

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM**



**LỮ ĐOÀN HOẠT MƯỜI**

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG BẢO VỆ VÀ HIỆU QUẢ  
PHỤC HỒI SUY GIẢM CHỨC NĂNG BUỒNG TRÚNG  
CỦA BÀI THUỐC HV TRÊN MÔ HÌNH THỰC NGHIỆM**

**LUẬN VĂN THẠC SỸ Y KHOA**

**HÀ NỘI – 2020**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM**



**LỮ ĐOÀN HOẠT MƯỜI**

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG BẢO VỆ VÀ HIỆU QUẢ  
PHỤC HỒI SUY GIẢM CHỨC NĂNG BUỒNG TRÚNG  
CỦA BÀI THUỐC HV TRÊN MÔ HÌNH THỰC NGHIỆM**

**Chuyên ngành: Y học cổ truyền**

**Mã số: 8720115**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ Y KHOA**

**Người hướng dẫn khoa học:**

- 1. PGS. TS. Nguyễn Hoàng Ngân**
- 2. PGS. TS. Đoàn Minh Thụy**

**HÀ NỘI - 2020**

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, tôi xin trân trọng bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới:

Đảng ủy, Ban Giám đốc, Phòng đào tạo Sau Đại học, Bộ môn Ngoại, Khoa phòng Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, Bộ môn Dược lý – Học viện Quân Y, Khoa giải phẫu bệnh – Bệnh viện 103 đã tạo mọi điều kiện cả về vật chất lẫn tinh thần cho tôi hoàn thành khóa học.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Nguyễn Hoàng Ngân, PGS. TS. Đoàn Minh Thụy hai người Thầy đã trực tiếp hướng dẫn vô cùng tận tình, trang bị cho tôi kiến thức chuyên ngành, giúp đỡ tôi sửa chữa thiếu sót trong luận văn, động viên tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu. Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn các thầy cô trong Hội đồng thông qua đề cương luận văn đã cho tôi những ý kiến đóng góp quý báu trong quá trình hoàn thiện luận văn này.

Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới bố mẹ, gia đình và người thân, bạn bè đồng nghiệp đã luôn động viên, khích lệ tôi để vượt qua những khó khăn trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Xin trân trọng cảm ơn !

**Học viên**

**Lữ Đoàn Hoạt Mười**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Lữ Đoàn Hoạ Mười, học viên cao học khóa 11 Học viện Y Dược học Cổ truyền Việt Nam, chuyên ngành Y học cổ truyền, xin cam đoan:

1. Đây là luận văn do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Thầy PGS.TS. Nguyễn Hoàng Ngân và PGS.TS. Đoàn Minh Thụy.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày 30 tháng 10 năm 2020*

**Học viên**

**Lữ Đoàn Hoạ Mười**

## DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

AFC	: Antral Follicle Count
BMI	: Body Mass Index
E2	: Estradiol
FSH	: Follicle stimulating Hormone
GALT	: Galactose-1-phosphate uridine transferase
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormone
hCG	: Human Chorionic Gonadotropin
hMG	: Human Menopausal Gonadotropin
KO	: Mô hình loại trực tiếp
LH	: Luteinizing Hormone
POI	: Premature ovarian insufficiency
SGCNBT	: Suy giảm chức năng buồng trứng
TG	: Tripterygiumglycoside
YHCT	: Y học cổ truyền
YHĐ	: Y học hiện đại
ZP	: Zona pellucida

## MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1: TỔNG QUAN.....</b>	<b>3</b>
1.1. Suy giảm chức năng buồng trứng theo YHHĐ .....	3
1.1.1. Vai trò trục dưới đồi - tuyến yên - buồng trứng đối với chức năng sinh sản.....	3
1.1.2. Hội chứng SGCNBT.....	4
1.2. Tổng quan suy buồng trứng sớm theo YHCT .....	9
1.2.1. Bệnh danh suy buồng trứng sớm theo YHCT.....	9
1.2.2. Bệnh nguyên bệnh cơ suy buồng trứng sớm theo YHCT.....	10
1.2.3. Phương pháp điều trị suy buồng trứng sớm theo YHCT .....	13
1.2.4. Tổng quan về các vị thuốc trong bài thuốc HV.....	14
1.2.5. Tổng quan về các nghiên cứu đã thực hiện về bài thuốc HV .....	17
1.3. Tổng quan một số mô hình gây SGCNBT .....	18
1.3.1. Mô hình gây SGCNBT bằng tự miễn dịch.....	18
1.3.2. Mô hình gây SGCNBT bằng biến đổi gen .....	19
1.3.3. Mô hình gây SGCNBT bằng hoá chất.....	20
1.4. Một số nghiên cứu về tác dụng của thuốc có nguồn gốc thảo dược trên mô hình SGCNBT ở động vật thực nghiệm.....	21
<b>Chương 2: CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>	<b>23</b>
2.1. Chất liệu nghiên cứu .....	23
2.2. Động vật nghiên cứu.....	24
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu .....	24
2.4. Các trang thiết bị phục vụ cho nghiên cứu. ....	24
2.5. Các hóa chất phục vụ cho nghiên cứu. ....	25
2.6. Phương pháp nghiên cứu .....	25
2.6.1. Chỉ số nghiên cứu.....	25
2.6.2. Phương pháp tiến hành .....	25
2.7. Xử lý số liệu.....	31
<b>Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>33</b>

3.1. Kết quả gây mô hình suy buồng trứng bằng TG trên chuột nhắt trắng. ....	33
3.1.1. Kết quả đánh giá trọng lượng cơ thể chuột trong nghiên cứu gây mô hình ....	33
3.1.2. Kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột trong nghiên cứu gây mô hình	34
3.1.3. Kết quả đánh giá nồng độ FSH, E2 huyết thanh của chuột trong nghiên cứu gây mô hình. ....	34
3.1.4. Kết quả đánh giá chỉ số buồng trứng và tử cung trong nghiên cứu gây mô hình.....	35
3.1.5. Kết quả đánh giá mô bệnh học nhuộm HE của buồng trứng và tử cung chuột trong nghiên cứu gây mô hình. ....	35
3.1.6. Kết quả đánh giá mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột trong nghiên cứu gây mô hình.....	36
3.2. Đánh giá tác dụng bảo vệ của bài thuốc HV trên mô hình chuột gây suy buồng trứng .....	37
3.2.1. Kết quả đánh giá trọng lượng cơ thể chuột.....	37
3.2.2. Kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột.....	37
3.2.3. Kết quả đánh giá nồng độ FSH, Estrogen huyết thanh của chuột. ....	39
3.2.4. Kết quả đánh giá chỉ số buồng trứng và tử cung trong nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ của cao lỏng HV .....	40
3.2.5. Kết quả đánh giá mô bệnh học buồng trứng và tử cung nhuộm HE trong nghiên cứu tác dụng của cao lỏng HV. ....	40
3.2.6. Kết quả đánh giá mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột trong nghiên cứu tác dụng bảo vệ của cao lỏng HV. ....	42
3.3. Đánh giá hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của bài thuốc HV trên mô hình chuột gây suy buồng trứng bằng TG dạng tiêm.....	43
3.3.1. Kết quả đánh giá trọng lượng cơ thể chuột trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV. ....	43
3.3.2. Kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV.....	44
3.3.3. Kết quả đánh giá nồng độ FSH, E2 huyết thanh của chuột trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV.....	45

3.3.4. Kết quả đánh giá chỉ số buồng trứng và tử cung trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV. ....	46
3.3.5. Kết quả đánh giá mô bệnh học buồng trứng và tử cung nhuộm HE trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV.....	47
3.3.6. Kết quả đánh giá mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng...	48
<b>Chương 4: BÀN LUẬN.....</b>	<b>50</b>
4.1. Bàn luận luận về mô hình gây SGCNBT .....	50
4.1.1. Bàn luận mô hình gây suy giảm chức năng buồng trứng bằng phương pháp tiêm TG dưới da .....	50
4.1.2. Đánh giá chu kỳ động dục của chuột bằng phương pháp quan sát trực quan và phiên đồ âm đạo. ....	52
4.2. Bàn luận về hiệu quả của bài thuốc HV trên tử cung, buồng trứng chuột bị gây suy giảm chức năng buồng trứng bằng TG tiêm dưới da.....	54
4.3. Bàn luận về tác dụng bảo vệ của bài thuốc HV trên mô hình chuột gây suy buồng trứng bằng TG tiêm dưới da.....	60
<b>KẾT LUẬN.....</b>	<b>63</b>
<b>KHUYẾN NGHỊ.....</b>	<b>65</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	



## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Nguyên nhân của SGCNBT.....	5
Bảng 3.1.	Trọng lượng cơ thể chuột trong nghiên cứu gây mô hình.	33
Bảng 3.2.	Kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột ở 21 ngày cuối tiêm TG trong nghiên cứu gây mô hình.....	34
Bảng 3.3.	Kết quả đánh giá nồng độ FSH, E2 huyết thanh chuột trong nghiên cứu gây mô hình.....	34
Bảng 3.4.	Kết quả đánh giá chỉ số buồng trứng, tử cung chuột trong nghiên cứu gây mô hình.....	35
Bảng 3.5.	Trọng lượng cơ thể chuột ở các lô chuột nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ của bài thuốc HV trên mô hình chuột gây suy buồng trứng.....	37
Bảng 3.6.	Kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột trong 21 ngày cuối tiêm TG và uống thuốc HV .....	38
Bảng 3.7.	Đánh giá nồng độ FSH, E2 huyết thanh chuột .....	39
Bảng 3.8.	Đánh giá chỉ số buồng trứng của chuột sau 35 ngày .....	40
Bảng 3.9.	Trọng lượng cơ thể chuột ở các lô nghiên cứu .....	43
Bảng 3.10.	Kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột ở 20 ngày uống HV trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV .....	44
Bảng 3.11.	Nồng độ FSH, E2 huyết thanh chuột trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV ....	45
Bảng 3.12.	Chỉ số buồng trứng, tử cung chuột trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV. ....	46

## DANH MỤC HÌNH

Hình 2.1.	Máy xét nghiệm ELISA .....	24
Hình 2.2.	Cân Điện tử .....	24
Hình 2.3.	Các giai đoạn trong chu kỳ động dục .....	30
Hình 2.4.	Các giai đoạn động dục của chuột xác định bằng bằng phiên đồ âm đạo.	31
Hình 3.1.	Hình ảnh vi thể buồng trứng chuột nghiên cứu gây mô hình.....	35
Hình 3.2.	Hình ảnh vi thể tử cung chuột nghiên cứu gây mô hình .....	36
Hình 3.3.	Hình ảnh vi thể buồng trứng chuột nhuộm hóa mô miễn dịch Anti- NOTCH-1 dương tính mạnh .....	36
Hình 3.4.	Hình ảnh vi thể buồng trứng chuột nghiên cứu tác dụng bảo vệ của cao lỏng HV .....	41
Hình 3.5.	Hình ảnh vi thể tử cung chuột nghiên cứu tác dụng bảo vệ của cao lỏng HV .....	41
Hình 3.6.	Hình ảnh vi thể buồng trứng chuột nghiên cứu tác dụng bảo vệ của cao lỏng HV, nhuộm hóa mô miễn dịch Anti-NOTCH-1 dương tính mạnh .....	42
Hình 3.7.	Hình ảnh vi thể buồng trứng chuột nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV .....	47
Hình 3.8.	Hình ảnh vi thể tử cung chuột nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV .....	48
Hình 3.9.	Hình ảnh vi thể buồng trứng chuột nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV, nhuộm hóa mô miễn dịch Anti- NOTCH-1 dương tính mạnh .....	48

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Suy giảm chức năng buồng trứng-SGCNBT (Premature Ovarian Insufficiency) là một hội chứng lâm sàng được định nghĩa bởi sự giảm hoặc ngừng hoạt động chức năng của buồng trứng ở phụ nữ trước tuổi 40. Bệnh được đặc trưng bởi sự rối loạn kinh nguyệt như mất kinh hoặc thưa kinh, tăng hormon điều hòa sinh dục của tuyến yên Follicle stimulating hormone (FSH) và giảm Estrogen máu [1].

Theo YHCT suy buồng trứng thuộc phạm vi chứng kinh nguyệt không đều, thiếu kinh, vô kinh, vô sinh... Trên thế giới có nhiều nghiên cứu đã chứng minh dùng thuốc thảo dược, bên cạnh hiệu quả trong điều trị suy giảm chức năng buồng trứng, các thuốc này còn có tác dụng bảo vệ mô buồng trứng khỏi tác dụng phụ của các liệu pháp trị liệu cũng như do môi trường sống ...[2][3][4].

Bài thuốc HV (Dật kinh thang gia Kỷ tử, Thỏ ty tử, Tỏa dương), có tác dụng bổ thận ích tinh, bổ khí, tán uất [5]. Bài thuốc đã được thử độc tính cấp, bán trường diễn và bước đầu đánh giá hiệu quả trên mô hình chuột nhất trắng gây SGCNBT bằng Tripterygiumglycoside (TG) đường uống [6][7]. Kết quả cho thấy thuốc an toàn trên động vật thực nghiệm và bước đầu có hiệu quả hồi phục chức năng buồng trứng bị gây suy giảm bởi uống TG, thể hiện qua sự thay đổi chu kỳ động dục, một số chỉ số nội tiết sinh dục và quan sát định tính biểu mô buồng trứng cũng như niêm mạc tử cung [7][6]. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu về tác dụng của bài thuốc trên chuột gây suy buồng trứng mới chỉ được đánh giá bước đầu, trên mô hình gây suy buồng trứng là mô hình cho chuột uống TG đã được đánh giá là gây suy buồng trứng ở mức độ kém hơn so với mô hình dùng TG đường tiêm.

Nhằm khẳng định hiệu quả của bài thuốc HV không chỉ ở tác dụng điều trị mà còn ở cả tác dụng dự phòng, trên mô hình chuẩn gây suy buồng trứng dùng TG đường tiêm, đồng thời đánh giá sâu hơn về cơ chế tác dụng của bài thuốc, đề tài được thực hiện với hai mục tiêu sau:

*1. Đánh giá tác dụng bảo vệ của bài thuốc HV trên buồng trứng và tử cung chuột nhắt trắng trên mô hình thực nghiệm.*

*2. Đánh giá hiệu quả phục hồi suy giảm chức năng buồng trứng của bài thuốc HV trên mô hình thực nghiệm.*

## Chương 1

### TỔNG QUAN

#### 1.1. Suy giảm chức năng buồng trứng theo YHHD

##### 1.1.1. Vai trò trục dưới đồi - tuyến yên - buồng trứng đối với chức năng sinh sản

###### 1.1.1.1. Vùng dưới đồi

Trung khu sinh dục của vùng dưới đồi nằm trong nền của trung não, gồm một nhóm các nhân thần kinh giàu mạch máu, có khả năng chế tiết hormone. Củ xám, nhân bụng giữa, nhân lưng giữa và nhân cung tiết ra hormone giải phóng Gn-RH. Hóc môn này theo hệ tĩnh mạch gánh của Poga và Fielding được chuyển xuống thùy trước tuyến yên [8].

Gn-RH kích thích thùy trước của tuyến yên tiết FSH và LH. Gn-RH được bài tiết theo nhịp, cứ 1- 3 giờ bài tiết một lần, mỗi lần thời gian kéo dài trong vài phút.

###### 1.1.1.2. Tuyến yên

Tuyến yên nằm trong hố yên, nặng khoảng 0,5g, có hai thùy. Thùy trước là một tuyến nội tiết chế tiết các hóc môn kích thích các tuyến sinh dục là FSH và LH, đồng thời chế tiết prolactin kích thích tuyến vú.

FSH kích thích nang noãn của buồng trứng phát triển và trưởng thành. FSH đơn độc không làm chế tiết estrogen, nhờ tác dụng cộng đồng của một chút ít LH, nang noãn mới chế tiết estrogen. LH kích thích nang noãn trưởng thành phóng noãn, kích thích hình thành hoàng thể và kích thích hoàng thể chế tiết. LH còn có tác dụng kích thích sinh sản các tế bào kẽ của tinh hoàn [8].

###### 1.1.1.3. Buồng trứng

Là tuyến sinh dục nữ, thường có 2 buồng trứng, mỗi buồng trứng có kích thước 2,5-5 x 2,0 x 1,0 cm và nặng 4-8g. Trọng lượng của chúng thay đổi trong thời kỳ kinh nguyệt.

