểu thị ở mục 3.2.2-trang 89-97 là tác dụng và cơ chế tác động của cao phân đoạn n-BuOH trên mô hình này.
- Chương Bàn luận:
  - Cần bàn luận về cơ chế bảo vệ tế bào thần kinh trước tổn thương oxy hóa (gây thoái hóa tế bào thần kinh) của các hợp chất phenol tổng và flanonoid trong thành phần hóa học cao phân đoạn OS-E (luteolin, apigenin và luteolin-7-*O*-β-D-glucuronid).

- Hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của acid ursolic (IC_{50} = 106,5 μM) thấp hơn nhiều so với donepezil (IC_{50} = 8,23 μM) (trang 85). Tuy nhiên acid ursolic (6-12 mg/kg) thể hiện tác dụng ức chế AChE trong vỏ não (*ex vivo*) tương đương với donepezil (trang 82). Tác giả cho bàn luận thêm về điều này (Do chất chuyển hóa có hoạt tính của acid ursolic trong *in vivo*?).
- Giải trình tính chưa nhất quán trong lựa chọn liều khảo sát của OS-B ở các mô hình OBX (liều OS-B 400 mg/kg) và mô hình UCMS (liều OS-B là 50-100 mg/kg).
- Kết quả phân tích các thành phần hợp chất chính đều cho thấy hàm lượng vượt trội trong cao phân đoạn ethyl acetat (OS-E). Tuy nhiên tác dụng chống trầm cảm của cao phân đoạn n-BuOH (OS-B) lại thể hiện điển hình hơn cao OS-E. Do đó, tác giả bàn luận vai trò của các hợp chất luteolin, apigenin (đều có hàm lượng cao hơn trong OS-E) là chưa hợp lý. Nên chọn apigenin-7-*O*-β-D-glucuronid có thể là hợp chất quyết định tác dụng chống trầm cảm của OS-B (do hợp chất này không được phát hiện trong OS-E).
- Tác giả có suy nghĩ gì về khả năng ứng dụng của mô hình OBX trong sàng lọc ứng viên tiềm năng kháng SARS-CoV (mất khứu giác/sương mù não?

- Tài liệu tham khảo: Cần viết in hoa chữ đầu tên các tạp chí tiếng Anh. Tài liệu thiếu thông tin (số 11, 118, 135, 146, 180, 242).

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí chuyên ngành, kỷ yếu hội nghị khoa học và giá trị của các công trình công bố

Các công bố trên các tạp chí trong nước (Journal of Medicinal Materials; Vietnam Journal Science, Technology and Engineering) đều được biên tập bằng tiếng Anh và là những tạp chí chuyên ngành có uy tín khoa học.

Đánh giá về các tạp chí ngoài nước mà tác giả đã đăng bài:

- Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: H index = 100, IF = 2.61 (2021-2022), SCImago Journal Rank (SJR) = 0.461.
- Journal of Natural Medicines: H index = 50, IF = 3.18 (2021-2022), SCImago Journal Rank (SJR) = 0.588.

8. Kết luận

Luận án đáp ứng các yêu cầu về nội dung và hình thức đối với một luận án tiến sĩ quy định tại Điều 30 (Quy chế đào tạo trình độ Tiến sĩ, tháng 5/2012 của Bộ Giáo dục và Đào tạo).

Đề nghị cho phép nghiên cứu sinh được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp Viện. Đề nghị nghiên cứu sinh hoàn thiện luận án theo các góp ý của Hội đồng.

Ngày 12 tháng 10 năm 2022

Người nhận xét

PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Hương

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

Hà nội, ngày 11 tháng 10 năm 2022

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SỸ

Người nhận xét: PGS.TS. Cấn Văn Mão
Đơn vị công tác: Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y
Chức trách trong hội đồng: Phản biện 3.
Tên đề tài: **"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

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết/ cần thiết ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn của đề tại luận án.

Suy giảm trí nhớ và trầm cảm là những vấn đề lớn về sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới. Hiện tại không có các loại thuốc điều trị đặc hiệu cho các tối loạn bệnh lý này. Các loại thuốc điều trị đang được sử dụng trên lâm sàng thường có giá thành cao và gây ra các tác dụng phụ không mong muốn.

Việt nam là quốc gia có nhiều loài thực vật phong phú, trong đó Hương nhu tía là loại cây được sử dụng trong các bài thuốc cổ truyền nhằm điều trị các trường hợp suy giảm trí nhớ và trầm cảm. Cơ chế tác dụng điều trị của Hương nhu tía hiện nay vẫn chưa rõ ràng. Đề tài nghiên cứu có ý nghĩa khoa học trong tìm hiểu cơ chế tác dụng và ý nghĩa thực tế trong việc tìm kiếm các loại dược liệu có nguồn gốc tự nhiên, có khả năng cải thiện suy giảm trí nhớ và chống trầm cảm.

2. Sự trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình nghiên cứu ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

Theo như thông tin mà bản thân được biết thì luận án nghiên cứu của tác giả không có trùng lặp với các nghiên cứu trước đây ở cả trong nước và quốc tế. Nội

dung nghiên cứu, số liệu và các trích dẫn tài liệu tham khảo trong luận án là rõ ràng, đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài và nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

Luận án nghiên cứu tác dụng và cơ chế cải thiện suy giảm trí nhớ và chống trầm cảm của Hương nhu tía là phù hợp với chuyên ngành Dược lý – Dược lâm sàng

4. Độ tin cậy và tính hiện đại (hoặc thích hợp) của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Trong nghiên cứu tác giả đã sử dụng nhiều phương pháp như: phương pháp tác chiết cao toàn phân, cao phân đoạn, phương pháp đánh gía trí nhớ trên chuột (các bài tập y maze, morriswater maze, object recognition), đánh giá trầm cảm (openfield, forced swimming test, tail pick) và các phương pháp đánh giá cơ chế tác dụng (định lượng AChE, hóa mô miễn dịch, westernblot…) là các phương pháp hiện đại, đã và đang được sử dụng ở các labo trong nước và trên thế giới. Số liệu nghiên cứu được phân tích, đánh giá bằng các trang thiết bị, phần mềm hiên đại, có tính định lượng, có độ tin cậy cao.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó

- Đánh giá được tác dụng chống suy giảm trí nhớ của cao chiết cồn và cao chiết phân đoạn ethyl acetat trên mô hình chuột gây bệnh lý Alzheime bằng phẫu thuật cắt thùy khứu.

