

các nghiên cứu tiếp theo về cây duối ô rô (*Streblus ilicifolius* (S. Vidal) Corner).

Các cao đều có tác dụng kháng viêm mạnh thông qua việc khảo sát hoạt tính kháng viêm trên sự ức chế sinh NO trên dòng tế bào BV2. Thông qua cơ chế ức chế biểu hiện protein

COX-2 và iNOS trên dòng tế bào BV2 cho thấy cao toàn phần, cao *n*-hexan và cao ethyl acetat thể hiện hoạt tính ức chế sự biểu hiện của protein COX-2, iNOS ở các nồng độ thử nghiệm khi so sánh với chất đối đương là dexamethason ở nồng độ 5 μ M.

Tài liệu tham khảo

1. Singh B., Chettri A., Adhikari D., Barik S.K. (2012), Taxonomic history, rediscovery, and assessment of threat status of *Streblus ilicifolius* (Moraceae) from India, *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 6 (2), 611-614; <https://www.jstor.org/stable/41972449>.
2. Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam*, tập 2, NXB Trẻ, tp. Hồ Chí Minh, 542-543.
3. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, Hà Nội, 821-822.
4. Nguyen T. N., Dang H. P., Nguyen X. H., Do N. V. T., Le H. T., Le Q. H. T., Nguyen T. T. M. (2021), Tyrosinase Inhibitors from the stems of *Streblus ilicifolius*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 5561176; <https://doi.org/10.1155/2021/5561176>.
5. Nguyen N. T., Nguyen H. X., Le T. H., Nguyen D. H., Do T. N. V., Dang P. H., Nguyen T. T. M. (2022), Two new derivatives of 8-prenyl-5,7-dihydroxycoumarin from the stems of *Streblus ilicifolius* (S. Vidal) Com., *Natural Product Research*, 36(19), 4967-4972; <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1914611>.
6. Dej-adisai S., Pamdaeng K., Wattanapiromsakul C. (2016), Determination of phytochemical compounds, and tyrosinase inhibitory and antimicrobial activities of bioactive compounds from *Streblus ilicifolius* (S. Vidal) Corner, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(3), 497-506; <https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i3.10>.
7. Flora of China (2024), *Streblus ilicifolius* (Vidal) Corner (www.efloras.org).
8. Ciulei I., Practical manuals on the industrial utilization of medicinal and aromatic plants I. Methodology for analysis of vegetable drugs (1982), Bucharest: Faculty of Pharmacy, University of Rumania, 1, 1-67.
9. Jeong J. W., Jin C. Y., Kim G. Y., Lee J. D., Park C., Kim G. D., Kim W. J., Jung W. K., Seo S. K., Choi I. W., Choi Y. H. (2010), Anti-inflammatory effects of cordycepin via suppression of inflammatory mediators in BV2 microglial cells, *International Immunopharmacology*, 10(12), 1580-1586; <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.09.011>.
10. Roy D. K., Panday S., Sinha B. K., Sawmliana M. (2013), Taxonomic note on *Streblus* Lour. (Moraceae) in Northeast India, *International Journal of Environment and Biodiversity*, 4(2), 2278-2281.

Tạp chí Dược liệu, tập 29, số 4/2024 (Trang 234 - 239)

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CỦA ÍCH MẪU TRONG CHẢY MÁU ÂM ĐẠO TRÊN MÔ HÌNH CHUỘT THỰC NGHIỆM

**Đinh Thị Minh¹, Đặng Ngọc Tuấn Anh², Đinh Thị Huyền Trang³,
Vũ Minh Châu², Nguyễn Thị Thu Trang¹, Lê Khánh Duy¹, Phạm Thị Nguyệt Hằng^{1,4,*}**

¹Viện Dược liệu; ²Trường Đại học Dược Hà Nội; ³Trường Đại học Vinh;

⁴Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

*Email: nguyethangpt@nimm.org.vn

(Nhận bài ngày 11 tháng 12 năm 2023)

Tóm tắt

Nghiên cứu đã đánh giá được tác dụng theo hướng progesteron của chiết xuất từ phần trên mặt đất của dược liệu ích mẫu (cao chiết nước và cao chiết cồn 70%) trong mô hình kinh nguyệt như ở người của chuột thực nghiệm, được ứng dụng trong điều trị rong kinh, chảy máu âm đạo. Kết quả nghiên cứu ở ngày 12 cho thấy rằng, chuột chảy máu âm đạo được điều trị bằng cao chiết nước từ ích mẫu liều 1600 mg/kg, cao chiết cồn 70% từ ích mẫu liều 800 mg/kg và chứng dương progesteron 50 mg/kg có tác dụng cải thiện rõ rệt các triệu chứng bệnh lý, đó là làm tăng nồng độ progesteron, kéo theo là giảm số lượng tế bào sừng ở vết phết âm đạo, tăng chiều dày niêm mạc tử cung, giảm trọng lượng tử cung - buồng trứng theo chiều hướng hồi phục và hơn nữa khi quan sát hình thái mô học tử cung cho thấy tăng số lượng tuyến, niêm mạc chỉ còn bong tróc nhẹ. Tóm lại, ích mẫu có tác dụng tương tự với thuốc progesteron trong mô hình chảy máu âm đạo và ứng dụng trong điều trị rong kinh. Kết quả này rất hữu ích trong nghiên cứu cơ chế và ứng dụng của dược liệu ích mẫu theo hướng progesteron trong điều trị bệnh phụ nữ.