Có hai chức năng: chức năng ngoại tiết tạo noãn bào và chức năng nội tiết tạo các hormon sinh dục. Buồng trứng có rất nhiều nang noãn. Số lượng nang noãn này giảm rất nhanh theo thời gian. Khi thai nhi với tuổi 20 tuần, hai bên buồng trứng có 1,5 – 2 triệu nang noãn nguyên thủy. Nhưng khi em bé ra đời số lượng nang noãn

này đã giảm chỉ còn chừng 200.000- 300.000. Vào tuổi dậy thì số lượng nang noãn chỉ còn 20.000 – 30.000. Suốt cuộc đời phụ nữ số noãn bào chín và phóng khỏi buồng trứng không quá 400-500 [8].

### **1.1.2. Hội chứng SGCNBT**

#### **1.1.2.1. Dịch tễ**

Theo các nghiên cứu của Hiệp hội Sinh sản người và Phôi thai học Châu Âu (ESHRE) tỷ lệ mắc SGCNBT như sau:

- Trước tuổi 40 tỷ lệ mắc bệnh là 1/100.
- Trước tuổi 30 bệnh có tỷ lệ mắc là 1/1000.
- Trước tuổi 20 bệnh có tỷ lệ mắc là 1/10000.

Theo phân tích dữ liệu về Ung thư ở trẻ em cho thấy 6,3% bệnh nhi cho thấy sự giảm mạnh chức năng buồng trứng ngay sau khi điều trị, và 8% mắc SGCNBT sau điều trị so với tỷ lệ 0,8 ở nhóm chứng [9][10].

Theo nghiên cứu của Hội Liên hiệp sức khỏe phụ nữ xuyên quốc gia (Women is Health Across the Nation) cho thấy sự phổ biến của POI là khác nhau ở các chủng tộc. Sự khác nhau mang ý nghĩa thống kê được thể hiện rõ ở nhiều nhóm, dao động từ 0,1% đối với người Nhật, tới 1% với người da trắng và 1,4% với người Mỹ gốc Phi và người Tây Ban Nha [11][10].

#### **1.1.2.2. Chẩn đoán SGCNBT**

Tiêu chuẩn được đồng thuận của ESHRE 2016:

Một phụ nữ được bị SGCNBT sớm khi tuổi nhỏ hơn 40 và có bộ 3 tiêu chuẩn sau [10]:

1. Thiếu kinh hoặc vô kinh trên 04 tháng.
2. Nồng độ FSH > 25 IU/L ở 2 lần thử cách nhau ít nhất 4 tuần.
3. Nồng độ E2 < 50 pg/ml cùng thời điểm xét nghiệm FSH.

#### **1.1.2.3. Cơ chế bệnh sinh .**

Cơ chế chính xác của SGCNBT chưa được biết rõ. Nó có thể do:

- Suy giảm lượng nang trứng nguyên thủy ban đầu.
- Sự tăng nhanh tốc độ phân hủy nang trứng.
- Sai sót trong quá trình phát triển hay tuyển chọn nang trứng.

Hơn nữa, sự tăng lên của tốc độ phân hủy nang trứng có thể do sự thay đổi tốc độ của quá trình chết theo chương trình, sai sót làm ngăn chặn quá trình trứng chín và bất thường trong hoạt hóa nang trứng nguyên thủy làm giảm số lượng nang trứng có chức năng hay làm tăng tốc độ phân giải nang trứng.

Như vậy, những nhân tố gây ra cơ chế này là rất đa dạng và phức tạp, nó có thể là kết quả của đột biến gen, đột biến trên nhiễm sắc thể (NST), lây nhiễm, rối loạn tự miễn, các vấn đề chuyển hóa và các tác nhân hậu phôi [10].

#### 1.1.2.4. Nguyên nhân gây SGCNBT

Có nhiều nguyên nhân gây SGCNBT như di truyền, bệnh tự miễn, nhiễm trùng hoặc có nguyên nhân iatrogenic, bao gồm phẫu thuật, xạ trị, hoặc hóa trị, yếu tố môi trường, ....hoặc vô căn

**Bảng 1.1. Nguyên nhân của SGCNBT [10][12]:**

Nguyên nhân di truyền của POI
Rối loạn nhiễm sắc thể X
Monosomy X, hội chứng Turner
X isochromosome
Rối loạn di truyền trên cánh tay dài và ngắn của nhiễm sắc thể X
Các microdeletions khác nhau
POI ở nữ 46, XX
Rối loạn tiền đình
Tiểu não và rối loạn chức năng tuyến sinh dục
Rối loạn tiền đình và hội chứng dị tật nhiều
Đột biến trong enzyme cần thiết cho sinh sản
Thiếu hụt galactose 1-phosphate uridylyltransferase (galactosemia)
Thiếu glycoprotein thiếu carbohydrate
Thiếu hụt 17-hydroxylase / 17,20 desmolase

Đột biến Aromatase
Đột biến trong thụ thể / hành động của hormon
Đột biến trong thụ thể hoóc môn FSH / luteinizing
Nguyên nhân tự miễn liên quan đến POI
Hội chứng polyendocrine tự miễn
Suy giáp, suy tuyến thượng thận, suy tuyến cận giáp và đái tháo đường tuýp 1
Hội chứng khô mắt
Bệnh nhược cơ
Viêm khớp dạng thấp
Lupus ban đỏ hệ thống
Bất sản tuyến ức bẩm sinh
Quai bị
Nguyên nhân Iatrogenic của POI
Hóa trị
Xạ trị
Phẫu thuật

#### 1.1.2.5. Điều trị SGCNBT

Việc quản lý và điều trị SGCNBT nên được bắt đầu ngay lập tức để ngăn chặn hậu quả lâu dài. Phụ nữ mắc SGCNBT có nhu cầu chăm sóc tâm lý và sinh lý rất phức tạp do vậy cần tiếp cận đa ngành là rất cần thiết bao gồm: phụ khoa, nội tiết, sinh sản, hiếm muộn, tâm lý học, chuyên gia về chế độ ăn uống và đội ngũ hỗ trợ bệnh nhân. Liệu pháp hormon thay thế là trụ cột chính, chiến lược chính về được lý trong điều trị SGCNBT để giảm bớt các triệu chứng và các hệ quả lâu dài của sự thiếu hụt estrogen. Đối với các trẻ vị thành niên đều này giúp kích thích các đặc điểm sinh dục thứ cấp [10].



- **Liệu pháp estrogen**

Trừ khi có chống chỉ định tuyệt đối không thể sử dụng liệu pháp estrogen, phụ nữ SGCNBT nên được sử dụng liệu pháp estrogen để ngăn ngừa giảm mật độ xương. Nếu còn tử cung, phải kèm theo progestogen [13]

Ngoài biện pháp Estrogen để ngăn ngừa giảm mật độ xương, các biện pháp quan trọng khác cho sức khỏe cần được nhấn mạnh, bao gồm: tập thể dục, ăn uống lành mạnh, hấp thu đầy đủ canxi và vitamin D và đặc biệt là bệnh nhân cần được tư vấn bỏ thuốc lá [14].

Cách tiếp cận điều trị hiện nay là sử dụng hormon estrogen thay thế với liều gần giống nhất với liều sinh lý bình thường cho đến độ tuổi trung bình của thời kỳ mãn kinh tự nhiên, khoảng 51 tuổi. Các estrogen có chức năng bình thường trước mãn kinh là  $17\beta$ -estradiol. Vẫn còn chưa rõ nồng độ estrogen tối ưu cho phụ nữ SGCNBT.

Hiện tại phác đồ thường dùng là sử dụng điều trị thay thế estrogen hoàn toàn bằng miếng dán estradiol (phóng thích 100mcg mỗi ngày) hoặc estradiol đường uống thường cho liều 2mg/ngày [15][10]. Điều trị miếng dán estradiol có một số lợi thế so với các chế phẩm thuốc viên [16][17].

- Miếng dán phóng thích qua da có cấu trúc giống  $17\beta$ -estradiol của buồng trứng.
- Tránh được chuyển hóa của gan, tránh được tác động của các yếu tố đông máu.
- Hấp thu ổn định hơn.
- Giảm nguy cơ huyết khối tĩnh mạch và giảm nguy cơ các bệnh về túi mật.

Estrogen nên được sử dụng phối hợp với progestin để giảm nguy cơ tăng sản nội mạc tử cung và ung thư nội mạc tử cung. Nghiên cứu cho thấy nên sử dụng 10mg medroxyprogesterone acetate (MPA) mỗi ngày trong 12 ngày đầu của mỗi tháng. Ngoài ra một số tác giả khuyến cáo sử dụng micronized progesterone dạng uống, có thể uống theo chu kỳ 200mg trong 12 ngày hoặc uống liên tục 100mg/ngày suốt chu kỳ [18].

Một số lưu ý khi điều trị cho bệnh nhân trẻ:[19][13]

- Những phụ nữ SGCNBT trẻ cần được cân nhắc sử dụng hormon thay thế với liều đúng mức vì liều thông thường không đủ để duy trì hiệu quả mật độ xương của người trẻ.

- Cần chú ý khi sử dụng estrogen và progesterone theo chu kỳ để tạo chu kỳ kinh bình thường, bệnh nhân vẫn có thể có thai không mong muốn nên khi trễ kinh cần thử thai và ngưng điều trị.

- Khuyến cáo sử dụng miếng dán estradiol 100mcg/ml. Với những bệnh nhân không thể sử dụng thì nên sử dụng estrogen dạng uống.

- Lựa chọn đầu tiên cho liệu pháp thay thế progestin là MPA 10mg/ngày trong 12 ngày mỗi tháng. Một lựa chọn khác nữa là micronized progesterone dạng uống nếu bệnh nhân không thích dùng MPA.

- Thuốc tránh thai dạng phối hợp không được khuyến cáo như liệu pháp hormon thay thế vì thành phần thuốc chứa nhiều hormon steroid, trong khi điều trị cần hormon gần giống với sinh lý bình thường của bệnh nhân.

- Ở những phụ nữ SGCNBT nếu muốn tránh thai thì biện pháp phù hợp là phương pháp màng chắn như bao cao su, màng chắn âm đạo.

- **Điều trị vô sinh cho bệnh nhân suy buồng trứng sớm**

Có tới 50% bệnh nhân có khả năng phục hồi buồng trứng một cách gián tiếp, và khoảng 5-10% bệnh nhân SGCNBT có khả năng mang thai tự nhiên [20]. Một số báo cáo cho thấy các bệnh nhân có khả năng mang thai tự nhiên khi đang điều trị bằng liệu pháp estrogen thay thế [1]. Tuy nhiên bệnh nhân SGCNBT cần được tư vấn là không chờ đợi quá lâu để mang thai tự nhiên nên được sớm sử dụng phương pháp xin trứng để thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) [10]. IVF, xin noãn mang lại khả năng có thai cao nhất cho bệnh nhân SGCNBT với tỷ lệ thành công là 40-50% mỗi chu kỳ. Tất cả các phụ nữ SGCNBT mang thai cần phải được chăm sóc ở một cơ sở sản khoa thích hợp, họ cần phải được thường xuyên kiểm tra sức khỏe.

- **Bảo tồn khả năng sinh sản ở bệnh nhân SGCNBT**

Sự bảo quản đông lạnh nang trứng, phôi và mô buồng trứng là một phương pháp tốt để duy trì khả năng sinh sản của bệnh nhân SGCNBT. Để phục vụ cho quá trình IVF sau này nếu bệnh nhân muốn có con. Phương pháp này có chỉ định cho bệnh nhân độc thân có (AMH < 0,1 ng/ml), bệnh nhân chưa có gia đình trước khi khởi phát vô sinh; bệnh nhân trẻ còn mong muốn có con và bệnh nhân trước khi tiến hành điều trị ung thư [21].

Những nghiên cứu gần nhất cho thấy có sự xuất hiện của lượng ít tế bào gốc trong buồng trứng với hy vọng chúng khả năng sinh và tạo ra trứng trưởng thành. Đây là hướng nghiên cứu nhiều triển vọng nhưng còn phải nghiên cứu thêm [22][23].

## **1.2. Tổng quan suy buồng trứng sớm theo YHCT**

### **1.2.1. Bệnh danh suy buồng trứng sớm theo YHCT**

Trong sách cổ trung y chưa từng đề cập đến giải phẫu bộ phận “buồng trứng”, cũng không có ghi lại bệnh danh “suy buồng trứng sớm” nhưng căn cứ vào biểu hiện của các bệnh dẫn đến kinh nguyệt thay đổi và vô sinh, những loại bệnh này thuộc các chứng “bế kinh”, “ngừng kinh trước tuổi”, “thiếu kinh”, “vô sinh”.

“Tổ Vấn. âm dương ứng tượng đại luận” có viết: “năng trí thất tổn bất ích, tắc nhị giả khả điều, bất trí dụng thử, tắc táo suy chi tiết dã. Niên tứ thập, nhi âm khí tự bán dã, khởi cư suy ai.” (nên biết 7 phần tổn thương 8 phần ích, thì cả 2 được điều hòa, nếu không biết về điều này, thì sẽ sớm suy yếu. 40 tuổi, mà âm khí còn nửa, thì sớm suy.) Trong sách lần đầu đề cập đến “suy sớm”, đồng thời phạm vi tuổi tác là 40, trùng hợp về nhận thức của bệnh này trong y học hiện đại. Bế kinh là một trong những chủ chứng của suy buồng trứng sớm, trong “Hoàng đế nội Kinh” có nhiều chỗ ghi lại nội dung liên quan đến bế kinh, đồng thời đối với lý pháp phương dược của bế kinh miêu tả vô cùng kĩ càng, như trong “Tổ vấn phúc trung luận” gọi “bế kinh” là “huyết khô”, đồng thời ghi lại phương thuốc đầu tiên của phụ khoa ...

Chưa đến 40 tuổi mà mất kinh là đặc trưng chủ yếu SGCNBT, “Trần Tố Am phụ khoa bổ giải” từng viết: “nếu khoảng 40 tuổi kinh kỳ đoạn, không phải là huyết suy thì là huyết trệ, không thể điều trị như huyết khô, huyết bế”, chỉ ra quá trình mất kinh khác với bình thường của suy buồng trứng sớm [24]. Trong “Phó thanh chủ nữ khoa” của các y gia phụ khoa hậu thế có 1 bài về “mất kinh sớm” có ghi lại: “chưa đến năm 7.7 mà kinh thủy đã tuyệt, người cho là huyết khô kinh bế, ai biết là do khí uất của tâm can tỳ, ... kỳ thực không phải huyết khô, vẫn gây ra bế kinh.” [25]. Phương thuốc chọn ích kinh thang để điều trị, lý luận này có ảnh hưởng sâu sắc đến các y gia hậu thế.

Điều trị vô sinh lần đầu tiên thấy trong “Châu dịch” viết lại “nữ tam tuế bất dụng”. “Tổ vấn . cốt không luận” chính thức đưa ra bệnh danh “vô sinh” [26], y gia hậu thế đa số dùng “vô tử”, chẩn đoán và điều trị của bệnh này thường gặp trong nội dung ghi lại về các chứng “trung tử”, “cầu tự”.

### **1.2.2. Bệnh nguyên bệnh cơ suy buồng trứng sớm theo YHCT**

#### **1.2.2.1. Gốc là thận suy:**

“Tổ Vấn. âm dương ứng tượng đại luận” có ghi: “thận khí thịnh, nguyệt kinh thủy, thận khí suy, nguyệt kinh kiệt.” [26] “Phó thanh chủ nữ khoa” viết: “Kinh thủy xuất chư thận”, “kinh bản dư thận” [25]. Hai tác phẩm đều chỉ ra rõ tác dụng quan trọng của thận trong việc sản sinh ra kinh nguyệt. Thận tàng tinh, chủ sinh dục, nữ tử 2×7, thận khí thực, thiên quý thịnh, kinh nguyệt đến, thận chỉ đạo và quyết định việc sản sinh kinh nguyệt.