- Xác định được cơ chế tác dụng chống suy giảm trí nhớ của cao chiết cồn các cơ chế giảm giãn não thất, chống lại sự suy giảm tế bào thần kinh vùn hồi hải mã, tăng cường hệ cholinergic và ngăn chẹn sự suy giảm biểu hiện gen và protein VEGF vùng hồi hải mã trên chuột phẫu thuật cắt thùy khứu.

- Xác định được 02 chất tinh khiết có trong cao phân đoạn là acid ursolic và acid oleanoic có tác dụng chống suy giảm trí nhớ và cơ chế tác dụng của hai chất này là thông qua: tăng cường hoạt động của hệ cholinergic, tăng biểu hiện protein VEGF vùng hồi hải mã trên chuột phẫu thuật cắt thùy khứu.

- Đánh giá được tác dụng chống trầm cảm của cao chiết cồn và cao chiết phân đoạn n butanol trên mô hình chuột gây bệnh lý trầm cảm bằng phẫu thuật cắt thùy khứu.

- Xác định được cơ chế tác dụng chống trầm cảm của cao chiết phân đoạn n butanol thông qua cơ chế tác động lên hệ monoanminergic (serotonergic, noradrenergic, dopaminergic) trên chuột gây stress nhẹ trường diễn, không dự đoán trước.

Kết quả của luận án làm có ý nghĩa định hướng phát triển chế phẩm có tác dụng trong điều trị các rối loạn về suy giảm trí nhớ và trầm cảm. Đồng thời làm cơ sở, nền tảng khoa học cho các nghiên cứu về sau về sàng lọc, tìm kiếm các dược liệu có tác dụng điều trị suy giảm trí nhớ và trầm cảm.

6. Ưu nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

- Luận văn có 133 trang: đặt vấn đề 2 trang, tổng quan 35 trang, đối tượng phương pháp nghiên cứu 25 trang, kết quả 36 trang, bàn luận 27 trang, kết luận 2 trang, kiến nghị 1 trang. Kết cấu tương đối hài hòa giữa các phần, phù hợp với luận án tiến sĩ.
- Hình ảnh minh họa rõ nét, cấu trúc bảng biểu tương đối phù hợp, vẫn còn ít số lỗi chính tả
- Tài liệu tham khảo: đề tài sử dụng 263 tài liệu. Cách trình bày các tài liệu chuẩn, hợp lý.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên các tạp chí chuyên ngành và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.

Tác giả có tổng cộng 3 công trình được đăng tải, trong đó có 2 bài báo trên tạp chí trong nước, 1 bài báo trên tạp chí quốc tế (SCI).

Bài 1: Putative Constituents Contributing to the Antidepressant-Like Effects of Ocimum sanctum in Olfactory Bulbectomized-Mice (Journal of Medicinal Materials, 2020, Vol. 25, No. 3).

Bài 2: Ocimum sanctum Linn. Extract Improves Cognitive Deficits in Olfactory Bulbectomized Mice via the Enhancement of Central Cholinergic Systems and VEGF Expression. Evid Based Complement Alternat Med. 2021; 2021: 6627648

Bài 3: 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 of Science, Technology and Engineering (VJSTE), 63 (4), pp. 55-61.

Bài 4: Ursolic acid and its isomer oleanolic acid are responsible for the anti-dementia effects of Ocimum sanctum in olfactory bulbectomized mice. J Nat Med. 2022 Jun;76(3):621-633. doi: 10.1007/s11418-022-01609-2

Các công trình này có chất lượng, nội dung trong 02 bài báo quốc tế (bài 2, bài 4) và 1 bài báo trong nước (bài 1 và bài 3) là kết quả chủ yếu của luận án, có nội dung chính liên quan đến vấn đề nghiên cứu trong luận án, không thấy có sự sai lệch về số liệu giữa luận án và các bài báo.

8. Kết luận:

*** Luận án đáp ứng được các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ** theo qui định tại điều 30 (Qui chế đào tạo tiến sĩ, tháng 5/2012 của Bộ Giáp dục và Đào tạo).

Tuy nhiên tác giả cần chỉnh sửa một số nội dung sau:

- Phần Tổng quan cũng nên có một đoạn nói về phần mềm Any maze (nguyên lý, cách thức phân tích hành vi như thế nào)
- Phần đối tượng nghiên cứu trong bài tập chữ y đánh giá hành vi cần nêu rõ các tiêu chí như thế nào chuột được coi là nằm trong một cánh, trong bài tập mê lộ nước thì cần nêu rõ là màu nước thế nào, chuột có nhìn thấy bến đỗ hay không và các bảng chỉ dẫn là gì (vì chuột không thể đọc hoặc hiểu được các bảng chỉ dẫn như người). Tác giả viết là các thông số được tính toán bằng phần mềm Any maze là chưa chính xác mà nên là được phân tích bằng sử dụng phần mềm Any maze.
- Phần kết quả rất hiểu hình như hình 3.2, 3.3…3.6 phần chú thích ghi các ký hiệu và giải thích cần chỉnh sửa lại (*p<0,05 khi so sánh lô sinh lý với lô bệnh và #p<0,05 khi so sánh các lô thuốc với lô bệnh lý) nên sửa là (*p<0,05 so sánh với lô sinh lý và #p<0,05 so sánh với lô bệnh lý). Vì các ký tự đó là để trên các cột của từng nhóm nên so sánh với lô nào tức là lô có ký tự với lô cần so sánh. Hình 3.14 có thể bỏ vì kết quả của hình này không có ý nghĩa trong đánh giá trí nhớ không gian.
- Các trang 86, 87, 93, 97, 98 phần kết quả, tác giả đều có phần bàn luận đi cùng nên chỉnh sửa lại (nên chuyển xuống phần bàn luận phía sau) .
- Phần Bàn luận mục 4.1.1 còn dài dòng, một số nội dung như liều dùng cao chiết, cách chọn thuốc chứng dương, mô hình động vật có thể lồng vào phần bàn luận về đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ và tác dụng chống trầm cảm. Mục 4.33 (trang 110) và 4.34 (trang 111) nên gọp lại làm 1 thành một theo tiêu đề của mục 4.34.
- Phần Bàn luận trang 112 (phần một số kinh nghiệm trong thiết kế thử nghiệm MWM, đầu trang trước mục c) không nên để trong phần bàn luận, nếu cần thì đưa lên phần phương pháp nghiên cứu. Các mục bàn luận chung về tác dụng của chất lên hành vi nên lồng vào trong phần đánh giá tac dụng.