Từ khóa: Chảy máu âm đạo, *Leonurus japonicus* Houtt, Progesterone, Niêm mạc tử cung, Rong kinh.

Summary

Studying the Effects of *Leonurus japonicus* Houtt on Vaginal Bleeding in an Experimental Mouse Model

The study evaluated the effects of extracts from the aerial parts of *Leonurus japonicus* Houtt (water and 70% ethanol extracts) in mice for the treatment of menorrhagia and vaginal bleeding. Results on day 12 showed that mice with vaginal bleeding were treated with water extract at a dose of 1600 mg/kg, or 70% ethanol extract at a dose of 800 mg/kg, or progesterone 50 mg/kg significantly reduced pathological symptoms. There was an increase in the dose of progesterone, leading to decreased number of keratinocytes in vaginal smears, increased endometrium thickness, reduced weight of the uterus - ovaries and additionally, histological morphology of the uterus showed an increase in the number of glands, and the endometrium was only slightly peeling. In summary, *Leonurus japonicus* Houtt extracts have similar effects to progesterone in the vaginal bleeding model when applied for the treatment of menorrhagia.

Keywords: Vaginal bleeding, *Leonurus japonicus* Houtt, Progesterone, Uterine lining, Menorrhagia.

1. Đặt vấn đề

Ích mẫu (*Leonurus japonicus* Houtt) được dùng làm thuốc chữa bệnh từ lâu đời, nhất là đối

với phụ nữ sau khi sinh, chữa rong kinh, rong huyết, tử cung co hồi không tốt; rối loạn kinh nguyệt, đau bụng kinh, chảy máu âm đạo [1]. Do

tác dụng hiệu quả tốt của ích mẫu đối với các bệnh của phụ nữ, các nhà nghiên cứu đã bắt đầu quan tâm nhiều đến cây này và tiến hành nghiên cứu sâu hơn về các thành phần hóa học và tác dụng dược lý của nó. Một số nghiên cứu trên thực nghiệm đã chứng minh được ích mẫu có tác dụng điều trị rối loạn xuất huyết tử cung, các thí nghiệm *in vivo* cho thấy rằng điều trị bằng leonurin hydroclorid, một hợp chất chiết xuất từ ích mẫu, đã làm giảm thể tích và thời gian chảy máu ở chuột bị sảy thai [2]. Cao chiết cồn 70% và cao chiết nước từ cây ích mẫu đã được chứng minh có tác dụng kiểu estrogen [3]. Tuy nhiên chưa có công trình nghiên cứu theo hướng tác dụng progesteron, cụ thể là trong điều trị chảy máu âm đạo, rong kinh. Chính vì thế, chúng tôi muốn nghiên cứu chứng minh tác dụng của ích mẫu trong điều trị chảy máu âm đạo, rong kinh trên mô hình kinh nguyệt như ở người của chuột nhắt trắng để đi sâu vào hướng tác dụng progesteron thông qua các tiêu chí: Số lượng tế bào sừng ở vết phết âm đạo, nồng độ progesteron trong huyết thanh, khối lượng tử cung - buồng trứng, hình thái và bề dày niêm mạc tử cung chuột.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

❖ Mẫu thử:

Phần trên mặt đất của cây ích mẫu được thu hái tại Bắc Giang (tháng 5/2022) và được xác định đúng tên khoa học là *Leonurus japonicus* Houtt bởi Trung tâm Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu. Quy trình chiết ethanol 70% và chiết nước từ phần trên mặt đất của cây ích mẫu được mô tả tóm tắt như sau:

Quy trình chiết cao ethanol 70% từ ích mẫu (ký hiệu mẫu là IME): Lá và cành khô của cây ích mẫu được cắt thành từng đoạn. 1 kg dược liệu ích mẫu được chiết với 10 L ethanol 70%, trong thời gian 2,5 h ở nhiệt độ hồi lưu của dung môi, lọc thu lấy dịch. Phần bã được chiết tiếp hai lần nữa với ethanol 70% (8 L và 8 L) ở nhiệt độ hồi lưu của dung môi trong khoảng thời gian tương ứng là 2 h và 1,5 h. Dịch lọc của 3 lần chiết được gộp lại, cất thu hồi ethanol dưới áp suất giảm, sau đó cô trên bếp cách thủy và cuối cùng là sấy trong tủ sấy chân không thu được 104,14 g cao, độ ẩm cao 2,81%. Hiệu suất chiết cao đạt 10,41%.