Thận là gốc của tiên thiên, là gốc của nguyên khí, nơi trú ngụ của nguyên âm nguyên dương, tàng giữ tinh khí của tiên thiên là nguồn động lực của sinh dục phát dục ở nữ, thận cũng là gốc của xung nhâm, sự sản sinh, trưởng thành của thiên quý đều dựa vào sự thịnh vượng của thận khí. Dưới sự chỉ đạo của thận các tạng được điều hòa, khí huyết thông sướng, xung nhâm thông thịnh, tử cung tàng tiết có độ, huyết hải đúng giờ mà đầy đủ, kinh nguyệt đến đúng kỳ. Nếu như phụ mẫu hai bên tinh noãn kết hợp, tự có thể thụ thành bào thai. Cho nên, sự thịnh suy của thận là mối tương quan trực tiếp giữa “thận - thiên quý- xung nhâm- tử cung”, chủ trì sự sinh dục phát dục của nữ.

Nếu bẩm tố tiên thiên bất túc, hậu thiên sinh hoạt quá độ, sinh sản quá nhiều lần hoặc mắc trọng bệnh, bệnh mạn tính, đều có thể dẫn đến thận suy mà ảnh hưởng đến xung nhâm, chủ yếu do thận tinh hư, thận khí bất cố, thận âm hư và thận dương hư. Nếu thận tinh hư, thiên quý kiệt sớm, không thể ra đúng thời gian, xung nhâm bất thịnh, huyết hải không đầy đủ, không có máu để ra, có thể dẫn đến bế kinh hoặc vô sinh. Nếu thận khí suy, mất đi chức năng tàng giữ, xung nhâm bất cố, tử cung tàng tiết bất thường, kinh nguyệt ra rất nhiều, lâu ngày hao tổn tinh huyết, có thể dẫn đến mãn kinh sớm, hoặc vô sinh, như trong “Thánh tề tổng luận” có viết : “người mà vô sinh, do xung nhâm bất túc, thận khí hư hàn.” Thận âm là cơ sở âm

dịch của toàn cơ thể, nếu thận âm bất túc, tinh huyết sinh hóa thất thường, vật chất cơ bản thiếu hụt, âm dương chuyển hóa bất lợi, tinh noãn bài xuất thất thường, lâm sàng có thể xuất hiện kinh nguyệt sau kỳ, bế kinh, vô sinh.

Thận dương là gốc của dương khí toàn thân, có thể ôn ấm tổ chức tạng phủ, thúc đẩy hoạt động tạng phủ, xúc tiến phân bố tân dịch, đề phòng sản sinh sản vật bệnh lý như đàm, ẩm, duy trì thông suốt khí cơ xung nhâm. Nếu thận dương bất túc, xung nhâm tử cung mất sự ôn ấm, dẫn đến xung nhâm thất dưỡng, thịnh suy của huyết hải thất thường, kinh nguyệt không có để ra, khí hóa thất thường, kết thấp thành đàm, trở trệ khí cơ xung nhâm cũng sẽ ảnh hưởng đến sinh lý kinh nguyệt bình thường. Trần Hà cho rằng bệnh này bệnh tại âm phận, lấy kinh nguyệt sau kỳ do thận âm bất túc làm bệnh cơ chủ yếu, điều trị lấy hồi phục âm phận của kinh nguyệt sau kỳ làm chủ. Ngụy Thiệu Bản nhấn mạnh từ thận tinh hư mà biện chứng bế kinh của suy buồng trứng, điều trị chú trọng bổ thận ích tinh, hồi phục trạng thái cân bằng âm dương cơ thể.

#### 1.2.2.2. *Can uất huyết hư*

Trong “Cảnh nhạc toàn nữ. Phụ nhân quy” có viết: “nữ tử huyết là chủ, huyết vượng thì kinh điều hòa mà có con cái” [27]. Can tàng huyết, can huyết vượng, huyết hải đầy đủ, vì vậy mới có câu: “nữ tử lấy can làm tiên thiên”. Can chủ sơ tiết, thông sướng khí cơ toàn thân, nếu khí cơ được thông sướng, khí huyết vận hành bình thường, thì bào cung khai đóng tàng tiết điều độ. “Vạn thị nữ khoa” có viết: “ưu sầu tư lự, não nộ oán hận, khí uất huyết trệ, mà kinh bất hành” [28]. Nếu can khí uất kết, khí cơ sơ tiết thất thường, huyết dịch vận hành không thông suốt, thì sự tích trữ đầy đủ huyết hải thất thường, dẫn đến kinh nguyệt sau kỳ, lượng kinh ít thậm chí là dừng kinh. Can thận đồng nguyên, thận tàng tinh, can tàng huyết, can thận tương hợp, tinh huyết hóa sinh, tử cung được nuôi dưỡng đầy đủ, điều tiết đóng mở điều độ, kinh nguyệt bình thường, nếu can thận cùng hư, tinh huyết bất túc, xung nhâm huyết hải thiếu hụt, cũng dẫn đến kinh nguyệt sớm muộn, luôn luôn là triệu chứng tình trí tương đối nặng.

#### 1.2.2.3. *Tỳ mất kiện vận*

“Cảnh nhạc toàn thư. Kinh bất điều” từng viết: “muốn điều kinh, quý tại bổ tỳ

vị để cung nguồn của huyết, dưỡng thận khí để an phòng của huyết”. Tỳ là gốc của hậu thiên, vận hóa tinh vi của thủy cốc, tỳ vị khỏe mạnh thì khí huyết đầy đủ, hạ trú xuống xung nhâm, tử cung, cung cấp vật chất cơ sở cho kinh nguyệt. Nếu tỳ vị hư, nguồn sinh hóa khí huyết không đầy đủ, xung nhâm không đầy, huyết hải không được đầy đủ, vô huyết đi xuống, lâu ngày kinh nguyệt dần mất. Tỳ mất kiện vận, thủy dịch vận hóa thất thường, lâu ngày tích hóa đàm thành ẩm, trở trệ khí cơ, khí huyết vận hành không thông sướng, tử cung tàng tiết thất trách, dẫn đến kinh nguyệt lượng ít, thậm chí bế kinh [29][30]. Giáo sư Trương Vĩnh Thần cho rằng suy buồng trứng sớm lấy gốc là thận hư, dần dần ảnh hưởng đến tỳ, khi điều trị lấy nguyên tắc điều trị là bổ thận kiện tỳ, điều lý xung nhâm [31].

#### 1.2.2.4. Tâm thận bất giao

Tâm chủ thần minh, chủ huyết mạch, là chủ của lục phủ ngũ tạng, “Phụ nhân đại toàn lương phương. Điều kinh môn” có viết : “tại tâm, từ tâm đến ngũ tạng, ngũ tạng mệt mỏi, kinh nguyệt bế trước.” [32] kinh nguyệt thất thường có liên quan đến sự khoan khoái của tâm khí. Tâm thuộc hỏa, thận thuộc thủy, tâm hỏa hạ giáng xuống thận, khiến thận thủy không bị lạnh, thận thủy lên cứu tâm hỏa, khiến tâm hỏa không tự bốc lên trên, vì vậy tâm thận tương giao, thủy hỏa hỗ trợ lẫn nhau, xung nhâm hiệp điều, kinh nguyệt tự đến. Nếu tâm khí uất kết, không thể hạ thông xuống thận, hoặc thận thủy không có cách nào đi lên giúp tâm, tâm thận bất giao, ất xung nhâm mất ôn dưỡng, huyết hải không đầy đủ, tử cung tàng tiết thất điều, kinh nguyệt thất điều. Quốc y đại sư giáo sư Hạ Quế Thành cho rằng bệnh này phát bệnh thường do tâm âm bất túc mà dẫn đến “tâm thận bất giao”, chủ trương “tĩnh năng sinh thủy”, điều trị lấy “điều tâm “ làm chủ, tâm hỏa được ôn ấm thì thận thủy điều hòa.

#### 1.2.2.5. Khí huyết thất điều

“Linh khu. Ngũ âm ngũ vị” viết: “sinh ra phụ nữ, khí dư, huyết thiếu, vì vậy mà mà nhiều lần ra máu”. Phụ nữ trải qua kinh nguyệt, mang thai, sinh đẻ, cho con bú, âm huyết dần dần hư tổn, khiến cho khí huyết ở trong trạng thái mất cân bằng, nếu tà khí ảnh hưởng đến huyết phận, âm phận hư tổn, huyết càng không đầy đủ, có khả năng phát sinh ra kinh nguyệt sau kỳ, lượng ít; hoặc tình chí thất điều, ảnh hưởng đến khí phận, khí trệ huyết hành không thông sướng, ứ huyết ứ trệ tử cung, có thể phát sinh ra bế kinh, vô sinh.

#### 1.2.2.6. *Tổn thương xung nhâm*

“Linh khu kinh. Nghịch thuận phì sấu” ghi lại: “ranh giới của xung mạch, làm biên của lục phủ ngũ tạng”[33] xung mạch là nơi hội tụ khí huyết của 12 đường kinh, vì vậy được gọi là “xung chi huyết hải”, nhâm mạch chủ âm toàn thân, được gọi là “minh mạch chi hải” Vương Bǎng từng viết “vị chi nhâm mạch giả, nữ tử đắc chi dĩ nhâm dưỡng giả” [34] vì vậy “nhâm chủ bào thai”. Nếu chức năng tạng phủ thất thường, khí huyết thất điều, tổn thương xung nhâm, ảnh hưởng đến công năng bình thường của sinh dục phát dục, có thể dẫn đến kinh nguyệt sau kỳ, lượng kinh ít, thậm chí bế kinh.

#### 1.2.3. *Phương pháp điều trị suy buồng trứng sớm theo YHCT*

Bệnh suy buồng trứng sớm trong các sách cổ không có ghi chép rõ ràng, ngày trước trong giáo trình trung y phụ khoa và các tài liệu liên quan không có phân loại biện chứng SGCNBT một cách rõ ràng, các y gia khác nhau có lý giải khác nhau. Tử Tung Nham [35] phân SGCNBT thành hai thể là can thận âm hư, tỳ thận dương hư, và 4 thể kiêm chứng là can khí uất trệ, thấp trọc nội uẩn, huyết phân nhiệt thịnh và mạch lạc ú trệ để điều trị. Người can thận âm hư thường chọn bắc sa sâm, thạch học, thực địa hoàng, nữ trinh tử, mặc hạn liên (cỏ nhọ nôi), kỷ tử, sơn thù du để dưỡng âm huyết. Người tỳ thận dương hư thường dùng thỏ ty tử, đỗ trọng, tục đoạn để ôn bổ can thận, đồng thời không quên sơ can, trừ thấp, thông trệ.

Hồ Hướn Đán tổng kết kinh nghiệm điều trị SGCNBT của giáo sư Lý Lê Vân cho rằng đa phần nguyên nhân gây bệnh là do thận tinh hư tổn, can uất không được sơ thông, tỳ mất kiện vận, lâu ngày kéo dài, khiến cho kinh nguyệt sớm mất, đồng thời phân bệnh này thành 5 thể điều trị thận tinh thiếu hụt, can khí uất kết, tỳ hư hiệp đàm, can thận âm hư, tỳ thận dương hư [36]. Thận tinh thiếu hụt điều trị bổ thận điền tinh, dưỡng huyết điều kinh, dùng thuốc: thực địa, thỏ ty tử, hoàng kỳ, cầu kỷ tử, lộc giác lộ, tử hà xa. Can thận âm hư điều trị tư bổ can thận, điều bổ xung nhâm, vị thuốc thường dùng: hạn liên thảo, nữ trinh tử, kỷ tử, thực địa. Tỳ thận dương hư pháp điều trị ôn thận tráng dương, bổ huyết điều kinh, sử dụng nhị tiên thang gia giảm. Can khí uất kết pháp điều trị hành khí sơ can giải uất, vị thuốc thường dùng đương quy, hương phụ, duyên hồ sách, mộc hương, nhân mạnh sơ can

giả uất, trọng dụng những vị thuốc cay tán. Tỳ hư hiệp đàm pháp điều trị kiện tỳ hòa vị, hoạt huyết hóa đàm, căn cứ theo “Đan kê” viết “ phụ nữ béo, không thể sinh con, là do mỡ trong người che lấp tử cung, dẫn đến kinh nguyệt bất hành, có thể sử dụng loại phương đạo đàm thang”, phương thuốc được sử dụng là khai cung hoàn hợp với hương phụ đạo đàm hoàn gia giảm.

Vương Thúy Man căn cứ kinh nghiệm lâm sàng phân bệnh này thành 3 thể can thận âm hư, tỳ thận dương hư, huyết khô ú trở. Can thận âm hư biểu hiện bằng kinh nguyệt quá ít hoặc bế kinh, vô sinh, kèm theo các triệu chứng phiền táo dễ cáu gắt, mất ngủ hay mơ, hoa mắt ù tai, điều trị tư bổ can thận, ích tinh điền tủy, sử dụng quy thận hoàn gia giảm hợp với nhị âm tiên. Tỳ thận dương hư với biểu hiện là kinh nghiệm hiếm thấy, lượng ít, sắc mặt hư phù, hình thể hàn sợ lạnh, đại tiện lỏng nát, điều trị bổ thận điền tinh, ôn trung kiện tỳ, phương sử dụng quy thận hoàn hợp với nhị tiên thang gia giảm. Huyết khô ú trở biểu hiện là bệnh nhân sau khi mất máu, số lần có kinh ít, hoặc người sau khi nạo thai đột nhiên mất kinh, kèm theo sắc mặt vàng vọt, người mệt mỏi vô lực, tóc khô vàng, điều trị dưỡng huyết hoạt huyết, hoạt huyết khứ ứ, dùng huyết phủ trục ứ thang gia vị [37].

Bệnh cơ chủ yếu của bệnh là do thận hư nên điều trị cũng lấy bổ thận là chính và tùy theo từng triệu chứng mà có gia giảm. Can uất cần sơ can lý khí, tâm tỳ hư cần dưỡng tâm kiện tỳ, huyết ú cần hoạt huyết hóa ú, đàm trệ cần kiện tỳ hóa đàm.

Vì vậy trong nghiên cứu này chúng tôi dùng phương pháp: Bổ thận, kiện tỳ, tán uất. Bài thuốc chúng tôi chọn là bài thuốc “Dật kinh thang” gia thêm cầu kỷ tử, thỏ ty tử và tóa dương.

#### **1.2.4. Tổng quan về các vị thuốc trong bài thuốc HV**

**Thục địa: *Radix Rehmanniae glutinosae praeparata*** Rễ củ đã chế biến của cây Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa (Gaertn.) Libosch*), họ Hoa mõm chó (*Scrophulariaceae*).

Tính vị, quy kinh: Cam, vị ôn. Vào các kinh can, thận, tâm

Công năng chủ trị: Bổ huyết, tư âm, ích tinh

Tác dụng dược lý: Cường tim, lợi niệu, giảm glucose máu, tăng bạch cầu, tăng cường miễn dịch. Có nhiều nghiên cứu đã cho thấy thực địa có tác dụng làm hạ chỉ số huyết thanh E2 và giảm quá trình suy buồng trứng[38] [39].



**Hoài sơn:** [38] rễ cây củ mài (*Tuber Dioscoreae persimilis*) họ Củ từ (*Dioscoraceae*).

Tính vị, quy kinh: ngọt, bình vào tỳ, vị, phế, thận.

Công năng chủ trị: bổ tỳ vị, bổ phế âm, cố thận ích tinh.

Tác dụng dược lý: có tác dụng hạ đường huyết, chống lão hóa, oxy hóa, điều tiết tỳ vị, bảo vệ và phục hồi tổn thương của gan, bảo vệ tổn thương của thận, điều tiết miễn dịch [38] [40].

**Bạch truật:** rễ củ của cây Bạch truật (*Rhizoma Atractylodis macrocephalic*) họ cúc (*Compositae*).

Tính vị, quy kinh: ngọt, đắng, hơi ẩm, vào kinh tỳ, vị.

Công năng chủ trị: kiện tỳ, táo thấp, cầm mồ hôi, an thai.

Tác dụng dược lý: có tác dụng chống ung thư, kháng viêm, điều tiết tràng vị, bảo vệ tế bào thần kinh, hạ đường huyết [38] [41].

**Bạch thược:** rễ đã cạo lớp vỏ bên ngoài hay sấy khô của cây Thược dược (*Radix Paeonial lactiflorae*) họ Hoàng liên (*Ranunculaceae*)

Tính vị, quy kinh: khổ, toan, vị hàn, vào kinh tỳ, can, phế.