- Phần bàn luận cũng cần có một chút bàn luận về lý do tại sao lại chọn các bài tập hành vi khác nhau khi đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ cũng như trong đánh giá tác dụng chống trầm cảm (có thể dùng cùng các bài tập được không ?)

- Phần đề xuất đoạn dẫn đầu quá dài, không cần thiết cần viết gọn lại.

Người nhận xét

PGS.TS. Cấn Văn Mão

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

(Dùng cho tất cả các thành viên trong Hội đồng cấp Viện)

Họ và tên người viết nhận xét (học hàm/học vị): PGS.TS. Trần Mạnh Hùng
Đơn vị công tác: Bộ môn dược lý, Khoa Dược, ĐH Y Dược Tp. Hồ Chí Minh
Chức trách/nhiệm vụ trong Hội đồng: Ủy viên
Số điện thoại liên lạc: 0937746596
Họ và tên NCS: Nguyễn Thu Hiền
Tên đề tài: 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

NỘI DUNG BẢN NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết/cần thiết, ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn của đề tài luận án.
   Hương nhu tía là một trong những dược liệu được nghiên cứu trên rất nhiều khía cạnh dược lý khác nhau và cũng đã được đồng thuận về tác động có lợi của hương nhu tía. Những tác động quan trọng của hương nhu tía bao gồm tác động trên tăng cường thể chất, giải độc, cải thiện chuyển hóa, kháng khuẩn và cải thiện các vấn đề về tâm thần kinh. Gần đây, những tác động của hương nhu tía trên trầm cảm, suy giảm trí nhớ cũng được quan tâm nghiên cứu.
   Luận án này đặt mục tiêu nghiên cứu tác động của cao toàn phần, các cao phân đoạn, hợp chất điển hình của phân đoạn và cơ chế tác động của hương nhu tía trên mô hình gây suy giảm trí nhớ và trầm cảm bằng cách hủy thùy khứu giác của chuột nhắt và mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước nhằm cung cấp các bằng chứng thực nghiệm chứng minh tác động và cơ chế, do đó đáp ứng được tính cấp thiết, tính thời sự cũng như ý nghĩa khoa học và thực tiễn.
2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình nghiên cứu ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.
   Đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới và trong nước thực hiện trên hương nhu tía, bao gồm cả tác động trên suy giảm trí nhớ và trầm cảm. Cơ sở nghiên cứu chính của luận án là tìm hiểu cơ chế tác động của cao toàn phần, các cao phân đoạn và 2 hợp chất acid ursolic và acid oleanolic của hương như tía ở mức độ phân tử để giải thích cho tác động cải thiện suy giảm trí nhớ và chống trầm cảm trên mô hình chuột nhắt loại bỏ thùy khứu giác, mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước. Luận án có những công bố mới về các kết quả trên nên không trùng lặp với các công trình trong nước và nước ngoài.
   Luận án có trích dẫn khá rõ ràng và đầy đủ các tài liệu tham khảo. Số lượng tài liệu tham khảo mới khá nhiều và cập nhật.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

   Đề tài phù hợp với chuyên ngành và mã số chuyên ngành là Dược lý – Dược lâm sàng. Giữa tên đề tài và nội dung, mục tiêu cụ thể có sự phù hợp.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại (thích hợp) của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.

   Các phương pháp nghiên cứu là những phương pháp thường quy, có tính hiện đại được áp dụng phổ biến trong các nghiên cứu dược lý thực nghiệm và dược lý phân tử. Các số liệu thu được từ các thực nghiệm có độ tin cậy và đầy đủ cho phân tích thống kê để có thể rút ra những kết luận có giá trị khoa học.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Luận án của NCS đã thực hiện được 2 mục tiêu chính sau:

- Đã đánh giá được tác động và giải thích cơ chế cải thiện suy giảm trí nhớ của hương nhu tía trên mô hình chuột nhắc loại bỏ thủy khứu giác qua thử nghiệm nhận diện vật thể, mê cung chữ Y (Y maze) và mê cung nước (Morris water maze).
- Đã đánh giá được tác động và giải thích cơ chế cải thiện tình trạng trầm cảm của hương nhu tía trên mô hình chuột nhắc loại bỏ thủy khứu giác và mô hình gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước qua thử nghiệm treo đuôi và bơi cưỡng bức.

Những kết quả trong luận án giúp khẳng định các điểm sau:

a. Cao chiết cồn hương nhu tía và phân đoạn etyl acetat cải thiện suy giảm trí nhớ có thể qua cơ chế tăng cường hoạt tính hệ cholinergic ở vỏ não và tăng sinh tế bào thần kinh mới ở vùng hồi hải mã. Hai hợp chất chính trong phân đoạn etyl acetat là acid ursolic và acid oleanoic đều thể hiện được tác động này.

b. Cao chiết cồn hương nhu tía và phân đoạn butanol cải thiện tình trạng trầm cảm có thể qua cơ chế tăng cường hoạt tính hệ monoaminergic như serotonergic và dopaminergic/noradrenergic.