Quy trình chiết cao nước từ ích mẫu (ký hiệu mẫu là IMW): 0,6 kg dược liệu ích mẫu được chiết với 6 L nước, trong thời gian 2,5 h ở nhiệt độ 95°C, lọc thu lấy dịch. Phần bã được chiết tiếp hai lần nữa với nước (4,8 L và 4,8 L) ở nhiệt độ 95°C trong khoảng thời gian tương ứng là 2 h và 1,5 h. Dịch lọc của 3 lần chiết được gộp lại cô cạn bằng bếp cách thủy và sấy trong tủ sấy chân không thu được 76,68 g cao, độ ẩm cao 2,86%. Hiệu suất chiết cao đạt 12,78%.

Liều sử dụng trên chuột được quy đổi tương đương với liều sử dụng trên người trong dân gian đó là: Cao chiết cồn ích mẫu liều 600 mg/kg và 800 mg/kg, cao chiết nước liều 800 mg/kg và 1600 mg/kg.

❖ Động vật nghiên cứu

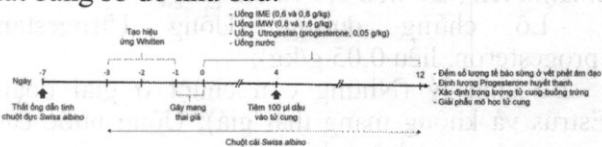
Chuột nhắt trắng cả đực và cái 8-10 tuần tuổi (35-40 g), chủng *Swiss albino* khỏe mạnh đạt tiêu chuẩn thí nghiệm được Viện Vệ sinh Dịch tễ trung ương cung cấp. Điều kiện phòng thí nghiệm nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$, độ ẩm $65 \pm 5\%$, chu kỳ sáng và tối là 12/12 (chu kỳ sáng từ 7:00 đến 19:00 giờ), thức ăn và nước uống được cung cấp đầy đủ. Chuột được nuôi ổn định 5 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm.

❖ Hóa chất thử nghiệm

Utrogestan 100 mg (Besins, Pháp) có chứa progesteron được sử dụng làm đối chứng dương với mức liều 0,05 g/kg (phân tán trong Span 20 và pha trong CMC 0.5 %). Kit định lượng progesteron (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ). Dầu mè (Sesame oil) tiêm vào tử cung (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ). Thuốc nhuộm Hematoxylin (Merck, Đức) và Eosin (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Mô hình gây kinh nguyệt như ở người trên chuột nhắt trắng được mô phỏng theo Marion Rudolph, 2012 [4]. Thiết kế thí nghiệm được tóm tắt bằng sơ đồ như sau:



Hình 1. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm

2.2.1. Phương pháp thắt ống dẫn tinh trên chuột nhắt trắng:

Quy trình phẫu thuật thắt ống dẫn tinh 2 bên của chuột đực 8-10 tuần tuổi:

Gây mê chuột bằng tiêm phúc mạc pentobarbital với liều 50 mg/kg. Đặt chuột nằm sấp, bộc lộ và sát trùng vùng mô. Sau đó, mổ bộc lộ với đường mổ gọn dọc theo hai bên cột sống, dài 1cm, cách cột sống 0,5 cm, cách gốc đuôi 3 cm sau đó qua da, lớp dưới da, lớp cơ, gạt bỏ lớp tổ chức mỡ sẽ thấy ống dẫn tinh và tiến hành thắt ống dẫn tinh bằng cách dùng kẹp hơ nóng. Khâu tổ chức liên kết, cân cơ thành bụng, lợp theo lớp; khâu da và sát trùng tại chỗ bằng dung dịch betadin 10%.

Chuột sau phẫu thuật được đưa vào chuồng ủ ấm và theo dõi sau mổ đến khi động vật tỉnh táo trở lại.

2.2.2. Tạo hiệu ứng Whitten:

Hiệu ứng Whitten được tiến hành theo Whitten WK (1968) [5] đối với chuột đực bị thắt ống dẫn tinh sau 1 tuần và chuột cái 8-10 tuần tuổi khỏe mạnh. Hai ngày trước khi giao phối với những con đực đã thắt ống dẫn tinh, đặt những

con chuột đực khỏe mạnh phía trên những con chuột cái trong 48 giờ để gây động dục. Động dục gây ra bởi Pheromon, thành phần của nước tiểu chuột nhắt đực (hiệu ứng Whitten). Quan sát trạng thái và độ mở của âm đạo bằng kính lúp để quan sát các dấu hiệu tiền động dục Proestrus: Âm đạo mở, các mô có màu hồng đỏ, ẩm ướt và có nhiều nếp gấp chạy dọc theo chiều dọc của 2 môi âm vật; và giai đoạn động dục Estrus: các dấu hiệu tương tự như proestrus nhưng các mô có màu hồng sáng hơn và ít ẩm ướt, các nếp gấp cũng rõ ràng hơn. Lựa chọn những con chuột ở giai đoạn Estrus để tiến hành các bước tiếp theo.