Công năng chủ trị: bổ huyết, dưỡng âm, thư can, chỉ thống

Tác dụng dược lý: có tác dụng kháng viêm, giảm đau, bảo vệ chức năng gan, giảm stress, tăng cường trí nhớ [38] [42].

**Mẫu Đơn bì:** rễ phơi khô của cây Mẫu đơn (*Paeonia suffruticosa*) họ Hoàng liên (*Ranunculaceae*)

Tính vị, quy kinh: ngọt, đắng lạnh, vào kinh tâm, can, thận

Công năng chủ trị: Thanh nhiệt, lương huyết, hoạt huyết.

Tác dụng dược lý: có tác dụng điều kinh, kháng viêm, hạ đường huyết, chống xơ vữa động mạch, chống loạn nhịp tim, chống chứng kinh nguyệt, bảo vệ gan, tăng cường miễn dịch [38] [43].

**Nhân sâm:** là rễ cây Nhân sâm (*Panax ginseng*) họ ngũ gia bì (*Araliaceae*).

Tính vị, quy kinh: ngọt, hơi đắng vào kinh phế, tỳ.

Công năng chủ trị: đại bổ nguyên khí, ích huyết, sinh tân dịch.

Tác dụng dược lý: có tác dụng giảm lão hóa, giảm thoái hóa não, giảm stress, giảm xơ vữa động mạch, chống viêm các khớp và chống ung thư [38] [44].

**Sài hồ:** rễ đã phơi hay sấy khô của cây Bắc sài hồ (*Bupleurum chinensis DC*), họ hoa tán (*Apiaceae*).

Tính vị, quy kinh: đắng, hơi hàn, quy kinh can đờm.

Công năng chủ trị: bổ tỳ vị, bổ phế âm.

Tác dụng dược lý: có tác dụng giải nhiệt hạ sốt, kháng viêm, giảm đau, giảm thiểu các tác nhân gây tổn thương gan, chống ung thư và chống stress, u uất [45] [38].

**Táo nhân:** nhân phơi khô của hạt quả táo chua (*Zizyphus jujuba*), họ Táo ta (*Rhamnaceae*) đem sao vàng.

Tính vị, quy kinh: ngọt, chua, bình vào kinh can, tỳ, thận, đờm.

Công năng chủ trị: dưỡng tâm an thần, sinh tân chỉ khát

Tác dụng dược lý: có tác dụng trọng chấn an thần, điều tiết tinh thần, sơ can giải uất, điều khí an thần, hạ đường huyết, chống kinh nguyệt, cải thiện trí nhớ, bảo vệ hệ thống mạch máu não, bảo vệ tế bào gan [38] [46].

**Đương quy:** rễ phơi khô của cây Đương quy (*Angelica sinensis*) họ Hoa tán (*Umbelliferae*).

Tính vị, quy kinh: ngọt, cay, ấm vào kinh tâm, can, tỳ.

Công năng chủ trị: bổ huyết, hành huyết.

Tác dụng dược lý: có tác dụng giãn cơ tử cung, khí quản và huyết quản; giảm đau, bình suyễn, giảm tập kết tiểu cầu, chống oxy hóa, lão hóa [38] [47].

**Sa sâm:** rễ đã phơi hay sấy khô cây Sa sâm (*Glehnia littoralis*) họ hoa tán (*Umbelliferae*).

Tính vị, quy kinh: ngọt hơi đắng, lạnh, vào kinh phế.

Công năng chủ trị: dưỡng âm, thanh phế.

Tác dụng dược lý: Chỉ khái trừ đàm, chống tác dụng của khúc xạ, điều tiết miễn dịch, chống lão hóa, cải thiện trí nhớ, chống ung thư và chống virus, bảo vệ tế bào gan [38] [48].

**Đỗ trọng:** vỏ thân phơi khô của cây Đỗ trọng (*Eucommia ulmoides*) họ Đỗ trọng (*Eucommiaceae*).

Tính vị, quy kinh: ngọt, hơi cay, ấm, vào kinh can, thận

Công năng chủ trị: ôn bổ can thận, làm khỏe mạnh gân xương, có tác dụng chữa đau lưng và an thai là chính.

Tác dụng dược lý: Có tác dụng dự phòng, điều tiết huyết áp, hạ đường huyết, phòng ngừa và điều trị tiểu đường, chống thoái hóa xương khớp, kháng viêm, bảo vệ thần kinh, chống lão hóa và tăng cường miễn dịch [38] [49].

**Cầu Kỷ tử:** quả chín phơi khô của cây rau khởi, cây kỷ (*Lycium sinensis*) thuộc họ Cà (*Solanaceae*).

Tính vị, quy kinh: ngọt, bình, vào kinh phế, can, thận.

Công năng chủ trị: bổ can thận, làm sáng mắt.

Tác dụng dược lý: có tác dụng điều tiết dưới đồi - tuyến yên - buồng trứng làm giảm triệu chứng suy giảm chức năng buồng trứng [38] [50].

**Thỏ ty tử:** hạt lấy ở quả chín đã phơi hay sấy khô của cây tơ hồng (*Cuscuta chinensis Lam*) họ Tơ hồng.

Tính vị, quy kinh: cam, ôn, vào kinh can, tỳ, thận.

Công năng chủ trị: bổ thận ích tinh, dưỡng can minh mục, kiện tỳ trừ tả.

Tác dụng dược lý: có tác dụng điều tiết cân bằng dưới đồi - tuyến yên - buồng trứng để cân bằng nội tiết tố, điều tiết miễn dịch, tác dụng dinh dưỡng thần kinh, chống oxy hóa, lão hóa, bảo vệ can sáng mắt [38] [51]

**Tỏa dương:** còn được gọi là củ gió đất, cu chó, cây không lá, là loại cây cỏ giống như cây nấm thường sống ký sinh trên rễ những cây gỗ lớn trong rừng sâu, thuộc họ Giá đất (*Balanophoraceae*).

Tính vị, quy kinh: ngọt, ôn.

Công năng chủ trị: bổ thận, ích tinh huyết, mạnh tình dục.

Tác dụng dược lý: có tác dụng bổ thận tăng cường chức năng của thận, tăng cường miễn dịch, chống lão hóa, chống mệt mỏi, tình trạng thiếu oxy, tăng cường miễn dịch và bảo vệ tế bào gan [52] [53].

#### 1.2.5. Tổng quan về các nghiên cứu đã thực hiện về bài thuốc HV

Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của cao thuốc, thực hiện tại Viện Dược liệu Quốc gia: **(Phụ lục 1)**

Thử độc tính cấp của bài thuốc được thực hiện trên 50 chuột nhắt trắng Swiss, bằng đường uống theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon và theo hướng dẫn của WHO [54]. Kết quả: Chuột nhắt trắng uống bài thuốc "HV" với liều tối đa

chuột có thể uống được là 450g/kg/ngày (gấp 8,68 lần liều tương đương liều điều trị trên người) không có chuột nào chết và không quan sát thấy biểu hiện bất thường nào ở chuột. Vì vậy, chưa xác định được độc tính cấp và chưa tính được LD50 của bài thuốc “HV” trên chuột nhắt trắng theo đường uống [6][7] .

Thử độc tính bán trường diễn được thực hiện trên 30 chuột cống chủng Wistar, hai giống đực và cái. Kết quả: Bài thuốc HV với liều 30,24g/kg/ngày (tương đương liều điều trị trên người) và liều 90,72g/kg/ngày (gấp 3 lần liều điều trị trên người), uống trong 90 ngày liên tục không gây độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng; thể hiện không ảnh hưởng tới tình trạng chung của chuột, không làm thay đổi các chỉ số về sự gia tăng trọng lượng cơ thể, các chỉ số đánh giá chức năng tạo máu, mức độ tổn thương gan và chức năng thận, không gây tổn thương cấu trúc lách, gan, thận chuột nghiên cứu [6][7].

Đánh giá hiệu quả của bài thuốc HV được thực hiện trên 32 chuột nhắt cái Swiss được gây SGCNBT bằng uồng TG liều 100mg/kg/ngày, liên tục trong 35 ngày, sau đó chuột được uống thuốc HV 20 ngày đã làm giảm có ý nghĩa thống kê các chỉ số suy buồng trứng so với lô mô hình, cụ thể: Làm giảm FSH nồng độ, làm tăng nồng độ E2; Làm tăng chỉ số tử cung và buồng trứng; cải thiện hình ảnh mô bệnh học của tử cung, buồng trứng so với lô mô hình đánh giá bằng quan sát định tính [7][6].

### **1.3. Tổng quan một số mô hình gây SGCNBT**

#### ***1.3.1. Mô hình gây SGCNBT bằng tự miễn dịch***

Năm 1988, LaBarbera và cộng sự trên lâm sàng đã phát hiện rằng bệnh buồng trứng tự miễn có liên quan đến sự xuất hiện của suy buồng trứng sớm ở một số phụ nữ [55]. Horejsi và cộng sự đã điều tra 13 bệnh nhân bị vô kinh nguyên phát và thấy rằng 5 trong số họ có kháng thể kháng zona pellucida dương tính, trong khi điều tra 60 bệnh nhân bị vô kinh thứ phát, 14 bệnh nhân có kháng thể kháng zona pellucida dương tính [56]. Do đó, việc sử dụng viêm buồng trứng tự miễn để chuẩn bị mô hình động vật có ý nghĩa lâm sàng nhất định. Cơ chế cụ thể không rõ ràng. Nó có thể liên quan đến việc thiếu tế bào điều tiết T, khiến buồng trứng phản ứng quá mạnh với kháng thể tự thân và tạo ra viêm buồng trứng tự miễn. Điều này dẫn đến tổn thương buồng trứng [57]. Các phương pháp mô hình phổ biến chính là:

### *1.3.1.1. Cắt bỏ tuyến ức ở chuột sơ sinh*

Ba ngày sau khi Taguchi và những cộng sự loại bỏ tuyến ức, 74% chuột B6A cho thấy kháng thể chống buồng trứng và 92% chuột C31 cho thấy kháng thể chống buồng trứng bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang gián tiếp [58]; Tong đem những con chuột được sinh ra 2 - 4 ngày sau gây mê, phẫu thuật mở xương ức, sau khi hai tuyến ức bị hút ra bằng pipet thủy tinh, vết mổ đã được đóng lại và chúng tiếp tục được nuôi dưỡng bằng chuột mẹ. Kết quả sau 14 ngày 90% số chuột nhất xuất hiện viêm buồng trứng tự miễn đồng thời có biểu hiện suy buồng trứng sớm, hơn nữa người ta cũng phát hiện ra rằng những con chuột non đã tạo ra một kháng thể trong huyết thanh với kích thước 125 kDa, được định vị trong tế bào chất của tế bào trứng và được đặt tên là protein đặc hiệu ooplasm-1 (OP1) [59].

### *1.3.1.2. Gây viêm buồng trứng tự miễn bằng kháng nguyên Zona pellucida (ZP)*

Năm 1994, Smith và cộng sự đã báo cáo lần đầu tiên rằng các kháng thể chống ZP có liên quan đến sự phát sinh của POI [60]. Rhim gây ra viêm buồng trứng tự miễn với kháng nguyên zona pellucida 3, phát hiện 86% chuột B6AF1 bị viêm buồng trứng sau một lần tiêm, và các tế bào lympho lấp đầy vùng kẽ của buồng trứng vào ngày thứ 6 sau khi tiêm [61]. Theo trình tự axit amin 330-342 của zona pellucida 3 ở chuột, Fu Li và cộng sự đã tổng hợp một polypeptide zona như một chất miễn dịch, và tiêm 0,1 ml dưới da vào chân sau của chuột, kết quả thấy rằng 70% nhóm mô hình chuột cho thấy rối loạn chu kỳ tình dục, trong đó 50% không có chu kỳ và tiếp tục dừng ở thời kỳ động dục, 80% chuột trong nhóm mô hình có kháng thể kháng zonal dương tính trong máu ngoại vi, 90% chuột trong nhóm mô hình bị viêm buồng trứng tự miễn [62].

### *1.3.2. Mô hình gây SGCNBT bằng biến đổi gen*

Hiện nay, phổ biến nhất là áp dụng nguyên tắc tái tổ hợp tương đồng DNA và thay thế đoạn gen mục tiêu bằng đoạn tương đồng được thiết kế, để đạt được mục đích loại bỏ gen. Trong những năm gần đây, ngày càng có nhiều sự chú ý đến mô hình loại bỏ gen POI và nghiên cứu liên quan đã trở thành một điểm nóng, điều này đã đóng góp quan trọng cho việc xây dựng nguyên nhân của POI, nhưng nguyên nhân của POI vẫn chưa được giải thích đầy đủ. Năm 2010, Jagarlamudi đã xem xét các mô hình chuột

loại bỏ gen liên quan đến POI [63], kết hợp với các gen được phát hiện gần đây. Schmidt và cộng sự đã phát hiện ra rằng khi đột biến gen FOXL2 ở chuột, các tế bào hạt chuột ngừng phát triển, tế bào trứng dần đông lại, nhóm nang ban đầu đã cạn kiệt sau 8 tuần và không có tế bào trứng và nang trứng bình thường trong buồng trứng sau 16 tuần. Vô sinh, chỉ ra rằng FOXL2 có liên quan đến sự phát triển nang trứng [64].

### **1.3.3. Mô hình gây SGCNBT bằng hoá chất**

#### **1.3.3.1. Mô hình gây SGCNBT bằng thuốc hóa trị**

Fatih và cộng sự đã phát hiện ra rằng sau 5 đến 6 tuần tiêm 2,5, 5.0 và 7.5 mg/kg paclitaxel, số lượng nang ban đầu của chuột đã thay đổi đáng kể, 7.5 mg/kg so với nhóm đối chứng bình thường, nhóm paclitaxel đã giảm 36%,  $P = 0,001$  [65]. Mehmet và cộng sự đã sử dụng paclitaxel và cisplatin để thiết lập mô hình POI trên chuột. Dùng 7,5 mg/kg paclitaxel và 5 mg/kg cisplatin dạng tiêm. Thống kê cho thấy các nang trong nhóm paclitaxel, nhóm cisplatin giảm so nhóm chứng ( $P = 0,01$ ), có sự giảm đáng kể và sự khác biệt giữa nhóm paclitaxel và nhóm cisplatin không đáng kể [66].

#### **1.3.3.2. Mô hình gây SGCNBT bằng trippetgium glycoside**

Trippetgium glycoside (TG) là hoạt chất được chiết xuất từ cây Lôi công đẳng có tác dụng chống viêm, giảm đau, ức chế miễn dịch, được sử dụng để điều trị bệnh tự miễn dịch, các bệnh viêm như thấp khớp, viêm khớp. Trong những năm gần đây với nhiều nghiên cứu cho thấy TG có tác dụng chống ung thư tuyến tụy, gây sự chú ý trong và ngoài nước [67] [68]. Qin Wanzhang và cộng sự đã báo cáo rằng việc sử dụng triptolide trong thời gian dài ở phụ nữ trong độ tuổi sinh đẻ có thể gây ra rối loạn kinh nguyệt, giảm lưu lượng kinh nguyệt và thậm chí là vô kinh [69]. Do đó, trippetgium glycoside có thể được sử dụng để chuẩn bị mô hình suy buồng trứng sớm. Yu và cộng sự đã sử dụng dạng tiêm trippetgium glycoside 40 mg/kg/ngày trên chuột SD 12 tuần tuổi trong 10 tuần. Làm rối loạn chu kỳ động dục, giảm chỉ số buồng trứng, giảm nồng độ Estrogen huyết thanh so nhóm đối chứng  $p < 0,05$  [70]. Gao Hui và cộng sự đã so sánh các tác động ở các nồng độ khác nhau của trippetgium wilfordii bằng cách đưa trực tiếp vào dạ dày để xây dựng mô hình suy buồng trứng sớm ở chuột SD và thấy rằng 50 mg/kg/ngày. Sau khi đưa vào dạ dày liên tục trong 14 ngày, các nang ở các mức độ khác nhau trong mô buồng trứng giảm và thâm nhiễm tế bào lympho đã được nhìn thấy ở một số nang [71].