6. Ưu nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

   Ưu điểm: luận án được trình bày rõ ràng, nội dung bám sát mục tiêu nghiên cứu, hình ảnh, bảng biểu, phụ lục, số liệu tương đối đầy đủ.

   Nhược điểm:

   Hình thức: một số lỗi thuật ngữ trong bảng chữ viết tắt (ACTH: không phải là hormon vỏ thượng thận; sucrose preference test: biên dịch thành thử nghiệm tiêu thụ saccharose), tổng quan tài liệu (sa sút trí tuệ mạch máu: nên ghi thành sa sút trí tuệ căn nguyên mạch máu, đái tháo đường thay vì tiểu đường, lập lại giải thích từ viết tắt rất nhiều lần, thống nhất từ viết tắt của presenilin: PS hoặc PSEN, sửa lại tên thuốc mirtazapin thay cho mirtazepin, một số đoạn vẫn mang văn dịch nghĩa chưa rõ, nhiều hình chưa được Việt hóa hoàn toàn.

Phương pháp nghiên cứu: mặc dù phương pháp nghiên cứu đã được mô tả chi tiết, tuy nhiên cũng cần chỉnh sửa 1 số điểm sau:

- Chưa thấy mô tả phương pháp đo tính vận động của chuột thí nghiệm ở các thử nghiệm sau khi loại bỏ thùy khứu giác, các thử nghiệm nhận diện vật thể, mê lộ chữ Y, mê lộ nước, …
- Việc đánh giá các tế bào bắt màu thuốc nhuộm DAB trong các thử nghiệm hóa mô miễn dịch với vật kính 10 thường chưa đủ tính thuyết phục cao vì chưa cho thấy rõ thân và trục của các tế bào thần kinh, khó phân biệt giữa các tế bào bắt màu và màu không đặc hiệu. Mặt khác, chưa thấy nhóm nghiên cứu khu trú diện tích đếm số tế bào bắt màu ở mỗi vùng não quan tâm thay vì đếm toàn bộ ở vật kính 10 (sai số khó tránh khỏi).
- Chưa thấy kết quả xác định hoạt tính acetylcholinesterase trong dịch đồng thể trước khi tiến hành thử nghiệm ức chế hoạt tính enzym; chưa thấy việc định lượng protein trước khi sử dụng dịch đồng thể (thường lấy theo đồng lượng protein hơn là đồng thể tích)
- Thiết kế thử nghiệm tác động của hương nhu tía mang tính dự phòng, chưa thấy thiết kế mang tính tác động sau khi các tổn thương thần kinh hoặc biểu hiện hành vi xảy ra, ví dụ ngay sau khi loại bỏ thùy khứu giác hoặc vài tuần sau khi loại bỏ,...
- Chưa thấy mô tả thời gian và số lần sử dụng AMPT, PCPA trong thử nghiệm về cơ chế tác động trên hệ monoaminergic

Kết quả nghiên cứu: một số kết quả và nhận xét cần cân nhắc để đưa ra kết luận mang tính khách quan hơn.

- Kết quả đánh giá giãn não thất cần minh chứng bằng các hình ảnh có vị trí cắt giống nhau. OBX và OBX/DNP cắt hơi về phía trước nên não thất rộng hơn các vị trí sau như OBX/OS. Ngoài ra kỹ thuật cố định mô não cũng ảnh hưởng đến kích thước của não thất.
- Hình chụp ở hồi răng vùng hồi hải mã các tế bào biểu hiện DCX chưa rõ và có vẻ lô sinh lý bắt màu rõ hơn, cần độ phóng đại to hơn để chắc chắn vết màu là tế bào thần kinh thay vì tế bào bắt màu không đặc hiệu hoặc các vết màu. Mặt khác, hình ảnh hồi răng cho thấy vị trí vết cắt không tương đồng nhau nên số lượng tế bào biểu hiệu DCX cũng có thể khác nhau.
- Hình chụp ở vách giữa các tế bào biểu hiện ChAT cũng chưa rõ và có vẻ OBX/OS, OBX/DNP có số lượng tế bào biểu hiện ChAT và nhuộm hematoxylin còn ít hơn cả OBX.
- Nếu số lượng tế bào biểu hiện ChAT giảm có nghĩa ACh giảm và vì thế hoạt độ AChE cũng ít có khả năng tăng lên như kết quả tìm ra trong luận án, điều này

hơi khó giải thích, vì thế việc định lượng ACh sẽ phản ánh kết quả rõ ràng hơn là xác định hoạt độ AChE

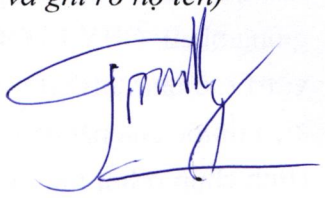
- Kết quả về biểu hiện VEGF và VEGF2 receptor cũng khó giải thích khi hương nhu tía làm tăng biểu hiện VEGF nhưng lại không làm tăng VEGF2 receptor, vậy VEGF tăng cũng không có ý nghĩa gì.
- Trong thử nghiệm SPT, dấu hiệu giảm ưa thích saccharose xảy ra sau 4 tuần do đó thiết kế thử nghiệm quá sớm (tuần đầu) sẽ làm giảm tính chính xác khi đánh giá kết quả. Cũng cần kéo dài thêm thời gian thử nghiệm SPT thay vì chỉ ngưng ở tuần thứ 4.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên các tạp chí chuyên ngành và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.
   Các kết quả của luận án được công bố trong 04 bài báo khoa học có phản biện trong đó có 2 bài quốc tế có hệ số ảnh hưởng cao trong chuyên ngành. Nội dung phù hợp với những kết quả chính trong luận án.
8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ quy định tại Điều 30 (Quy chế đào tạo trình độ tiến sĩ, tháng 5/2012 của Bộ Giáo dục và Đào tạo); luận án có thể đưa ra bảo vệ trước Hội đồng được hay không?
   Nội dung của luận án đáp ứng yêu cầu của một nghiên cứu sinh. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án. Luận án có thể đưa ra bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án Tiến sĩ cấp Viện.