2.2.3. Đánh giá tác dụng của cao chiết từ ích mẫu trong chảy máu âm đạo ở chuột trên mô hình kinh nguyệt như ở người trên chuột nhắt trắng:

Cho chuột cái động dục giao phối qua đêm với chuột đực thất ống dẫn tinh ở trên, những con chuột cái mang thai giả được chọn dựa trên sự hiện diện của một nút âm đạo. Những con chuột cái mang thai giả (ngày 0) được lựa chọn và chia ngẫu nhiên thành các lô thử nghiệm, mỗi lô có 6 con:

- Lô bệnh lý: Uống nước cất trong suốt quá trình nghiên cứu;

- Lô điều trị IMW 0,8 và 1,6: Uống cao chiết nước từ ích mẫu liều tương ứng là 0,8 và 1,6 g/kg;

- Lô điều trị IME 0,6 và 0,8: Uống cao chiết ethanol ích mẫu liều 0,6 và 0,8 g/kg;

- Lô chứng dương: Uống Utrogestan (progesteron, liều 0,05 g/kg);

Lô sinh lý (Những con chuột ở giai đoạn Estrus và không mang thai giả): Uống nước cất trong suốt quá trình nghiên cứu.

Quá trình rụng nội mạc tử cung được tạo ra bằng cách tiêm 100 μ L dầu vào tử cung vào ngày thứ 4 của thai kỳ giả. Chuột các lô được uống mẫu thử nghiệm hoặc đối chứng dương, hoặc uống nước liên tục trong 12 ngày với thể tích 10 mL/kg thể trọng chuột. Ở ngày thử 12, 1 giờ sau khi điều trị, chuột được tiến hành đánh giá các thông số như sau:

❖ *Đánh giá mức độ bong lớp niêm mạc tử cung thông qua số lượng tế bào sừng*

Đánh giá mức độ tổn thương của niêm mạc tử cung được xác định bằng cách đếm số lượng tế bào sừng [6]. Rửa âm đạo với 40 μ L PBS. 3 μ L dịch rửa được nhỏ trên phiến kính, làm khô và nhuộm H&E (hematoxylin và eosin). Đếm số lượng tế bào sừng của mỗi tiêu bản ở 5 vị trí ngẫu nhiên và tính giá trị trung bình.

❖ *Định lượng progesteron huyết thanh chuột bằng kỹ thuật ELISA*

Định lượng theo hướng dẫn của quy trình Kit progesteron (Thermo Fisher Scientific). Nồng độ progesteron trong mẫu được tham chiếu trên đường cong chuẩn. Tiến hành lấy máu đuôi chuột

để định lượng nồng độ progesteron trong huyết thanh vào ngày 12.

❖ *Giải phẫu mô học tử cung chuột*

Cân xác định trọng lượng tử cung-buồng trứng và tiến hành giải phẫu mô học tử cung: Tử cung được cố định bằng formaldehyd 4% pha trong đệm PBS. Thực hiện chuyển mẫu, đúc parafin, cắt lát tiêu bản độ dày 5 μ m. Sau đó nhuộm H&E và quan sát hình thái và độ dày tử cung dưới kính hiển vi quang học. Mỗi lô tiến hành đánh giá trên 6 con chuột, 3 lát cắt/1 con chuột.

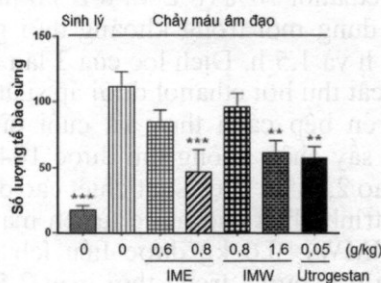
❖ *Xử lý số liệu*

Các số liệu được trình bày ở dạng kết quả trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Phân tích thống kê được tính toán bằng phần mềm Sigmaplot 12.0, sử dụng phép tiêu chuẩn Student's t-test hoặc phương pháp phân tích one-way analysis of variance (ANOVA) tiếp theo bằng post hoc test (Student-Newman-Keul's method) hoặc two-way ANOVA, kiểm định Mann-Whitney tùy từng trường hợp cụ thể.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. *Kết quả đánh giá tác dụng của cao chiết ích mẫu đến mức độ bong của niêm mạc tử cung thông qua số lượng tế bào sừng của chuột chảy máu âm đạo*

Chảy máu tử cung được kích hoạt bởi sự giảm tự nhiên của progesteron nội sinh [7]. Số lượng tế bào sừng tăng lên khi nồng độ progesteron giảm xuống [8]. Khi có nhiều tế bào biểu mô bị sừng hóa mất nhân, có sự bong tróc dần các lớp sừng hóa và giảm độ dày lớp niêm mạc tử cung, sẽ gây chảy máu [6]. Do vậy, thử nghiệm này là tiêu chí quan trọng để nghiên cứu chẩn đoán bệnh và đánh giá tác dụng cao chiết từ ích mẫu có tác dụng điều trị chảy máu âm đạo. Số lượng tế bào sừng được tính trung bình của 5 vị trí ngẫu nhiên trên tiêu bản. Kết quả được thể hiện trong Hình 2:



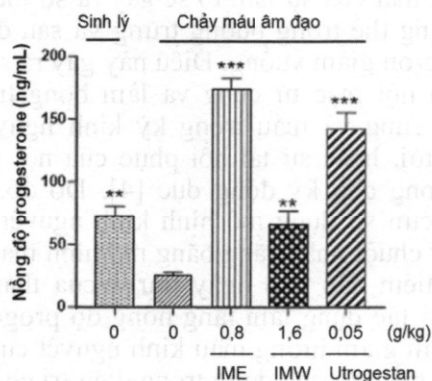
Hình 2. Tác dụng cải thiện tổn thương lớp niêm mạc tử cung của cao chiết từ ích mẫu trên mô hình chảy máu âm đạo ở chuột ($n = 6$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ so với lô bệnh lý (chuột chảy máu âm đạo và uống nước); Chuột bị chảy máu âm đạo được điều trị bằng cao chiết ethanol (IME, liều 0,6 và 0,8 g/kg) hoặc cao chiết nước (IMW, liều 0,8 và 1,6 mg/kg) hoặc Utrogestan (0,05 g/kg) liên tục trong 12 ngày.

Kết quả Hình 2 cho thấy số lượng tế bào sừng ở vết phết âm đạo ngày 12 lô bệnh lý cao hơn so với lô sinh lý, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Số lượng tế bào sừng ở lô điều trị bằng các cao chiết ethanol và nước với các mức liều lần lượt là 0,6 g/kg và 0,8 g/kg đều có xu hướng thấp hơn lô bệnh lý, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Ở hai mức liều cao hơn (0,8 g/kg đối với cao chiết ethanol và 1,6 g/kg đối với cao chiết nước) đều có tác dụng giảm mạnh số lượng tế bào sừng của chuột bị chảy máu âm đạo, với giá trị p lần lượt $< 0,001$ và 0,01. Chuột được điều trị bằng Utrogestan (0,05 g/kg) có số lượng tế bào sừng thấp hơn so với lô bệnh lý, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$).

Từ kết quả trên nhận thấy, cao chiết ethanol và nước từ ích mẫu với mức liều lần lượt là 0,8 và 1,6 g/kg có tác dụng làm giảm số lượng tế bào sừng ở vết phết âm đạo liên quan đến giảm sự bong tróc lớp niêm mạc tử cung trong mô hình chảy máu âm đạo ở chuột. Do đó, chúng tôi sử dụng 2 mức liều này để tiếp tục đánh giá tác dụng sâu hơn ở chuột bị chảy máu âm đạo.

3.2. Kết quả đánh giá tác dụng của cao chiết từ ích mẫu lên nồng độ progesteron trong huyết thanh của chuột chảy máu âm đạo

Progesteron đã được chứng minh có tác dụng rất hiệu quả trong điều trị chảy máu âm đạo, rong kinh [9]. Do đó, định lượng nồng độ progesteron trong huyết thanh là tiêu chí quan trọng để đánh giá hiệu quả điều trị của cao chiết từ ích mẫu. Tiến hành định lượng nồng độ progesteron trong huyết thanh ở ngày 12 bằng phương pháp ELISA, nhóm nghiên cứu thu được kết quả như Hình 3:



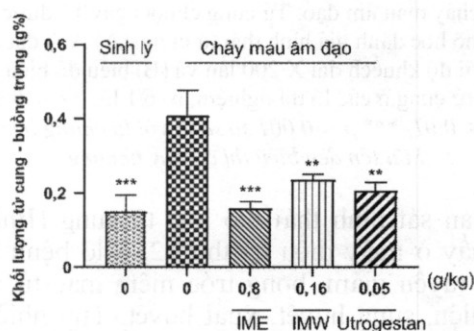
Hình 3. Kết quả khảo sát tác dụng của các cao chiết từ ích mẫu trên nồng độ progesteron trong huyết tương của chuột chảy máu âm đạo. $n=6$ / lô; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ so với lô chứng bệnh lý

Kết quả Hình 3 cho thấy ở ngày điều trị thứ 12, nồng độ progesteron ở lô bệnh lý thấp hơn lô sinh lý với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p <$

0,01). Lô chuột điều trị bằng cao chiết ethanol và cao chiết nước với mức liều lần lượt là 0,8 và 1,6 mg/kg đều có tác dụng phục hồi đáng kể sự giảm nồng độ progesteron huyết thanh ở chuột chảy máu âm đạo đạt ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$ và 0,01. Lô chuột được điều trị bằng IME 0,8 g/kg có nồng độ progesteron cao hơn đáng kể ($p < 0,001$) so với lô chuột được điều trị bằng IMW 1,6 g/kg. Thuốc đối chứng dương Utrogestan (liều 0,05 g/kg) cũng có tác dụng phục hồi đáng kể sự giảm progesteron gây bởi chảy máu âm đạo chuột nhất trắng ($p < 0,001$). Hơn nữa, lô chuột được điều trị bằng IME 0,8 g/kg có nồng độ progesteron cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với lô chuột được điều trị bằng thuốc đối chứng dương Utrogestan (liều 0,05 g/kg).