Bin Li và cộng sự (2014) đã nghiên cứu và gây dựng thành công mô hình gây suy buồng trứng bằng TG: 48 chuột nhất trắng KM giống cái, 6 tuần tuổi được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm: nhóm chứng, nhóm uống, nhóm tiêm dưới da và nhóm tiêm dưới phúc mạc. Chuột nhóm chứng được uống nước cất, chuột 3 nhóm còn lại được dùng TG với liều 50mg/kg/ngày liên tục trong 35 ngày sau đó đánh giá một số chỉ số về sinh sản. Kết quả TG làm giảm tần số chu kỳ động dục chuột, giảm chỉ số tử cung, chỉ số buồng trứng so với trọng lượng cơ thể, FSH tăng, giảm số lượng nang noãn và hoàng thể do tăng số lượng các nang noãn chết theo chương trình [72].

#### 1.3.3.3. Mô hình gây SGCNBT bằng galactose

Guerreero và các nghiên cứu khác đã phát hiện ra rằng galactose có thể gây vô kinh nguyên phát và thứ phát, vô sinh và suy buồng trứng sớm ở phụ nữ trong độ tuổi sinh đẻ [73]. Galactosemia là một bệnh thoái hóa tự phát do thiếu hụt galactose-1-phosphate uridine transferase (GALT), gây tổn thương buồng trứng. Bandyopadhyay và cộng sự đã thành lập mô hình POF trên chuột bằng cách sử dụng galactose ngoại sinh [74]. Li Jie và các đồng nghiệp đã chọn những con chuột Côn Minh ở độ tuổi 8-12 tuần, bổ sung chất bổ sung galactose ngoại sinh vào nhóm thử nghiệm và đưa thuốc thực phẩm bình thường cho nhóm đối chứng. Sau 70 ngày cho ăn, chỉ số buồng trứng, tử cung giảm hơn so nhóm chứng, FSH huyết thanh tăng cao hơn nhóm chứng  $p < 0,001$ , số lượng tế bào trứng trong nhóm thử nghiệm đã giảm đáng kể [75].

#### 1.4. Một số nghiên cứu về tác dụng của thuốc có nguồn gốc thảo dược trên mô hình SGCNBT ở động vật thực nghiệm

Tian Xia và cộng sự (2014) sử dụng bài thuốc gồm các vị: thổ ty tử, thực địa, ba kích, nhục dung, đương quy, xuyên khung, ngũ vị... để điều trị các mô hình chuột cống bị SGCNBT bằng CP. Chuột được chia làm ba lô: lô phòng ngừa, lô điều trị và lô điều trị dự phòng. Điều trị bằng chất đối vận hormon giải phóng gonadotropin (GnRHa) được sử dụng như một biện pháp kiểm soát. Kết quả cho thấy trọng lượng cơ thể, khả năng sinh sản, ngày động dục, nồng độ hormon, và trọng lượng buồng trứng đã được phục hồi khi chuột được sử dụng bài thuốc này. Hơn nữa, trong nhóm điều trị dự phòng, số lượng nang trứng ở mỗi giai đoạn

phát triển tăng đáng kể so với nhóm dự phòng hoặc điều trị. Hơn nữa, số lượng tế bào chết theo chương trình giảm đáng kể và biểu hiện mRNA tương đối của caspase-3 giảm đáng kể, trong nhóm điều trị dự phòng. Kết quả còn chỉ ra rằng hormon dự trữ buồng trứng anti Müllerianhormone (AMH) tăng đáng kể trong nhóm điều trị dự phòng và tương tự như chuột bình thường. Sự biểu hiện của yếu tố biệt hóa tăng trưởng 9 (GDF9) đã được tăng cường đáng kể ở cả nhóm điều trị dự phòng và nhóm GnRHa, điều này cho thấy các tế bào trứng có chất lượng tốt hơn [76].

Ezzatabadipour Massood và cộng sự (2017), cho chuột SGCNBT bằng CP uống dịch chiết từ hạt mùi. Kết quả, hạt mùi có tác dụng bảo vệ buồng trứng khỏi tác dụng phụ của CP [77].

Gao Xiu Juan dùng bài thuốc bổ thận điều kinh với các vị thuốc thổ ty tử 15g, hoàng tinh 15g, hoài sơn 15g, câu kỳ tử 15g, ích mẫu thảo 15g, ngư tử 15g, sơn thù 10g, đương quy 10g, trạch tả 10g, thực địa 20g, cam thảo 3g, có tác dụng bổ ích thận dương, hoạt huyết điều kinh để cải thiện triệu chứng suy buồng trứng sớm. Kết quả nghiên cứu cho thấy bài thuốc bổ thận điều kinh có tác dụng phục hồi các hormon, phục hồi chức năng của buồng trứng [78].

Song Kun Kun năm 2019 cùng các cộng sự nghiên cứu hiệu quả điều trị của bài thuốc bổ thận hoạt huyết trên mô hình thực nghiệm gây suy buồng trứng bằng Cyclophosphamide. Nghiên cứu đưa ra kết quả bài thuốc bổ thận hoạt huyết có tác dụng tăng chỉ số buồng trứng, tử cung, thời gian động dục giảm, thông qua sự phục hồi các tế bào MVH và mRNA để phục hồi chức năng buồng trứng [79].

Xuanyi Chen và cộng sự (2017), nghiên cứu tác dụng của bài thuốc Bổ thận điền tinh trên chuột cống Sprague–Dawley gây SGCNBT bằng TG. Kết quả Bổ thận điền tinh có hiệu quả trong điều trị chuột SGCNBT do TG gây ra cũng như thúc đẩy sự tái sinh mạch máu buồng trứng và hạn chế các nang noãn chết theo chương trình [80].



**Chương 2****CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU****2.1. Chất liệu nghiên cứu**

Bài thuốc HV gồm 14 vị thuốc:

Thục địa (*Radix Rehmanniae glutinosae praeparata*) 35g ,

Hoài sơn (*Tuber Dioscoreae persimilis*) 20g,

Bạch truật (*Rhizoma Atractylodis macrocephalic*) 25g,

Bạch thược (*Radix Paeomial lactiflorae* ) 15g,

Mẫu đơn bì (*Cortex Paeomiae suffruticosae* ) 08g,

Nhân sâm (*Radix Ginseng* ) 07g,

Sài hồ (*Bupleurum sinence*) 08g,

Táo nhân (*Semen ziziphi mauritiana*) 08g,

Đương quy (*Radix Angelicae sinensis*) 20g,

Sa sâm (*Radix Glehnine*) 15g,

Đỗ trọng (*Cortex Encommiae*) 08g,

Kỷ tử (*Fruetus Lycii*) 20g

Thỏ ty tử (*Semen Cuscutae*) 15g

Tỏa dương (*Balanophora*) 12g.

Các Dược liệu trong bài thuốc được dùng dưới dạng khô theo tiêu chuẩn của dược điển Việt Nam V.

Dạng thuốc sử dụng: cao lỏng “HV” tỷ lệ 1:1 (100ml cao lỏng tương đương 100g dược liệu). Cao lỏng “HV” Đã được xây dựng tiêu chuẩn cơ sở tại Viện dược liệu quốc gia. ( Phụ lục 1)

Từ cao lỏng 1:1 thuốc được cô đặc theo tỷ lệ thích hợp để cho chuột uống. Liều dùng của thuốc được tính theo gam dược liệu. Tổng bài thuốc là 216g, được sử dụng trên người mỗi ngày 1 thang (216g) [5]. Như vậy liều dùng trên người là  $216\text{g}/50\text{kg}/24\text{h} = 4,32\text{g}/\text{kg}/24\text{h}$ . Quy đổi ra liều trên chuột nhắt trắng (hệ số quy đổi là 12) thì liều dự kiến trên chuột nhắt trắng là  $51,84\text{g}/\text{kg}/24\text{h}$ . Quy đổi ra liều trên chuột cống (hệ số 7) là  $30,24\text{g}/\text{kg}/24\text{h}$ .

## 2.2. Động vật nghiên cứu

110 chuột nhắt trắng giống cái chủng *Swiss* 6 tuần tuổi, khỏe mạnh, trọng lượng  $20 \pm 2g$ .

20 chuột gây mô hình suy giảm chức năng buồng trứng.

40 chuột đánh giá tác dụng bảo vệ của bài thuốc HV trên mô hình chuột gây suy buồng trứng.

50 chuột đánh giá tác dụng điều trị của bài thuốc HV trên mô hình chuột gây suy buồng trứng.

Động vật thực nghiệm do Ban chăn nuôi động vật thí nghiệm – Học viện Quân y cung cấp, nuôi dưỡng trong điều kiện chuẩn về thời gian sáng tối, nhiệt độ, thức ăn, nước sạch. Được nuôi 7 ngày trước khi nghiên cứu.

## 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian: Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 02/2020 đến 08/2020
- Địa điểm : Bộ môn Dược lý – Học viện Quân Y.

## 2.4. Các trang thiết bị phục vụ cho nghiên cứu.

- Kim đầu tù cho chuột uống, cốc chia vạch, bơm kim tiêm 1ml.
- Máy xét nghiệm ELISA.
- Cân điện tử của Nhật, độ chính xác 0,001 gam.



Bộ dụng cụ mô động vật cỡ nhỏ và các dụng cụ thí nghiệm khác.

**Hình 2.1. Máy xét nghiệm ELISA**

**Hình 2.2. Cân Điện tử**

## 2.5. Các hóa chất phục vụ cho nghiên cứu.

- (Tripterygiumglycoside) TG được mua từ Huangshi FeiyunPharmaceutical. 60 mg TG được hòa tan trong 1 ml dimethyl sulfoxide (DMSO), và sau đó hỗn hợp này được hòa tan trong 11mL nước cất để được nồng độ 5 mg/ml.

- 17 - beta estradiol và micronized progesteron (Sigma).

## 2.6. Phương pháp nghiên cứu

### 2.6.1. Chỉ số nghiên cứu

Trọng lượng cơ thể (gam) và chu kỳ động dục của chuột (lần).

Nồng độ FSH (IU/L), Estrogen huyết thanh (ng/dL).

Chỉ số buồng trứng (%), tử cung (%).

Đánh giá mô bệnh học buồng trứng, tử cung.

Hóa mô miễn dịch buồng trứng.

### 2.6.2. Phương pháp tiến hành

#### 2.6.2.1. Phân lô chuột và gây SGCNBT

##### a. Gây mô hình suy buồng trứng bằng TG trên chuột nhắt trắng

Tiến hành nghiên cứu theo phương pháp của Xiu-Ying Chen và cộng sự (2014) [72], của tác giả Min Ma và cộng sự (2017) [81], có cải tiến.

Chuột nhắt trắng giống cái 6 tuần tuổi, được nuôi 1 tuần để thích nghi với môi trường thí nghiệm, sau đó được chia ngẫu nhiên thành 02 lô, mỗi lô 10 con.

+ Lô 1 (lô chứng): không gây SBT, tiêm nước cất 0,1 ml/10g dưới da, hàng ngày trong 35 ngày liên tục vào lúc 8h sáng hàng ngày.

+ Lô 2 (mô hình): gây SBT, tiêm dưới da TG 50mg/kg/ngày (0,1 ml/10g) trong 35 ngày liên tục vào lúc 8h sáng hàng ngày.

##### b. Đánh giá tác dụng bảo vệ của bài thuốc HV trên chuột nhắt trắng tiêm TG gây suy buồng trứng

Tiến hành nghiên cứu theo phương pháp của Xiu-Ying Chen và cộng sự (2014) [72], của tác giả Min Ma và cộng sự (2017) [81], có cải tiến.

Chuột nhắt trắng giống cái 6 tuần tuổi, được nuôi 1 tuần để thích nghi với môi trường thí nghiệm, sau đó được chia ngẫu nhiên thành 04 lô, mỗi lô 08 chuột

Lô1 (chứng sinh lý): không gây suy buồng trứng + uống nước cất.

Lô 2 (mô hình): gây suy buồng trứng + uống nước cất.

Lô 3 (trị 1): gây suy buồng trứng + uống cao lỏng HV liều 51,84g được liệu/kg/ngày (tương đương liều có tác dụng trên người, tính theo hệ số 12).

Lô 4 (trị 2): gây suy buồng trứng + uống cao lỏng HV liều 103,68g được liệu/kg/ngày (gấp đôi liều 1).

Chuột ở lô 2, 3, 4 được gây suy buồng trứng bằng cách cho tiêm dưới da TG 50mg/kg/ngày trong 35 ngày liên tục vào lúc 8h sáng hàng ngày. Chuột không gây suy buồng trứng (lô 1) tiêm nước cất với cùng thể tích vào lúc 8h sáng hàng ngày.

Các chuột nhóm 3, 4 được uống cao lỏng HV vào 14h cùng ngày bắt đầu tiêm TG, các chuột lô 1, 2 uống nước cất, thời gian uống trong 35 ngày song song với tiêm TG.

***c. Đánh giá hiệu quả phục hồi của bài thuốc HV trên chuột nhắt trắng tiêm TG gây suy buồng trứng***

Tiến hành nghiên cứu theo phương pháp của Xiu-Ying Chen và cộng sự (2014) [72], của tác giả Min Ma và cộng sự (2017) [81], có cải tiến.

Chuột nhắt trắng giống cái 6 tuần tuổi, được nuôi 1 tuần để thích nghi với môi trường thí nghiệm, sau đó được chia ngẫu nhiên thành 05 lô, mỗi lô 10 chuột:

- Lô 1 (chứng sinh lý): không gây suy buồng trứng + uống nước cất.

- Lô 2 (mô hình): gây suy buồng trứng + uống nước cất.

- Lô 3 (tham chiếu): gây suy buồng trứng, uống 17 - beta estradiol 60 µg/kg/day + micronized progesteron 24 mg/kg/ngày.

- Lô 4 (trị 1): gây suy buồng trứng + uống cao lỏng HV liều 51,84g được liệu/kg/ngày (tương đương liều có tác dụng trên người, tính theo hệ số 12).

- Lô 5 (trị 2): gây suy buồng trứng + uống cao lỏng HV liều 103,68g được liệu/kg/ngày (gấp đôi liều 1).

Chuột ở lô 2, 3, 4, 5 được gây suy buồng trứng bằng cách cho tiêm dưới da TG 50mg/kg/ngày (0,1 ml/10g) trong 35 ngày liên tục vào lúc 8h sáng hàng ngày. Chuột không gây suy buồng trứng (lô 1) tiêm nước cất với cùng thể tích.

Chuột được uống thuốc hoặc nước cất (theo như phân lô) từ ngày thứ 36, sau khi dừng tiêm TG, uống trong thời gian 20 ngày.

### 2.6.2.2. Đánh giá các chỉ số

#### ❖ Trọng lượng cơ thể và chu kỳ động dục của chuột

- Trọng lượng cơ thể chuột được đánh giá tại các thời điểm: N0 (trước khi gây suy buồng trứng), N35 (sau 35 ngày dùng TG gây suy buồng trứng), N55 (sau 20 ngày uống thuốc).

- Chu kỳ động dục được đánh giá thông qua quan sát trực quan cơ quan sinh dục của chuột kết hợp làm phiến đồ âm đạo.

Chu kỳ động dục bình thường của chuột là 4 - 5 ngày, nếu trên 5 ngày hoặc dưới 4 ngày là bất thường. Đánh giá chu kỳ động dục của chuột trong thời gian 21 ngày cuối của giai đoạn gây suy buồng trứng và thời gian 20 ngày uống thuốc HV bằng phương pháp quan sát trực quan bộ phận sinh dục chuột và phết phiến đồ âm đạo. Tỷ lệ bất thường của chu kỳ động dục và tần số động dục được phân tích.

#### ❖ Nồng độ FSH, Estrogen huyết thanh

Lấy máu hóc mắt chuột vào thời điểm kết thúc thí nghiệm. Các mẫu máu được ly tâm ở 3.000 vòng/phút trong 8 phút để tách huyết thanh. Huyết thanh được lưu trữ ở nhiệt độ âm 80°C cho đến khi phân tích.

FSH huyết thanh được định lượng bằng xét nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA), sử dụng tấm 96 giếng. Với bộ kit xét nghiệm ELISA (của hãng Sigma) chuyên dụng sử dụng cho chuột.

Estrogen huyết thanh được định lượng bằng xét nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA), sử dụng tấm 96 giếng. Với bộ kit xét nghiệm ELISA (của hãng Sigma) chuyên dụng sử dụng cho chuột.

#### ❖ Chỉ số buồng trứng, tử cung và đánh giá mô bệnh học

➤ *Gây mô hình suy buồng trứng bằng TG trên chuột nhắt trắng*: Mổ chuột lấy buồng trứng và tử cung, cân trọng lượng, tính các chỉ số buồng trứng và chỉ số tử cung vào thời điểm N35.