....., ngày 12 tháng 10 năm 2022.

Người viết nhận xét

(Ký và ghi rõ họ tên)



PGS.TS. Trần Mạnh Hùng

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

(Dùng cho tất cả các thành viên Hội đồng cấp Viện)

Họ và tên người nhận xét: *(học hàm/ học vị): PGS. TS. Đào Thị Vui*
Đơn vị công tác: Khoa Dược lý- Dược lâm sàng trường ĐH Dược Hà Nội
Chức nhiệm trong Hội đồng: uỷ viên
Số điện thoại liên lạc: 0975585939
Họ và tên NCS: Nguyễn Thu Hiền
Tên đề tài: ***"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: 972.02.05

NỘI DUNG BẢN NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn của đề tài luận án

Hương nhu tía từ lâu đã được coi là dược liệu quí để tăng cường sức khoẻ đồng thời được dùng chữa rất nhiều bệnh. Đã có rất nhiều nghiên cứu đã công bố tác dụng dược lý của hương nhu tía, đặc biệt, gần đây nhiều nghiên cứu trên thế giới và Việt nam về tác dụng cải thiện trí nhớ, chống trầm cảm và giải lo âu cũng đã được công bố.... tuy nhiên số liệu nghiên cứu còn ít và mới dừng lại ở cao chiết toàn phần và chưa được nghiên cứu đầy đủ về cơ chế tác dụng. Vì vậy cần có nghiên cứu toàn diện để có căn cứ phát triển vùng nguyên liệu để làm thuốc chữa bệnh bằng nguồn nguyên liệu trong nước. Do đó, việc thực hiện đề tài là cấp thiết có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn góp phần phát triển nguồn nguyên liệu dồi dào này thành thuốc chữa bệnh phục vụ được đông đảo người bệnh

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước, tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài không có sự trùng lắp với các công trình, luận văn, luận án đã công bố trong và ngoài nước. Trích dẫn tài liệu tham khảo tương đối đầy đủ, trung thực, rõ ràng và chính xác.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành:

Nội dung nghiên cứu phù hợp với tên đề tài và mục tiêu đặt ra. Nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành và mã số chuyên ngành Dược lý - Dược lâm sàng

4. Độ tin cậy và tính hợp lý, hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Đề tài được thiết kế nhìn chung phù hợp giữa nội dung và mục tiêu nghiên cứu. Các nội dung đề tài được thực hiện với các phương pháp nghiên cứu kinh điển, thường qui kết hợp nhiều kỹ thuật hiện đại phù hợp, có độ tin cậy.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành, đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của kết quả đó.

Đề tài được nghiên cứu hệ thống về cây Hương nhu tía với 2 nội dung

- Đánh giá tác dụng và cơ chế tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ của Hương nhu tía trên chuột bị loại bỏ thuỳ khứu giác
- Đánh giá tác dụng và cơ chế tác dụng chống trầm cảm của Hương nhu tía trên chuột bị loại bỏ thuỳ khứu giác và chuột bị gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước.

Kết quả nghiên cứu mới:

- Về tác dụng cải thiện trí nhớ của Hương nhu tía: đã xác định được cao chiết cồn, cao phân đoạn ethylacetat và 2 chất có hàm lượng cao được chiết xuất từ hương nhu tía là acid ursolic và acid oleanolic có tác dụng cải thiện trí nhớ trên mô hình OBX. Đã xác định được cơ chế tác dụng: ức chế enzym acetylcholinesterase, cải thiện sự suy giảm mức độ biểu hiện protein ChAT, tăng cường biểu hiện protein VEGF ở hồi hải mã
-Về tác dụng chống trầm cảm: đã xác định được cao chiết cồn, cao phân đoạn n-butanol có tác dụng giảm hành vi tuyệt vọng trên mô hình treo đuôi, tăng hành vi trốn thoát trên mô hình bơi cưỡng bức trên chuột OBX. Cao phân đoạn n-butanol còn có tác dụng chống trầm cảm thông qua: giảm biểu hiện trầm cảm, cải thiện hành vi hứng thú: phần thưởng với tiêu thụ đường, chải lông, tuyệt vọng, tăng hành vi trốn thoát có định hướng, và không ảnh hưởng đến vận động tự nhiên của chuột.

Đính hướng được cơ chế chống trầm cảm có liên quan đến hệ monoaminergic.

6. Ưu nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

6.1. Ưu điểm:

Kết cấu luận án tương đối phù hợp, tương đối cân đối giữa các phần ĐVĐ, Tổng quan, Nguyên vật liệu và PPNC, Kết quả nghiên cứu, Bàn luận. Trình bày vấn đề tương đối rõ ràng, văn phong dễ hiểu, trích dẫn nguồn rõ ràng và tương đối đầy đủ phù hợp.

Nội dung nghiên cứu phong phú, mô hình nghiên cứu yêu cầu nhiều kỹ thuật khó. Kết quả nghiên cứu phong phú, kết quả thu được có nhiều giá trị cả về khoa học và thực tiễn góp phần đáng kể vào nâng cao học thuật cho chuyên ngành.

Luận án đã thực hiện một khối lượng công việc rất lớn và phù hợp với mục tiêu đề tài. Mỗi kết quả thu được đều có xử lý thống kê, phân tích bàn luận trung thực cho thấy đề tài có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Tài liệu tham khảo phong phú, cặp nhật. Đã đăng được 4 bài báo trên các tạp chí uy tín trên thế giới bằng tiếng Anh. và trong nước

6.2. Nhược điểm và góp ý kiến

Tổng quan:

Nên gộp các mục 1,1; 1.2 và 1.3 vào một mục lớn thành "Tổng quan về SSTN và trầm cảm"; tách riêng nội dung "Các mô hình dược lý nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ và chống trầm cảm" và nội dung về Các nghiên cứu về sa sút trí nhớ và trầm cảm của hương nhu tía thành các mục riêng (phần này hiện đang viết trong mục tác dụng sinh học nên không làm nổi bật được những nội dung mà luận án cần tập trung giải quyết?).