3.3. Tác dụng của cao chiết từ ích mẫu lên trọng lượng tử cung- buồng trứng của chuột chảy máu âm đạo

Khi nồng độ progesteron trong huyết thanh giảm đáng kể thì kích thước tử cung tăng lên và to ra rất nhiều [4]. Do đó, trọng lượng tử cung- buồng trứng là tiêu chí để đánh giá tác dụng làm tăng nồng độ progesteron của cao chiết ích mẫu trong tác dụng điều trị chảy máu âm đạo. Vào ngày 12, tiến hành mổ chuột lấy và cân trọng lượng tử cung- buồng trứng nhóm nghiên cứu thu được kết quả như sau:



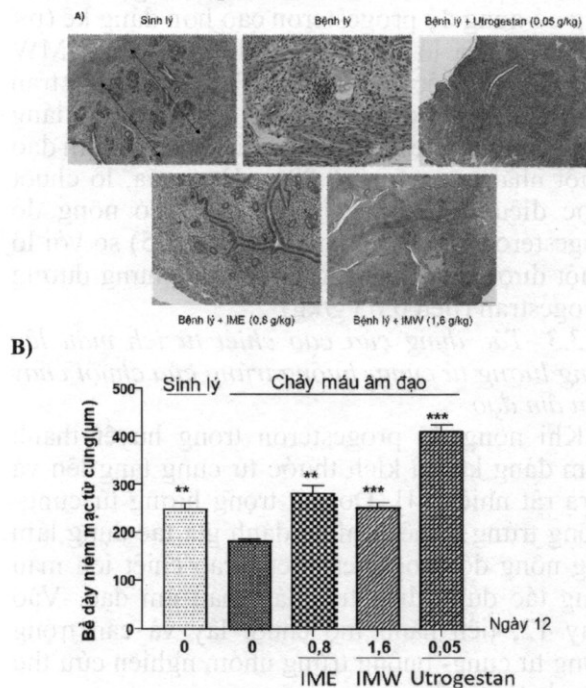
Hình 4. Tác dụng của cao chiết từ ích mẫu đến trọng lượng tử cung- buồng trứng trên chuột chảy máu âm đạo. $n=6$ cá thể/ lô; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ so với lô chứng bệnh lý

Kết quả Hình 4 cho thấy ở ngày 12 sau khi gây mang thai giả, lô chuột bệnh lý có khối lượng tử cung- buồng trứng tăng rõ lên so với lô sinh lý ($p < 0,001$). Ở lô chuột chảy máu âm đạo được điều trị cao chiết ethanol và cao chiết nước ích mẫu (0,8 g/kg) cũng như Utrogestan đều có khối lượng tử cung- buồng trứng giảm đáng kể so với lô bệnh lý với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (với giá trị p lần lượt $< 0,001$ và 0,01).

3.4. Tác dụng của cao chiết từ ích mẫu lên mô học tử cung trên mô hình chuột chảy máu âm đạo

Trong chu kỳ kinh nguyệt, nồng độ

progesteron giảm xuống nhiều thì lớp niêm mạc tử cung càng mỏng, niêm mạc tử cung bong ra và máu chảy ra càng nhiều [10]. Do đó, để đánh giá tác dụng cải thiện chảy máu âm đạo nhóm nghiên cứu tiến hành đánh giá mô học tử cung ở ngày 12 và thu được kết quả như sau:



Hình 5. Tác dụng của cao chiết từ ích mẫu trên tử cung chuột chảy máu âm đạo. Tử cung chuột ngày 12 được phân tích mô học đánh giá hình thái tử cung. (A) Ảnh đại diện chụp với độ khuếch đại X 200 lần và (B) biểu đồ biểu thị độ dày tử cung ở các lô thí nghiệm; n=6/1 lô; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ so sánh với lô chứng bệnh lý; Mũi tên đen biểu thị độ dày tử cung.

Quan sát hình thái mô học tử cung Hình 5A cho thấy ở ngày điều trị thứ 12, ở lô bệnh lý số lượng tuyến giảm, bong tróc niêm mạc tử cung, xuất hiện, sung huyết, xuất huyết. Tuy nhiên, lô chuột chảy máu âm đạo được điều trị bằng cao chiết nước ích mẫu liều 1,6 g/kg có số lượng tuyến tăng, sung huyết nhẹ, không xuất huyết. Ở lô chuột chảy máu âm đạo được điều trị bằng cao chiết ethanol ích mẫu liều 0,8 mg/kg và Utrogestan liều 0,05 g/kg có số lượng tuyến tăng, không còn hiện tượng sung huyết, xuất huyết, niêm mạc khá dày.

Kết quả Hình 5B cho thấy, bề dày niêm mạc tử cung ở lô bệnh lý thấp hơn lô sinh lý, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$); chuột chảy máu âm đạo được điều trị cao chiết ethanol và cao chiết nước ích mẫu với mức liều lần lượt là 1,6 và 0,8 g/kg có độ dày niêm mạc tử cung tăng lên đáng kể so với lô bệnh lý ($p < 0,01$) nhưng vẫn thấp hơn đáng kể ($p < 0,001$) so với chuột được điều trị bằng Utrogestan. Ở lô chuột

chảy máu âm đạo được điều trị bằng Utrogestan, độ dày niêm mạc tử cung tăng nhiều so với lô bệnh lý với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