➤ *Mô hình đánh giá tác dụng bảo vệ của bài thuốc HV trên mô hình chuột gây suy buồng trứng*: Mổ chuột lấy buồng trứng và tử cung, cân trọng lượng, tính các chỉ số buồng trứng và chỉ số tử cung vào thời điểm N35.

➤ *Mô hình đánh giá hiệu quả của bài thuốc HV trên mô hình chuột gây suy buồng trứng*: Mổ chuột lấy buồng trứng và tử cung, cân trọng lượng, tính các chỉ số buồng trứng và chỉ số tử cung vào thời điểm N55.

- Mổ chuột lấy buồng trứng và tử cung, cân trọng lượng, tính các chỉ số buồng trứng và chỉ số tử cung theo công thức sau:

+ Chỉ số buồng trứng (%) =  $\frac{\text{trọng lượng buồng trứng}}{\text{trọng lượng cơ thể}} \times 100$  (%)

+ Chỉ số tử cung (%) =  $\frac{\text{trọng lượng tử cung}}{\text{trọng lượng cơ thể}} \times 100$  (%)

- Ngay sau khi cân, buồng trứng và tử cung được cố định trong dung dịch paraformaldehyde 4% trong 2 ngày, đúc paraffin, cắt miêng 4 $\mu$ m, nhuộm hematoxylin và eosin, đọc tiêu bản đánh giá sự biến đổi mô bệnh học của buồng trứng và tử cung.

#### ❖ Hóa mô miễn dịch buồng trứng

Để chẩn đoán phân biệt về bản chất và nguồn gốc của mô nang trứng thông qua sự hiện diện của một số kháng nguyên đặc hiệu.

Ngay sau mổ chuột, buồng trứng được rửa 3 lần bởi PBS, cố định bằng dung dịch paraformaldehyde 4% trong 30 phút, nhúng qua các dung dịch cồn, xylene và đúc paraffin. Cắt và dán mảnh cắt (mảnh cắt dày 6 $\mu$ m), dán lên phiến kính đã tráng 3-aminopropyltriethoxy-silane).

Nhuộm hóa mô miễn dịch: theo quy trình

- Sấy khô phiến kính đã dán lát cắt ở nhiệt độ 37<sup>0</sup>C trong 12 giờ (qua đêm)

- Ủ với kháng thể thứ nhất (primary antibody) Anti-NOTCH-1 (kháng thể đa dòng của chuột, pha loãng 1:1000): 45 phút ở 37<sup>0</sup>C.

- Ủ với kháng thể thứ hai horseradish-peroxidase conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (pha loãng 1:1000): 45 phút ở 37<sup>0</sup>C.

- ABC chromogenic reagent được thêm vào với mục đích để hiện màu.

#### 2.6.2.3. Một số kỹ thuật thực hiện trên động vật thực nghiệm

##### • Kỹ thuật cho chuột uống cường bức

- Cố định chuột bằng một tay.

- Tay còn lại dùng bơm tiêm có gắn kim đầu tù cho vào miệng chuột, bơm nước cất hoặc thuốc nghiên cứu vào thẳng dạ dày chuột theo liều đã xác định.

##### • Kỹ thuật lấy máu và huyết tương làm xét nghiệm

Máu toàn phần gồm huyết tương và tế bào máu. Do đó, để thu nhận huyết tương ta phải loại bỏ tế bào máu ra bằng phương pháp ly tâm.

Cách tiến hành:

- Thu máu hốc mắt chuột: kỹ thuật lấy tại hốc mắt chuột theo Janet Hoff, LVT, RLATG.

+ Cố định chuột bằng một tay, sát trùng vùng xung quanh mắt chuột.

+ Dùng micro pipet đâm vào mạch vành gần hốc mắt chuột, thu nhận máu bằng ống eppendoff.

- Thu huyết tương:

Ly tâm máu toàn phần 2500 rpm/phút trong 10 phút, sau đó ly tâm 4000 rpm/phút trong 5 phút, thu dịch nổi là huyết tương.

• *Kỹ thuật quan sát trực quan, kết hợp làm phiến đồ âm đạo xác định chu kỳ động dục của chuột. Kỹ thuật tiến hành theo hướng dẫn của tác giả Shannon L. Byers và cộng sự [82][83].*

- Độ tuổi mở âm đạo ở chuột được ghi lại bằng cách theo dõi chuột mỗi sáng từ 24 ngày đến 30 ngày tuổi. Thông thường mở được phát hiện thông qua một kiểm tra trực quan đơn giản của âm hộ. Ở chuột, mở âm đạo xảy ra khoảng 26 ngày tuổi.

- *Kỹ thuật quan sát trực quan:*

+ Chuột được cố định bằng đuôi và 2 chân trước trên nắp lồng.

+ Quan sát trực tiếp bộ phận sinh dục của chuột dưới điều kiện đủ ánh sáng.

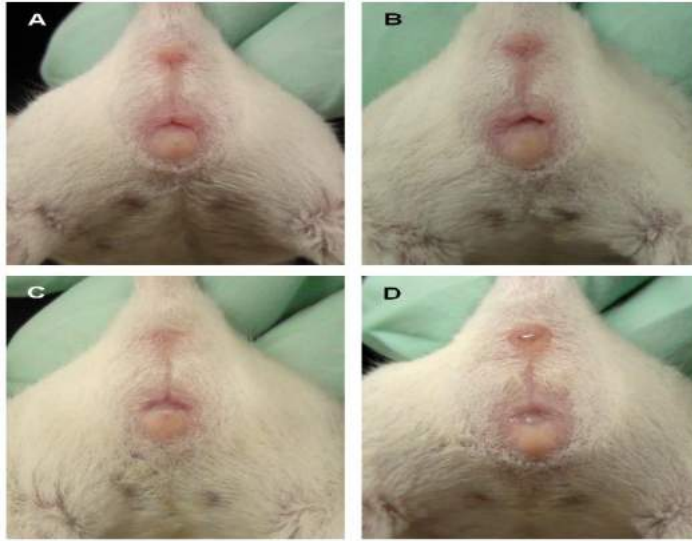
Các giai đoạn động dục được xác định dựa vào đặc điểm sau:

Giai đoạn không động dục: lỗ âm đạo nhỏ và đóng, âm đạo không sưng.

Giai đoạn trước động dục: lỗ âm đạo mở rộng, mô sung, hồng, ẩm.

Giai đoạn động dục: lỗ âm đạo mở rộng, âm đạo ít hồng hơn, ít ẩm hơn và ít sưng hơn

Giai đoạn hậu động dục: lỗ âm đạo không mở rộng, âm đạo không sưng, có thể nhìn thấy mảnh tế bào trắng.



**Hình 2.3. Các giai đoạn trong chu kỳ động dục**

- A. Giai đoạn trước động dục (proestrus)
- B. Giai đoạn động dục (estrus)
- C. Giai đoạn sau động dục (metestrus)
- D. Giai đoạn không động dục (diestrus)

- *Làm phiến đồ âm đạo*

*Thu thập số liệu vào cùng thời điểm mỗi ngày*

- + Chuột được cố định bằng đuôi và 2 chân trước trên nắp lồng.
- + Dùng pipet pasteur nhựa 1ml bơm 1-2 giọt nước muối sinh lý vào âm đạo chuột, thực hiện động tác hút ra hút vào vài lần.
- + Hút nước muối sinh lý trong âm đạo chuột ra dần trên lam kính.
- + Cố định và nhuộm giem sa phết âm đạo.
- + Soi phết âm đạo dưới kính hiển vi VK100.

Xác định giai đoạn động dục của chuột bằng sự có mặt hay không có mặt các tế bào bạch cầu, tế bào biểu mô vảy sừng hóa và tế bào có nhân.

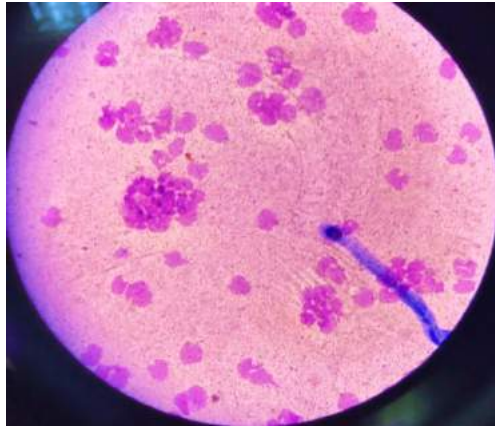
**Giai đoạn không động dục:** chủ yếu là sự có mặt của tế bào bạch cầu đa nhân và một ít tế bào biểu mô.

**Giai đoạn trước động dục:** điển hình bởi sự xuất hiện chủ yếu các tế bào có nhân và một vài tế bào biểu mô.

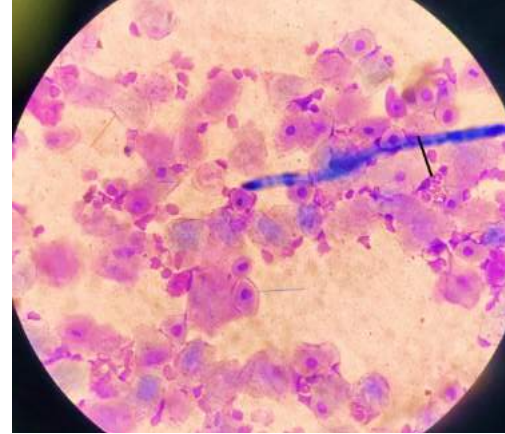
**Giai đoạn động dục:** chủ yếu là các tế bào biểu mô vảy sừng hóa



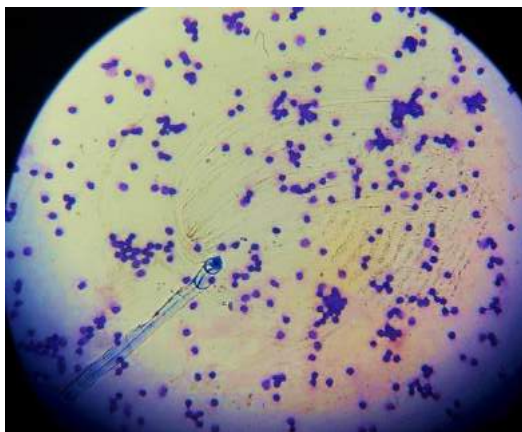
**Giai đoạn hậu động dục:** chủ yếu là các tế bào biểu mô vảy sừng hóa và một vài tế bào bạch cầu đa nhân



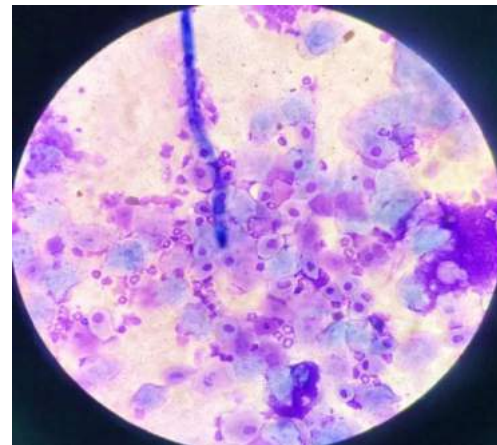
**A. Giai đoạn động dục**



**B. Giai đoạn hậu động dục**



**C. Giai đoạn không động dục**

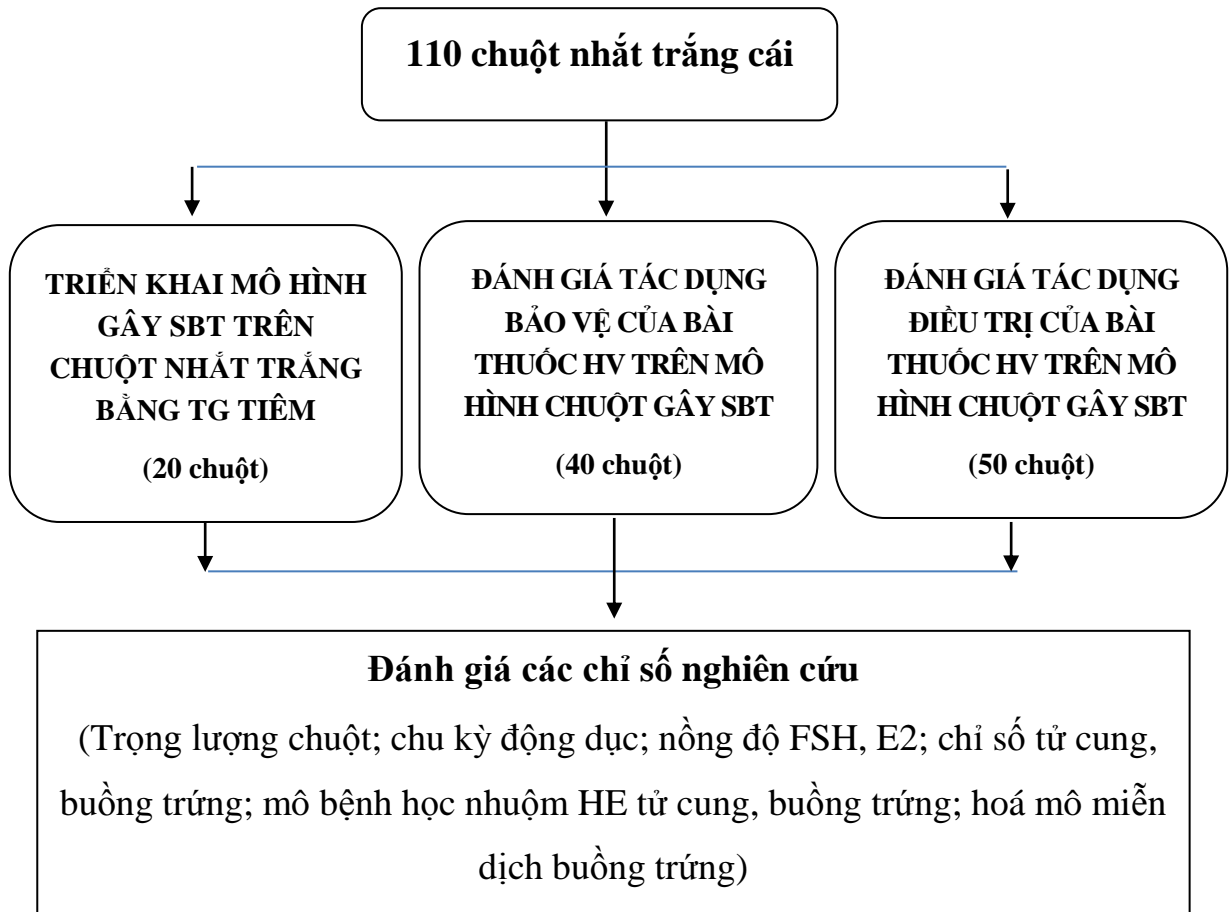


**D. Giai đoạn trước động dục**

**Hình 2.4. Các giai đoạn động dục của chuột xác định bằng bằng phiên đồ âm đạo**

## 2.7. Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý theo các phương pháp thống kê y sinh học, áp dụng các phương pháp phân tích mô tả: tính tỷ lệ phần trăm, giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, so sánh giá trị trung bình bằng T-student test sử dụng phần mềm Microsoft Excel. Số liệu được biểu diễn dưới dạng  $\bar{X} \pm SD$ . Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p < 0,05$ .

**SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU**

### Chương 3

#### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Kết quả gây mô hình suy buồng trứng bằng TG trên chuột nhắt trắng.

##### 3.1.1. Kết quả đánh giá trọng lượng cơ thể chuột trong nghiên cứu gây mô hình

Kết quả được trình bày ở bảng 3.1.