Về nội dung tổng quan của "Hội chứng sa sút trí tuệ …" phần nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh, Một số mô hình dược lý gây suy giảm trí nhớ trên thực nghiệm hiện tại tác giả đang chỉ trình bày theo hướng bệnh Alzheimer còn thiếu các nội dung liên quan đến các thể sa sút trí tuệ khác vì vậy cần bổ sung cho đầy đủ.

Ngoài ra cũng cần rà soát cách trình bày, thuật ngữ chuyên môn, văn phong còn nhiều lỗi văn dịch.

Đối tượng và PPNC

Sơ đồ nghiên cứu trình bày quá nhiều thứ và không tương xứng với phương pháp nghiên cứu và kết quả nghiên cứu. Đề nghị trình bày lại cho phù hợp hơn

Phần phương pháp nghiên cứu dược lý cần rà soát trình bày lại theo 2 mục tiêu. Đặc biệt để nội dung rõ ràng thì cần trình bày về thiết kế các nghiên cứu trước rồi mới trình bày về gây mô hình và các thông số nghiên cứu riêng cho từng mô hình ứng với từng nội dung nghiên cứu. Về phần thiết kế nghiên cứu, cần trình bày rõ nguyên tắc của mô hình, đã tham khảo từ đâu? Có cải tiến gì không? Xem lại thử nghiệm nhận diện đồ vật (trang 46) Phương pháp này không phải do tác giả Xoan Le và cộng sự đưa ra không? bởi vậy cần đưa đúng tên tác giả hoặc ghi rõ PP này được trình bày trong công bố của …

Mục 2.2.3.1. Mô hình cắt bỏ thuỳ khứu giác (cũng như các mô hình khác): để phần thiết kế có tính logic nên có phần nguyên tắc của mô hình: trình bày vắn tắt về vai trò vùng khứu giác và ý nghĩa của việc gây mô hình loại bỏ vùng khứu giác dùng cho nghiên cứu. Đồng thời ra soát lại trình bày cho rõ ràng hơn (ví dụ sử dụng máy khoan để khoan 1 lỗ kích thước 1mm nhưng không ghi rõ khoan vào vị trí nào của hộp sọ, cách định vị mũi khoan, cách xác định mức loại bỏ thuỳ khứu giác dưới 70% như thế nào (trang 44)…đề nghị bổ sung và giải trình.

Kết quả nghiên cứu: LA trình bày chủ yếu là hình ít bảng số liệu (trong quyển cần trình bày chủ yếu là bảng số liệu để nhìn rõ được con số sẽ thể hiện được kết quả NC

chính xác hơn); Các hình kết quả NC cần thống nhất tên lô của phần kết quả giống phần PPNC; Lô chứng bệnh ở thí nghiệm tác dụng chống trầm cảm còn đặt tên lô là chưa chính xác vì trừ lô chứng sinh lý tất cả các lô thử đều gây trầm cảm bằng UCMS, vì vậy cần đặt là chứng bệnh (bệnh lý) cho thống nhất ở tất cả các thí nghiệm.
Phần dẫn dắt và nhận xét kết quả quá dài chỉ nên nhận xét ngắn gọn và không nên bàn luận ở phần kết quả vì đã có mục Bàn luận riêng.

Bàn luận: Phần Bàn luận khá dầy dặn và đầy đủ, tuy nhiên cần bàn luận sát hơn vào các nội dung nghiên cứu. Phần bàn luận về cơ chế tác dụng cần thận trọng hơn ví dụ Hình 4.2. tác giả chưa xác định nồng độ serotonin vì vậy không thể khẳng định mẫu NC làm tăng nồng độ serotonin được (Vì cứ cho là mẫu NC có ảnh hưởng đến hệ serotoninergic nhưng có nhiều cơ chế chứ không chỉ làm tăng nồng độ vì vậy cần Bàn luận lại và cân nhắc bỏ hình 4.2). Đặc biệt cách trình bày, văn phong còn nặng về văn dịch lủng củng chưa được trau chuốt. Đề nghị cần rà soát viết lại cho logic và thuần ngôn ngữ tiếng Việt.

7. Nội dung của luận án được công bố trên các tạp chí chuyên ngành và giá trị khoa học của các công trình đã công bố

Nội dung của luận án được công bố trong 4 bài báo trên các tạp chí quốc tế uy tín. Các bài báo đều phù hợp với nội dung của đề tài, có giá trị khoa học, đây sẽ là những thông tin quan trọng cho các nhà nghiên cứu tham khảo cả về nội dung và phương pháp nghiên cứu.

8. Kết luận chung

Đề tài đã được triển khai với khối lượng công việc lớn. Các nội dung nghiên cứu được thiết kế phù hợp có tính khoa học và có giá trị thực tiễn. Sau khi sửa chữa theo góp ý, đề tài đáp ứng được yêu cầu của luận án tiến sĩ qui định tại điều 30 (Qui chế đào tạo trình độ tiến sĩ , tháng 5/2012 của Bộ Giáo dục và Đào tạo. Luận án có thể đưa ra bảo vệ trước Hội đồng cấp Viện.