4. Bàn luận

Chảy máu kinh nguyệt nặng (HMB) là thuật ngữ hiện được sử dụng thay cho rong kinh. FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics - Liên đoàn sản phụ khoa quốc tế) đã tạo ra hệ thống phân loại PALM-COEIN để xác định nguyên nhân gây chảy máu tử cung bất thường (AUB). Hầu hết phụ nữ bị rong kinh đều có nội mạc tử cung về mặt mô học bình thường; chỉ có trường hợp ngoại lệ là polyp hoặc các tổn thương khác của nội mạc tử cung mới gây chảy máu quá nhiều. Việc giảm lượng máu mất đi do rong kinh giảm đáng kể khi dùng progesteron. Vì vậy sử dụng progesteron trong điều trị rong kinh rất hiệu quả [9]. Do đó, định hướng điều trị rong kinh, chảy máu âm đạo của ích mẫu theo hướng progesteron rất phù hợp.

Ở người có chu kỳ kinh nguyệt, thì ở chuột có chu kỳ động dục. Cả hai chu kỳ sinh sản đều liên quan đến sự tăng sinh của các tế bào biểu mô và sự rụng trứng, sau đó là sự hình thành thể vàng sản xuất progesteron trong buồng trứng. Tuy nhiên, trong chu kỳ kinh nguyệt, các tế bào biểu mô nội mạc tử cung biệt hóa thành các tế bào hình trứng để đáp ứng với mức progesteron tăng nhanh mặc dù không có phôi nang. Ngược lại, trong chu kỳ động dục sự rụng trứng chỉ xảy ra sau khi thụ thai, ví dụ: ở chuột, nó bắt đầu vào ngày thứ 4 sau khi thụ thai, khi các tế bào biểu mô nội mạc tử cung bao quanh phôi nang [4],[11]. Trong cả chu kỳ kinh nguyệt và chu kỳ động dục, sự vắng mặt của sự làm tổ sẽ gây ra sự thoái hóa của hoàng thể trong buồng trứng và sau đó mức progesteron giảm xuống. Điều này gây ra sự phân hủy mô nội mạc tử cung và làm bong tróc nội mạc tử cung và máu trong kỳ kinh nguyệt của con người, hoặc sự tái hồi phục của nội mạc tử cung trong chu kỳ động dục [4]. Do đó, nhóm nghiên cứu sử dụng mô hình kinh nguyệt như ở người ở chuột nhất trắng bằng mô hình mang thai giả và tiêm đầu vào ngày thứ 4 của thai kỳ để đánh giá tác dụng làm tăng nồng độ progesteron từ đó làm giảm lượng máu kinh nguyệt của được liệu ích mẫu để ứng dụng trong điều trị chảy máu âm đạo, rong kinh.

Theo mô hình của Marion Rudolph, 2012 thì ngày 9 chuột chảy máu nhiều, progesteron giảm thấp nhất và tự phục hồi vào ngày 12 [4]. Tuy nhiên, qua khảo sát ở lô bệnh lý về số lượng tế bào sừng ở vết phết âm đạo từ ngày 6 đến ngày 15 nhóm nghiên cứu nhận thấy ở ngày 12 số lượng tế bào sừng tăng nhiều nhất, chuột xuất

huyết máu ra bên ngoài âm đạo, ngày 15 xảy ra quá trình tự hồi phục. Điều này có thể được giải thích do sự khác nhau về chủng chuột của các nghiên cứu. Do vậy, nhóm nghiên cứu đánh giá các chỉ số ở ngày 12.

Liệu pháp progesteron tuần hoàn cho 14 ngày, dùng dưới dạng norethindron acetat hoặc medroxyprogesteron acetat đường uống làm giảm lượng máu kinh nguyệt chỉ ở 2% đến 30% phụ nữ. Tuy nhiên, khi dùng liệu trình dài hạn trong 21 ngày, bắt đầu từ ngày thứ 5 sau khi khởi phát kinh nguyệt, chúng làm giảm mất máu kinh nguyệt ở 63% đến 78% phụ nữ [12]. Vì thế, nhóm nghiên cứu cho các lô chuột chảy máu âm đạo uống thuốc từ ngày 0 đến ngày 12.

Progesteron được sử dụng để điều hòa chảy máu giữa kỳ kinh và giảm chảy máu kinh nguyệt nặng (HMB) ở phụ nữ trong độ tuổi sinh sản hoặc tiền mãn kinh. Việc sử dụng progesteron và các chất tương tự trong điều trị AUB và rối loạn kinh nguyệt đã được chứng minh rõ ràng. Progesteron đóng vai trò then chốt trong việc kiểm soát AUB, giảm và ngừng chảy máu kinh nguyệt quá nhiều khi nồng độ progesteron tăng lên trong cơ thể [13]. Kết quả cho thấy lô chuột được điều trị bằng IMW mức liều 1,6 g/kg và IME mức liều 0,8 g/kg có tác dụng làm tăng nồng độ progesteron ở chuột chảy máu âm đạo. Trên thực nghiệm, quan sát được các tế bào biểu mô phân hủy và bong tróc khỏi nội mạc tử cung khi nồng độ progesteron giảm xuống [14]. Kết quả hoàn toàn phù hợp trên số lượng tế bào sừng giảm xuống đối với chuột chảy máu âm đạo được điều trị bằng cao chiết nước liều 1,6 g/kg, cao chiết cồn liều 0,8 g/kg từ dược liệu ích mẫu. Tuy nhiên, lô chuột được điều trị bằng cao chiết nước 0,8 g/kg, cao chiết cồn 0,6 g/kg từ dược liệu ích