**Bảng 3.1. Trọng lượng cơ thể chuột trong nghiên cứu gây mô hình (n = 10)**

Lô chuột nghiên cứu	Trọng lượng chuột (g)		P <sub>b-a</sub>
	(Mean ± SD)		
	D0 (a)	D35 (b)	
Lô 1 (chứng) (1)	20,15 ± 0,56	26,21 ± 0,93	< 0,05
Lô 2 (mô hình) (2)	20,28 ± 0,64	25,15 ± 0,86	
P <sub>2-1</sub>	> 0,05		

#### Nhận xét:

- Ở tất cả các lô nghiên cứu, trọng lượng chuột ở thời điểm sau so với thời điểm trước đều tăng có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

- Ở lô mô hình (lô 2) chuột được tiêm dưới da TG trong 35 ngày để gây suy buồng trứng, qua quan sát nhận thấy tất cả các chuột đều có biểu hiện xù lông, mệt mỏi hơn so với lô chứng. Tại thời điểm sau 35 ngày tiêm TG, cân nặng của chuột ở lô mô hình giảm tuy nhiên chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Như vậy, thuốc TG tiêm cho chuột để gây suy buồng trứng có làm cho chuột có biểu hiện mệt mỏi, xù lông, có xu hướng làm chuột phát triển cân nặng kém hơn, tuy nhiên chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng.

### 3.1.2. Kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột trong nghiên cứu gây mô hình

Kết quả được trình bày ở bảng 3.2

**Bảng 3.2. Kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột ở 21 ngày cuối tiêm TG trong nghiên cứu gây mô hình (n = 10)**

Lô chuột nghiên cứu	Tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường của chuột (%) (Mean ± SD)	Tần số chu kỳ động dục của chuột (lần) (Mean ± SD)
Lô 1 (lô chứng) (1)	6,85 ± 9,85	4,68 ± 1,62
Lô 2 (mô hình) (2)	95,42 ± 10,77	2,04 ± 0,63
P <sub>2-1</sub>	< 0,01	< 0,01

#### Nhận xét:

Kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột (qua quan sát trực quan và phiên đồ âm đạo) trong 21 ngày cuối tiêm TG cho thấy, ở lô mô hình (lô tiêm TG), tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường của chuột tăng cao và tần số chu kỳ động dục của chuột giảm, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ . Chuột tiêm thuốc TG 35 ngày đã gây rối loạn rõ chu kỳ động dục của chuột.

### 3.1.3. Kết quả đánh giá nồng độ FSH, E2 huyết thanh của chuột trong nghiên cứu gây mô hình.

Kết quả được trình bày ở bảng 3.3

**Bảng 3.3. Kết quả đánh giá nồng độ FSH, E2 huyết thanh chuột trong nghiên cứu gây mô hình (n = 10)**

Lô chuột nghiên cứu	Nồng độ FSH (IU/L) (Mean ± SD)	Nồng độ E2 (ng/dL) (Mean ± SD)
Lô 1 (lô chứng) (1)	10,32 ± 0,56	526,42 ± 58,46
Lô 2 (mô hình) (2)	15,02 ± 2,84	328,61 ± 51,36
P <sub>2-1</sub>	< 0,01	< 0,01

#### Nhận xét:

- So với lô chứng, chuột ở lô mô hình có nồng độ FSH tăng cao, nồng độ E2 giảm rõ, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

### 3.1.4. Kết quả đánh giá chỉ số buồng trứng và tử cung trong nghiên cứu gây mô hình.

Kết quả được trình bày ở bảng 3.1.4

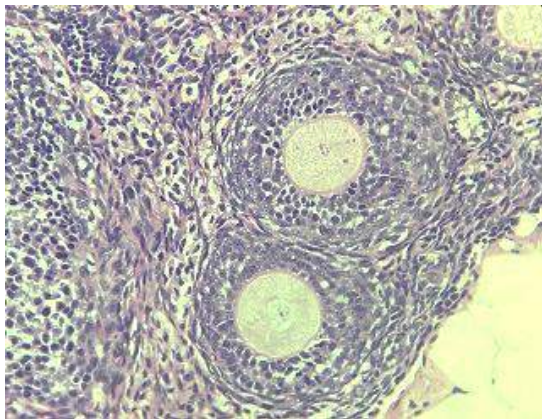
**Bảng 3.4. Kết quả đánh giá chỉ số buồng trứng, tử cung chuột trong nghiên cứu gây mô hình (n = 10)**

Lô chuột nghiên cứu	Chỉ số buồng trứng (%) (Mean ± SD)	Chỉ số tử cung (%) (Mean ± SD)
Lô 1 (chứng sinh lý) (1)	0,056 ± 0,009	0,405 ± 0,037
Lô 2 (mô hình) (2)	0,027 ± 0,005	0,248 ± 0,052
p <sub>2-1</sub>	< 0,01	< 0,01

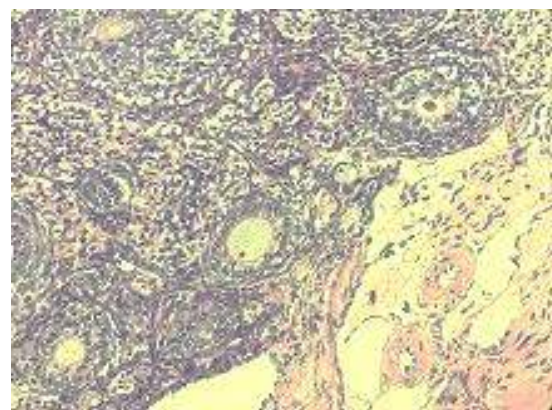
#### Nhận xét:

So với lô chứng, chuột ở lô mô hình có chỉ số buồng trứng và chỉ số tử cung giảm rõ, với  $p < 0,01$ . Hóa chất TG dùng cho chuột uống đã làm teo nhỏ tử cung và buồng trứng của chuột.

### 3.1.5. Kết quả đánh giá mô bệnh học nhuộm HE của buồng trứng và tử cung chuột trong nghiên cứu gây mô hình.



**Lô chứng**

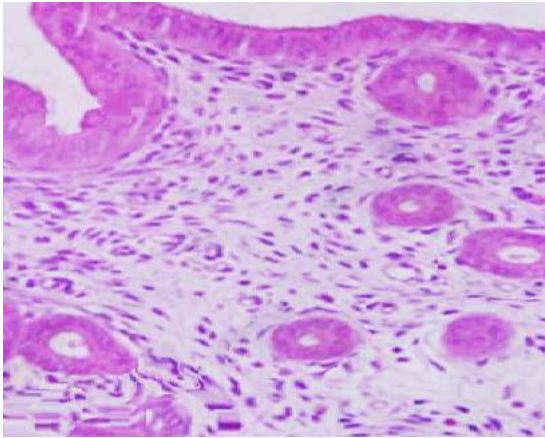


**Lô mô hình**

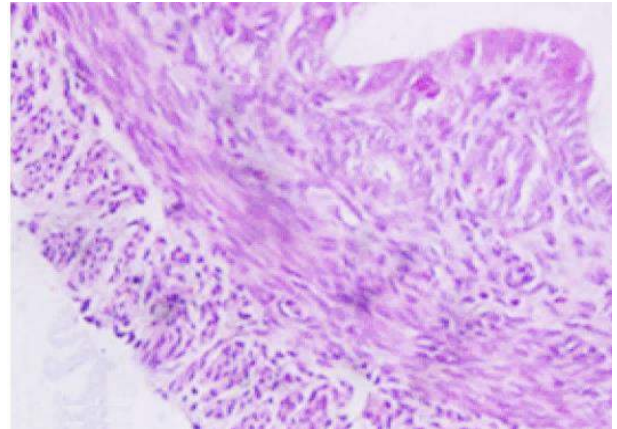
**Hình 3.1. Hình ảnh vi thể buồng trứng chuột nghiên cứu gây mô hình(HE,X200)**

Mô bệnh học nhuộm HE của buồng trứng chuột ở lô mô hình có sự biến đổi rõ rệt với việc giảm các nang trứng phát triển và giảm các hoàng thể, so với ở lô chứng.





Lô chứng

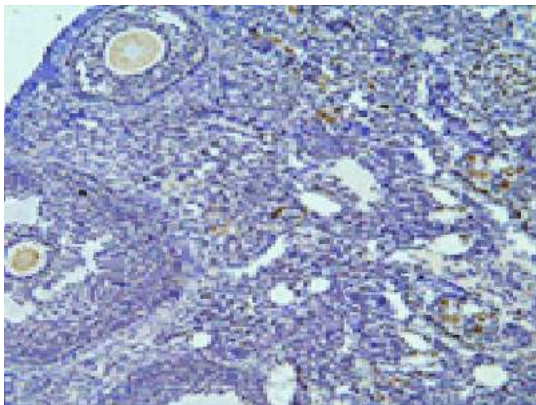


Lô mô hình

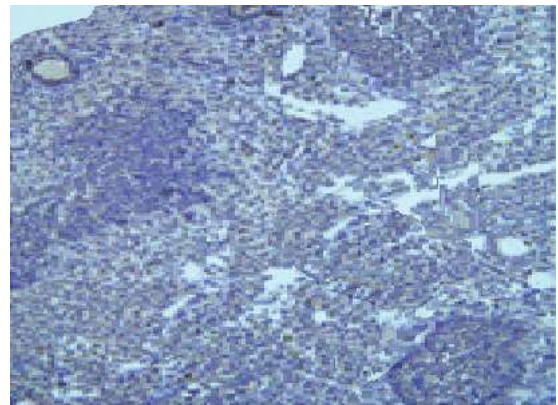
**Hình 3.2. Hình ảnh vi thể tử cung chuột nghiên cứu gây mô hình (HE, X800)**

Mô bệnh học nhuộm HE của tử cung chuột ở lô mô hình có biểu hiện nội mạc tử cung mỏng hơn và giảm các tuyến khi so sánh với ở lô chứng.

**3.1.6. Kết quả đánh giá mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột trong nghiên cứu gây mô hình.**



Lô chứng



Lô mô hình

**Hình 3.3. Hình ảnh vi thể buồng trứng chuột nhuộm hóa mô miễn dịch Anti-NOTCH-1 dương tính mạnh (x 200)**

Mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột đánh giá biểu hiện của protein Notch1, là protein thuộc con đường tín hiệu Notch1 có vai trò quan trọng trong phát triển và cân bằng nội mô bằng cách điều hòa sự tăng sinh, biệt hóa và tự chết (apoptosis) của các tế bào. Kết quả cho thấy ở lô mô hình có sự biến đổi rõ rệt với việc giảm rõ rệt biểu hiện của protein Notch1 so với ở lô chứng.

### 3.2. Đánh giá tác dụng bảo vệ của bài thuốc HV trên mô hình chuột gây suy buồng trứng

#### 3.2.1. Kết quả đánh giá trọng lượng cơ thể chuột

Kết quả được trình bày ở bảng 3.5

**Bảng 3.5. Trọng lượng cơ thể chuột ở các lô chuột nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ của bài thuốc HV trên mô hình chuột gây suy buồng trứng (n = 10)**

Lô chuột nghiên cứu	Trọng lượng chuột (g) (Mean ± SD)		p
	D0 (a)	D35 (b)	
Lô 1 (lô chứng) (1)	20,26 ± 0,08	27,14 ± 1,15	p < 0,05
Lô 2 (mô hình) (2)	20,19 ± 0,09	25,12 ± 1,11	
Lô 3 (trị 1) (3)	20,28 ± 0,15	26,62 ± 0,78	
Lô 4 (trị 2) (4)	20,23 ± 0,28	26,94 ± 0,83	
PD0-D35	p > 0,05		

#### Nhận xét:

- Qua quan sát thấy chuột ở lô mô hình (lô 2) tiêm TG có biểu hiện lông xù, giảm hoạt động, ăn uống kém. Chuột ở lô trị 1 (lô 3) và lô trị 2 (lô 4) lông mượt, hoạt động và ăn uống bình thường, không có sự khác biệt so với lô chứng.

- So với thời điểm trước điều trị (D0), trọng lượng chuột ở các lô tại thời điểm D35 đều tăng có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

- So sánh giữa các lô, trọng lượng chuột tại các thời điểm đánh giá (D0 và D35) đều không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

Như vậy, thuốc HV không làm ảnh hưởng đến sự phát triển thể trọng của chuột. Thuốc HV có tác dụng bảo vệ được chuột khỏi các tác động gây lông xù, giảm hoạt động, ăn uống kém do tiêm TG.

#### 3.2.2. Kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột

Qua quan sát trực quan và phiên đồ âm đạo cho kết quả lô 1 (lô sinh lý) chu kỳ động dục 4-5 ngày, lô 2 (lô mô hình) chu kỳ động dục 6-8 ngày/chu kỳ, lô 3 (lô trị 1) chu kỳ động dục 5-6 ngày/chu kỳ, lô 4 (lô trị 2) chu kỳ động dục 4-5 ngày. Kết quả tính toán tần số chu kỳ động dục và đánh giá tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường của chuột được trình bày ở bảng 3.6

**Bảng 3.6. Kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột trong 21 ngày cuối tiêm TG và uống thuốc HV (n= 10) .**

<b>Lô chuột nghiên cứu</b>	<b>Tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường của chuột (%) (Mean ± SD)</b>	<b>Tần số chu kỳ động dục (lần) (Mean ± SD)</b>
Lô 1 (lô chứng) (1)	6,00 ± 9,67	4,70 ± 0,48
Lô 2 (mô hình) (2)	97,50 ± 7,91	2,70 ± 0,68
Lô 3 (trị 1) (3)	56,67 ± 11,94	4,30 ± 0,82
Lô 4 (trị 2) (4)	46,66 ± 9,81	4,60 ± 0,70
<b>P</b>	$p_{2-1} < 0,01$ ; $p_{3-1} < 0,01$ ; $p_{4-1} < 0,01$ ; $p_{3-2} < 0,01$ $p_{4-2} < 0,0$ ; $p_{1-2} < 0,01$ $p_{3-4} < 0,05$	$p_{2-1} < 0,01$ $p_{3,4-2} < 0,01$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{3,4-1} > 0,05$

**Nhận xét:**

- So với lô chứng, chuột ở lô mô hình có tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường cao hơn, tần số chu kỳ động dục thấp hơn, có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

- So với lô mô hình, chuột ở 2 lô dùng thuốc HV (lô trị 1 và lô trị 2) có tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường thấp hơn, tần số chu kỳ động dục cao hơn, có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ . Tần số chu kỳ động dục của các lô dùng thuốc hồi phục về tương đương với lô chứng ( $p > 0,05$ ), tuy nhiên tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường có giảm nhưng vẫn chưa hồi phục về mức tương đương so với lô chứng ( $p < 0,05$ ).

- So sánh giữa 2 lô dùng thuốc HV, lô dùng liều cao (trị 2) có tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường thấp hơn, tần số chu kỳ động dục cao hơn, có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$



### 3.2.3. Kết quả đánh giá nồng độ FSH, Estrogen huyết thanh của chuột.

Kết quả được trình bày ở bảng 3.7

**Bảng 3.7. Đánh giá nồng độ FSH, E2 huyết thanh chuột**

Lô chuột nghiên cứu	Nồng độ FSH (IU/L) (Mean ± SD)	Nồng độ E2 (ng/dL) (Mean ± SD)
Lô 1 (chứng sinh lý) (1)	10,35 ± 0,74	542,04 ± 51,50
Lô 2 (mô hình) (2)	14,83 ± 1,05	313,19 ± 42,12
Lô 3 (trị 1) (3)	11,54 ± 1,12	472,05 ± 54,65
Lô 4 (trị 2) (4)	11,30 ± 1,08	484,06 ± 66,36
P	p <sub>-2</sub> < 0,01; p <sub>3-1</sub> < 0,05 p <sub>4-1</sub> > 0,05; p <sub>4-3</sub> > 0,05	p <sub>-2</sub> < 0,01; p <sub>3-1</sub> < 0,05 p <sub>4-1</sub> > 0,05; p <sub>4-3</sub> > 0,05

#### Nhận xét:

- So với lô chứng, chuột ở lô mô hình có nồng độ FSH tăng cao, nồng độ E2 giảm rõ với  $p < 0,01$ .

- Chuột ở các lô dùng thuốc (lô 3, lô 4) có nồng độ FSH giảm, nồng độ E2 tăng so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Như vậy thuốc “HV” cho chuột uống có tác dụng bảo vệ, làm giảm sự rối loạn hormon FSH và E2 ở các chuột gây suy buồng trứng bằng TG.