Hà Nội, ngày 12 tháng 10 năm 2022

Người viết nhận xét

Đào Thị Vui

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

(Dùng cho tất cả các thành viên trong Hội đồng cấp Viện)

Họ và tên người viết nhận xét (học hàm/học vị): PGS.TS Bùi Thanh Tùng
Đơn vị công tác: Trường ĐH Y Dược, ĐHQGHN
Chức trách/nhiệm vụ trong Hội đồng: Ủy viên thư ký
Số điện thoại liên lạc: 0904429676
Họ và tên NCS: NGUYỄN THU HIỀN
Tên đề tài: 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

NỘI DUNG BẢN NHẬN XÉT

Nội dung của bản nhận xét phải nêu ý kiến đánh giá về các vấn đề sau:

1. Tính cấp thiết/cần thiết, ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn của đề tài luận án.

   Ngày nay, các chứng bệnh rối loạn thần kinh, tâm thần như sa sút trí tuệ, giảm trí nhớ, trầm cảm có số lượng bệnh nhân mắc ngày càng nhiều và là mối lo ngại lớn về sức khỏe toàn cầu. Các thuốc điều trị hiện nay có nguồn gốc tổng hợp hóa học lại có nhiều tác dụng phụ không mong muốn và chi phí cao. Nghiên cứu sử dụng dược liệu trong điều trị các chứng suy giảm trí nhớ, chống trầm cảm là rất cần thiết. Hương nhu tía là một dược liệu quý, có nhiều tác dụng sinh học, trong đó có tác dụng trên rối loạn tâm thần. Tuy nhiên các nghiên cứu về cơ chế tác dụng của Hương nhu tía trên các bệnh rối loạn tâm thần còn chưa đầy đủ. Tại Việt Nam chưa có công trình nghiên cứu nào công bố đầy đủ về tác dụng trên một số rối loạn tâm thần của Hương nhu tía. Do đó, luận án này có tính cấp thiết, có ý nghĩa khoa học và có giá trị thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình nghiên cứu ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

   Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu về tác dụng của hương nhu tía về cải thiện trí nhớ, chống trầm cảm và giải lo âu. Tại Việt Nam thì chỉ có nhóm nghiên cứu của Viện Dược liệu tiến hành. Các kết quả nghiên cứu của luận án này đánh giá về tác dụng và nghiên cứu cơ chế tác dụng của cao chiết toàn phần và các phân đoạn của Hương nhu tía khác so với các công trình trước đây. Đề tài không có sự trùng lặp so với các công trình nghiên cứu trước đây trong và ngoài nước.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

Tên đề tài và nội dung là phù hợp; phù hợp với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại (hoặc thích hợp) của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.
   Phương pháp nghiên cứu hiện đại, chuyên sâu về tác dụng dược lý thần kinh như các mô hình chuột bị loại bỏ thùy khứu giác (OBX), mô hình chuột bị gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước (UCMS) là những phương pháp được sử dụng hầu hết trong các phòng thí nghiệm dược lý thần kinh nên có độ tin cậy, phù hợp với nội dung nghiên cứu của đề tài. Các thử nghiệm hành vi, các phương pháp nghiên cứu cớ chế tác dụng có độ tin cậy, thích hợp với thực hiện mục tiêu đề tài.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.
   Cao chiết cồn OS và EtOAC có tác dụng cải thiện trí nhớ trên chuột OBX. Cơ chế có thể là cải thiện tình trạng giãn não thất, tăng cường hệ cholinergic, ngăn cản sự suy giảm biểu hiện gen và protein VEGF vùng hồi hải mã trên chuột OBX.
   Hai chất tinh khiết acid ursolic và acid oleanolic có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ không gian ngắn hạn và dài hạn trên mô hình chuột OBX, cơ chế thông qua tăng cường hệ cholinergic, tăng cường biểu hiện VEGF trong hồi hải mã của chuột OBX.
   Cao chiết cồn OS và BuOH liều 400 mg/kg/ngày có tác dụng chống trầm cảm, giảm hành vi tuyệt vọng trong thử nghiệm treo đuôi, tăng hành vi trốn thoát có định hướng trong thử nghiệm bơi cưỡng bức trên chuột OBX.
   Cao OS-BuOH có tác dụng chống trầm cảm phụ thuộc liều trên chuột UCMS. Cơ chế thông qua tác động lên hệ monoaminergic, bao gồm: serotonergic, noradrenergic, dopaminergic.

6. Ưu nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.
   Nhìn chung luận án đã đạt được một số kết quả, đáp ứng mục tiêu đề ra.
   Tuy nhiên cần có một số góp ý chỉnh sửa để hoàn thiện hơn luận án.
   Phần Tổng quan
   Luận án đã tổng hợp được các mô hình dược lý đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ và chống trầm cảm, đã tổng hợp được phần thành phần hóa học và tác dụng sinh học của cây Hương nhu tía.
   Phần hội chứng sa sút trí tuệ ở trang 3 có nêu nhiều dạng khác nhau nhưng phần nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh chỉ trình bày về bệnh Alzheimer nên chưa được điển hình, cần trình bày thêm về các dạng khác nữa như Sa sút trí tuệ mạch máu (vascular dementia); - Sa sút trí tuệ thể Lewy (dementia with Lewy bodies, tập hợp

protein bất thường phát triển bên trong các tế bào thần kinh); - Một nhóm bệnh (thoái hóa thùy trán của não) góp phần gây ra chứng sa sút trí tuệ sớm (frontotemporal dementia)
Mục 1.1.3 về Thuốc điều trị nên bổ sung về các thuốc điều trị sa sút trí tuệ cho các dạng khác nữa, ngoài bệnh Alzheimer.

Phần Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:
Các phương pháp nghiên cứu được mô tả chi tiết, rõ ràng. Là các phương pháp nghiên cứu chuyên sâu về tác dụng dược lý thần kinh trên mô hình động vật thực nghiệm và một số phương pháp hiện đại như Western blot, PCR Real time.

Phần kết quả nghiên cứu
Về tác dụng cải thiện trí nhớ:
Cao OS liều 400 mg/kg thể trọng và cao chiết phân đoạn EtOAC liều 200 mg/kg và 400 mg/kg, axit ursolic (liếu 6 và 12 mg/kg) và axit oleanolic (24 mg/kg) có tác dụng cải thiện trí nhớ trên chuột OBX.
Câu hỏi 1: Theo kết quả của luận án trình bày hàm lượng hai axit này trong EtOAc là 11% và 10,27%, do đó, với liều 200 mg/kg của EtOAC thì có ít nhất khoảng 20 mg/kg của cả hai axit, thì tác dụng của phân đoạn EtOAc so với hai axit sẽ như thế nào, liệu cao hơn không?