mẫu chưa có tác dụng làm giảm rõ số lượng tế bào sừng, có thể giải thích rằng tác dụng cải thiện chảy máu âm đạo phụ thuộc vào liều sử dụng của ích mẫu. Tương tự, khi nồng độ progesteron trong huyết thanh giảm đáng kể thì kích thước tử cung tăng lên và to ra rất nhiều [4]. Kết quả thu được hoàn toàn phù hợp khi lô chuột được điều trị bằng cao chiết nước 1,6 g/kg, cao chiết cồn 0,8 g/kg từ dược liệu ích mẫu có tác dụng làm giảm trọng lượng tử cung. Hơn nữa, progesteron được chứng minh liên quan mật thiết tới bề dày niêm mạc tử cung. Khi progesteron giảm đột ngột gây ra hiện tượng hành kinh, bề dày niêm mạc tử cung chỉ còn lại một lớp mỏng của mô đệm và sót lại một ít tế bào biểu mô nằm tại đáy các tuyến. Niêm mạc tử cung bị thoái hóa tới 65% chiều dày [10]. Kết quả ở trên cũng cho thấy cao chiết từ ích mẫu có tác dụng làm tăng bề dày, và giảm bong tróc niêm mạc tử cung ở chuột chảy máu âm đạo.

4. Kết luận

Từ những kết quả thu được có thể kết luận rằng ích mẫu có tác dụng theo hướng progesteron, được chứng minh thông qua các chỉ số bao gồm: giảm bong tróc lớp niêm mạc tử cung, giảm sự phình to của tử cung - buồng trứng từ đó làm giảm chảy máu âm đạo. Những kết quả này đã cho thấy tiềm năng của ích mẫu trong điều trị rong kinh.

Lời cảm ơn: Kết quả thu được trong nghiên cứu này là sản phẩm của đề tài cấp Viện dược liệu (2021-2023): “Triển khai mô hình kinh nguyệt như ở người trên chuột nhắt trắng và áp dụng đánh giá, nghiên cứu tác dụng dược liệu ích mẫu (*Leonurus japonicus* Houtt) và họ kè (*Haplopteris flexuosa* (Fée) E.H.Crane) trong chảy máu âm đạo ở chuột”.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Tất Lợi (2004), *Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học, 30-33.
2. de Boer H. J., Cotingting C. (2014), Medicinal plants for women's healthcare in southeast Asia: a meta-analysis of their traditional use, chemical constituents, and pharmacology, *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 747-67.
3. Nguyễn Thị Thanh Hải, Nguyễn Thị Thu Hương (2012), Tác dụng kiểu nội tiết tố sinh dục nữ của các cao chiết từ cây ích mẫu, *Tạp chí Dược liệu*, 17(6), 352-358.
4. Rudolph M., Döcke W. D., Müller A., Menning A., Röse L., Zollner T. M., Gashaw I. (2012), Induction of overt menstruation in intact mice, *PLoS One*, 7(3), e32922.
5. Whitten W. K., Bronson F. H., Greenstein J. A. (1968), Estrus-inducing pheromone of male mice: transport by movement of air, *Science*, 161(3841), 584-5.
6. Ajayi A. F., Akhigbe R. E. (2020), Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update, *Fertility Research and Practice*, 6, 5.
7. Salamonsen L. A., Findlay J. K. (1990), Regulation of endometrial prostaglandins during the menstrual cycle and in early pregnancy, *Reproduction, Fertility and Development*, 2(5), 443-57.
8. Goldman J. M., Murr A. S., Cooper R. L. (2007), The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies, *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2), 84-97.
9. Bergavist A., Rybo G. (1983), Treatment of menorrhagia with intrauterine release of progesterone, *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 90(3), 255-8.
10. PGS Trịnh Bình Dy (2005), *Sinh lý học tập II*, Đại học Y Hà Nội, NXB Y học, 144-148.
11. Kaitu'u-Lino T. J., Ye L., Gargett C. E. (2010), Reepithelialization of the uterine surface arises from endometrial glands: evidence from a functional mouse model of breakdown and repair, *Endocrinology*, 151(7), 3386-95.
12. DiPiro J., Talbert R., Yee G., Matzke G., Wells B., Posey L. M. (2020), *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach* 11th Edition, McGraw Hill, 3899-3900.
13. Jewson M., Purohit P., Lumsden M. A. (2020), Progesterone and abnormal uterine bleeding/menstrual disorders, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 69, 62-73.
14. Xu X. B., He B., Wang J. D. (2007), Menstrual-like changes in mice are provoked through the pharmacologic withdrawal of progesterone using mifepristone following induction of decidualization, *Human Reproduction*, 22(12), 3184-91.