Về tác dụng chống trầm cảm:
Cao chiết cồn OS và cao chiết BuOH có tác dụng chống trầm cảm. Tuy nhiên chưa đánh giá tác dụng chống trầm cảm của hai hợp chất axit. Phần thành phần hóa học của BuOH cũng chưa mô tả.
Câu hỏi 2: Lý giải như thế nào để thấy EtOAc có tác dụng trên cải thiện trí nhớ và BuOH có tác dụng chống trầm cảm, và cao OS có cả hai tác dụng này với liều 400 mg/kg?
Câu hỏi 3: Liều sử dụng Hương nhu tía trên người theo dân gian là bao nhiêu? Từ kết quả thu được của luận án, thì liều sử dụng cao chiết dự kiến trên người sẽ là bao nhiêu? Cao chiết toàn phân hay cao phân đoạn sẽ được ưu tiên sử dụng cho hỗ trợ điều trị suy giảm trí nhớ, chống trầm cảm?

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên các tạp chí chuyên ngành và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.
   Đã công bố bốn bài báo, hai bài báo trong nước và hai bài quốc tế, trên tạp chí trong nước và quốc tế có uy tín, có nội dung phù hợp với nội dung nghiên cứu của luận án.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ quy định tại Điều 30 (Quy chế đào tạo trình độ tiến sĩ, tháng 5/2012 của Bộ Giáo dục và Đào tạo); luận án có thể đưa ra bảo vệ trước Hội đồng được hay không?

   Luận án đã hoàn thành được các nội dung cơ bản theo mục tiêu đề ra. Luận án có thể đưa ra bảo vệ trước Hội đồng.

Hà Nội, ngày 10 tháng 10 năm 2022

Người viết nhận xét

(Ký và ghi rõ họ tên)

Bùi Thanh Tùng

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do - Hạnh Phúc

BÁO CÁO SỬA CHỮA LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC SAU BẢO VỆ CẤP VIỆN

Kính gửi: **- Hội đồng Bảo vệ cấp Viện luận án tiến sĩ Dược học**
- Phòng Quản lý khoa học và Đào tạo, Viện Dược liệu

Tên tôi là: **Nguyễn Thu Hiền**

Tên đề tài 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**

Chuyên ngành: Dược lý – Dược lâm sàng

Mã số: 9720205

Đã bảo vệ cấp Viện luận án tiến sĩ Dược học vào hồi 14 giờ 00 phút ngày 27 tháng 10 năm 2022 tại phòng họp tầng 4 – Viện Dược liệu, theo quyết định số 1219/QĐ-VDL ngày 26 tháng 9 năm 2022 của Viện trưởng Viện Dược liệu.

NỘI DUNG SỬA CHỮA HOÀN CHỈNH

1. Những nội dung đã được sửa chữa theo yêu cầu của Hội đồng và ý kiến của các nhà khoa học ngoài Hội đồng:

STT	Chương mục	Các nội dung yêu cầu sửa chữa của Hội đồng	Nội dung đã sửa chữa
1	DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	- Sửa lỗi chính tả	Đã sửa chữa
2	CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	- Gộp mục 1.1, 1.2, 1.3 thành "1.1. Tổng quan về sa sút trí tuệ và trầm cảm", tách riêng mục "1.2. Các mô hình dược lý", tách riêng mục "1.3.6. Các nghiên cứu liên quan đến tác dụng cải thiện trí nhớ của HNT" và "1.3.7. Các nghiên cứu	Đã chỉnh sửa

STT	Chương mục	Các nội dung yêu cầu sửa chữa của Hội đồng	Nội dung đã sửa chữa
		liên quan đến tác dụng chống trầm cảm của HNT - Bổ sung thông tin về butyrylcholinesterase (BuChE) - Bổ sung mối liên quan stress oxy hóa và bệnh lý Alzheimer - Lỗi chính tả - Bỏ từ "enzym" trước AChE - Rà soát lại văn phong khoa học	 Đã bổ sung Đã chỉnh sửa
3	CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU, PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	- Điều chỉnh sơ đồ nghiên cứu tổng thể - Trình bày đầy đủ kích thước các dụng cụ tự thiết kế - Bổ sung sơ đồ thiết kế nghiên cứu phối hợp các tác nhân gây stress nhẹ trường diễn không dự đoán trước - Bổ sung nguyên lý của phần mềm Anymaze	Đã chỉnh sửa Đã bổ sung Đã bổ sung Đã bổ sung
4	CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	- Chỉnh sửa chú thích cho phù hợp - Chỉnh sửa lời dẫn và nhận xét kết quả ngắn gọn hơn - Sửa tên hình 3.26	Đã chỉnh sửa Đã chỉnh sửa Đã chỉnh sửa
5	CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	- Chỉnh sửa từ ngữ - Chỉnh sửa một số bàn luận	Đã chỉnh sửa Đã chỉnh sửa
6	TÀI LIỆU THAM KHẢO	- Cập nhật, rà soát và chỉnh sửa tài liệu tham khảo đúng định dạng	Đã chỉnh sửa

2. Nội dung xin bảo lưu: Không có

Hà Nội, ngày tháng năm 2022

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN	NGHIÊN CỨU SINH
PGS. TSKH. Nguyễn Minh Khởi TS Lê Thị Xoan	Nguyễn Thu Hiền

Ý KIẾN CỦA CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG VÀ CÁC THÀNH VIÊN HỘI ĐỒNG

Phản biện 1	Phản biện 2
PGS. TS. Phạm Thị Vân Anh	PGS. TS. Nguyễn Thị Thu Hương
Phản biện 3	**Ủy viên**
PGS. TS. Cấn Văn Mão	PGS. TS. Đào Thị Vui
Ủy viên	**Ủy viên – Thư ký**
PGS. TS. Trần Mạnh Hùng	PGS. TS. Bùi Thanh Tùng

Chủ tịch Hội đồng

PGS. TS. Nguyễn Trọng Thông