- Tác dụng bảo vệ làm giảm rối loạn hormon FSH và E2 ở lô 4 (lô dùng thuốc liều cao) rõ hơn so với lô dùng thuốc liều thấp (lô 3), tuy nhiên sự khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.4. Kết quả đánh giá chỉ số buồng trứng và tử cung trong nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ của cao lỏng HV

Kết quả được trình bày ở bảng 3.8

**Bảng 3.8. Đánh giá chỉ số buồng trứng của chuột sau 35 ngày**

Lô chuột nghiên cứu	Chỉ số buồng trứng (%) (Mean ± SD)	Chỉ số tử cung (%) (Mean ± SD)
Lô 1 (lô chứng) (1)	0,065 ± 0,005	0,453 ± 0,036
Lô 2 (mô hình) (2)	0,029 ± 0,002	0,292 ± 0,061
Lô 3 (trị 1) (3)	0,053 ± 0,009	0,404 ± 0,040
Lô 4 (trị 2) (4)	0,063 ± 0,007	0,433 ± 0,044
P	$P_{2-1} < 0,01; p_{3-1} > 0,05; p_{4-1} > 0,05$ $p_{3,4-2} < 0,01; p_{4-3} > 0,05$	$p_{1-2} < 0,01; p_{3-2} < 0,01;$ $p_{4-2} < 0,01; p_{3-4} > 0,05$ $; p_{4-1} > 0,05; p_{3-1} > 0,05$

#### Nhận xét:

- So với lô chứng, chuột ở lô mô hình có chỉ số buồng trứng và chỉ số tử cung giảm rõ, với  $p < 0,01$ . Hóa chất TG tiêm cho chuột đã làm teo nhỏ tử cung và buồng trứng của chuột.

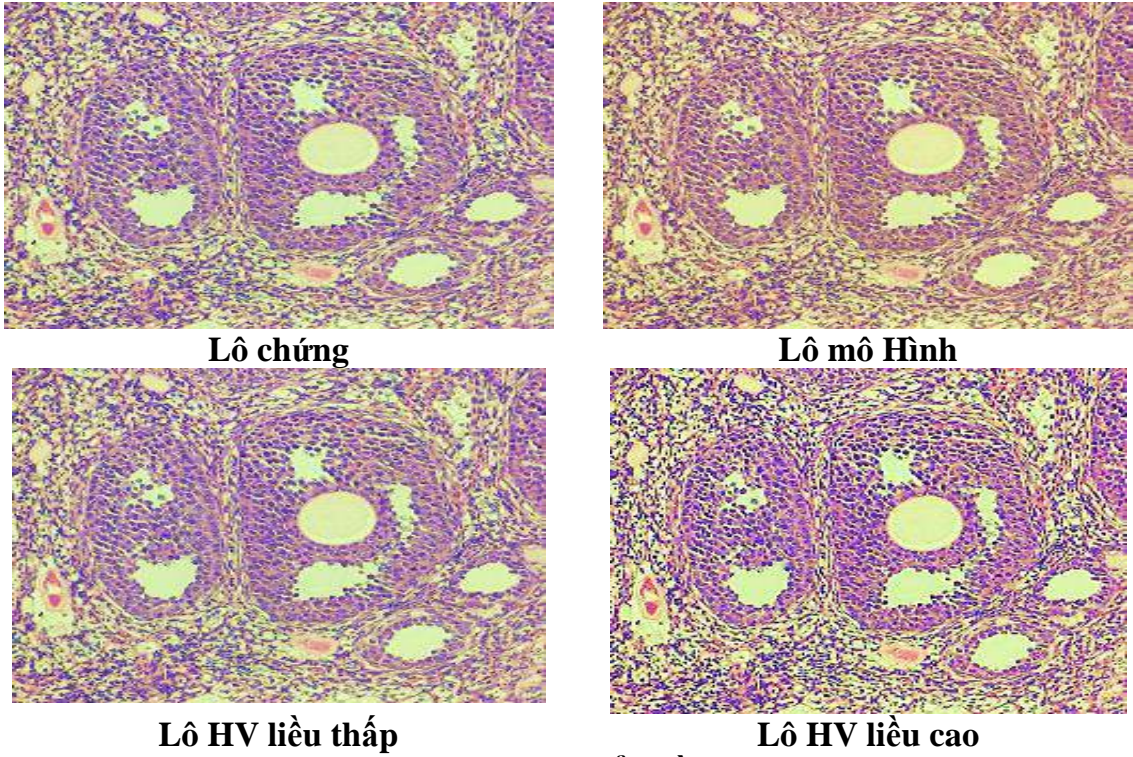
- Các chuột ở lô 3, lô 4 có chỉ số buồng trứng và chỉ số tử cung tăng so với lô mô hình với  $p < 0,01$ . Như vậy cao lỏng HV chuột uống đã làm hồi phục khối lượng tử cung và buồng trứng bị teo nhỏ do TG. Sự phục hồi buồng trứng và tử cung lô 3, lô 4 trở về mức tương đương so với lô chứng ( $p_{4-3} > 0,05$ ).

### 3.2.5. Kết quả đánh giá mô bệnh học buồng trứng và tử cung nhuộm HE trong nghiên cứu tác dụng của cao lỏng HV.

Mô bệnh học buồng trứng và tử cung chuột được làm tiêu bản nhuộm HE. Kết quả đánh giá như sau:

- Mô bệnh học buồng trứng của chuột ở lô mô hình có sự biến đổi rõ rệt với việc giảm các nang trứng phát triển và giảm các hoàng thể, so với chuột ở lô chứng. Ở lô 3 và lô 4 là các lô có dùng cao lỏng "HV", số lượng các nang trứng phát triển và các hoàng thể cao hơn so với lô mô hình, tuy nhiên vẫn còn giảm nhẹ so với lô chứng.

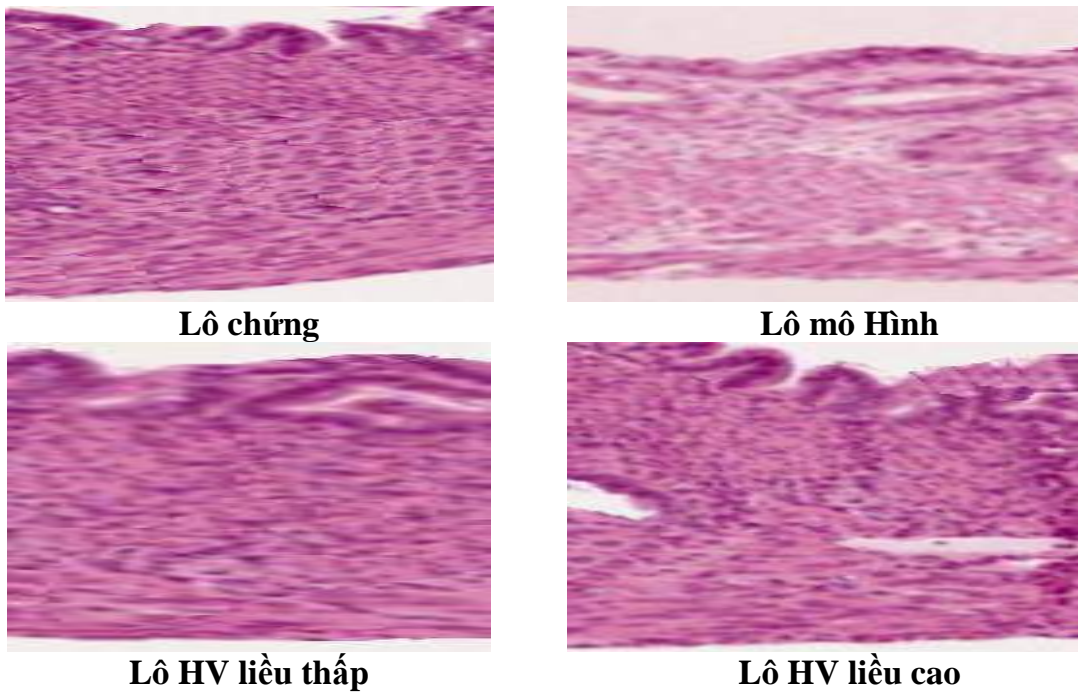
- Mô bệnh học tử cung của chuột ở lô mô hình cho thấy có biểu hiện nội mạc tử cung mỏng hơn và giảm các tuyến khi so sánh với lô chứng. Ở lô 3 và lô 4 là các lô có dùng cao lỏng "HV", các biểu hiện trên giảm rõ so với lô mô hình, gần tương đương so với lô chứng.



**Lô HV liều thấp**

**Lô HV liều cao**

**Hình 3.4. Hình ảnh vi thể buồng trứng chuột nghiên cứu tác dụng bảo vệ của cao lỏng HV (HE, X200)**



**Lô chững**

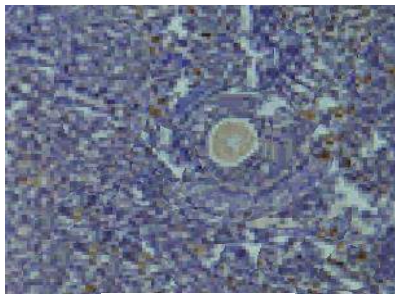
**Lô mô Hình**

**Lô HV liều thấp**

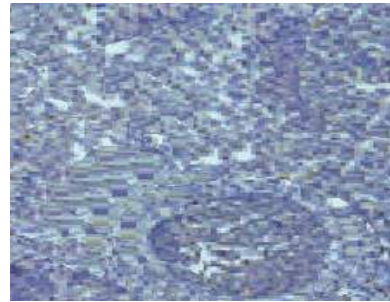
**Lô HV liều cao**

**Hình 3.5. Hình ảnh vi thể tử cung chuột nghiên cứu tác dụng bảo vệ của cao lỏng HV (HE, X200)**

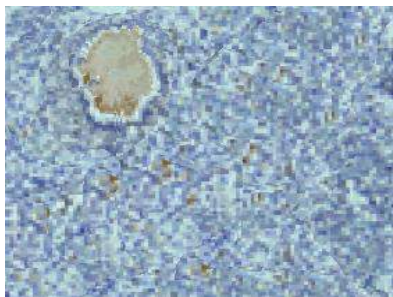
**3.2.6. Kết quả đánh giá mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột trong nghiên cứu tác dụng bảo vệ của cao lỏng HV.**



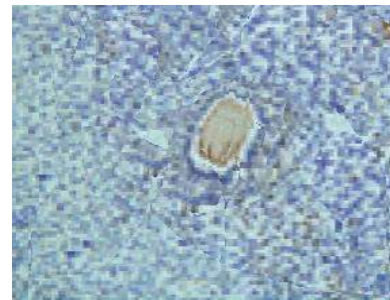
**Lô chứng**



**Lô mô hình**



**Lô HV liều thấp**



**Lô HV liều cao**

**Hình 3. 6. Hình ảnh vi thể buồng trứng chuột nghiên cứu tác dụng bảo vệ của cao lỏng HV, nhuộm hóa mô miễn dịch Anti-NOTCH-1 dương tính mạnh (x 200).**

Mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột đánh giá biểu hiện của protein Notch1, là protein thuộc con đường tín hiệu Notch1 có vai trò quan trọng trong phát triển và cân bằng nội mô bằng cách điều hòa sự tăng sinh, biệt hóa và tự chết (apoptosis) của các tế bào.

Kết quả đánh giá mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột cho thấy:

- Ở lô mô hình, biểu hiện của protein Notch1 giảm rõ rệt so với ở lô chứng.
- Ở lô 3 và lô 4 là các lô có dùng cao lỏng “HV” biểu hiện của protein Notch1 thể hiện rõ rệt hơn so với lô mô hình, tuy nhiên vẫn còn giảm hơn so với lô chứng.
- Biểu hiện của protein Notch1 trên tiêu bản mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột ở các lô 3 và lô 4 là các lô có dùng cao lỏng “HV” không có sự khác biệt đáng kể

### 3.3. Đánh giá hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của bài thuốc HV trên mô hình chuột gây suy buồng trứng bằng TG dạng tiêm.

#### 3.3.1. Kết quả đánh giá trọng lượng cơ thể chuột trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV.

Kết quả được trình bày ở bảng 3.9

**Bảng 3.9. Trọng lượng cơ thể chuột ở các lô nghiên cứu (n = 10)**

Lô chuột nghiên cứu	Trọng lượng chuột (g)			P
	(Mean ± SD)			
	D0 (a)	D35 (b)	D55 (c)	
Lô 1 (lô chứng) (1)	20,18 ± 0,66	26,22 ± 0,68	30,82 ± 0,91	$p_{b-a} < 0,05$ $p_{c-a} < 0,01$ $p_{c-b} < 0,05$
Lô 2 (mô hình) (2)	20,21 ± 0,54	26,17 ± 0,73	29,68 ± 1,56	
Lô 3 (tham chiếu) (3)	20,26 ± 0,51	26,25 ± 0,93	30,95 ± 1,08	
Lô 4 (trị 1) (4)	20,14 ± 0,49	26,23 ± 0,66	30,69 ± 1,36	
Lô 5 (trị 2) (5)	20,31 ± 0,63	26,28 ± 0,81	30,94 ± 1,13	
P	$p_{2,3,4,5-1} > 0,05$ ; $p_{3,4,5-2} > 0,05$ ; $p_{4,5-3} > 0,05$ ; $p_{5-4} > 0,05$			

#### Nhận xét:

- Ở tất cả các lô nghiên cứu, trọng lượng chuột ở thời điểm sau so với thời điểm trước đều tăng có ý nghĩa thống kê.

- Ở các lô 2, 3, 4, 5 chuột được tiêm hóa chất TG trong 35 ngày để gây suy buồng trứng, qua quan sát nhận thấy các chuột đều có biểu hiện xù lông, mệt mỏi hơn so với lô chứng. Sau thời gian dùng thuốc, biểu hiện xù lông, mệt mỏi giảm rõ ở các lô dùng thuốc so với lô chứng. Tuy nhiên, chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các lô nghiên cứu tại tất cả các thời điểm đo (trước gây suy buồng trứng, sau 35 ngày dùng TG để gây suy buồng trứng và sau 20 ngày uống thuốc).



**3.3.2. Kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV.**

Kết quả được trình bày ở bảng 3.10

**Bảng 3.10. Kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột ở 20 ngày uống HV trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV (n = 10).**

<b>Lô chuột nghiên cứu</b>	<b>Tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường của chuột (%) (Mean ± SD)</b>	<b>Tần số chu kỳ động dục (lần) (Mean ± SD)</b>
Lô 1 (lô chứng) (1)	6,62 ± 9,12	4,59 ± 0,74
Lô 2 (mô hình) (2)	86,83 ± 12,45	2,12 ± 0,69
Lô 3 (tham chiếu) (3)	58,62 ± 10,02	3,92 ± 0,82
Lô 4 (trị 1) (4)	61,75 ± 9,96	3,86 ± 0,91
Lô 5 (trị 2) (5)	56,89 ± 10,12	3,95 ± 0,89
<b>P</b>	$p_{2-1} < 0,01; p_{3,4,5-1} < 0,01;$ $p_{3,4,5-2} < 0,01; p_{4,5-3} > 0,05; p_{4-5} > 0,05$	$p_{2-1} < 0,01; p_{3,4,5-1} > 0,05;$ $p_{3,4,5-2} < 0,05; p_{4,5-3} > 0,05; p_{4-5} > 0,05$

**Nhận xét:**

- So với lô chứng, lô mô hình có tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường tăng cao và tần số chu kỳ động dục giảm có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

- Ở các lô gây suy buồng trứng và được dùng thuốc (lô 3, lô 4 và lô 5), các biểu hiện rối loạn chu kỳ động dục ở chuột giảm rõ. So với lô mô hình, ở các lô dùng thuốc có tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường giảm có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ , tần số chu kỳ động dục tăng có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Tần số chu kỳ động dục của các lô dùng thuốc hồi phục về tương đương với lô chứng ( $p > 0,05$ ), tuy nhiên tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường có giảm nhưng vẫn chưa hồi phục về mức tương đương so với lô chứng ( $p < 0,05$ ).

- So sánh giữa các lô dùng thuốc chưa thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**3.3.3. Kết quả đánh giá nồng độ FSH, E2 huyết thanh của chuột trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV.**

Kết quả được trình bày ở bảng 3.11

**Bảng 3.11. Nồng độ FSH, E2 huyết thanh chuột trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV (n = 10).**

Lô chuột nghiên cứu	Nồng độ FSH (IU/L) (Mean ± SD)	Nồng độ E2 (ng/dL) (Mean ± SD)
Lô 1 (lô chứng) (1)	10,26 ± 0,66	531,26 ± 52,84
Lô 2 (mô hình) (2)	14,85 ± 1,12	319,83 ± 48,96
Lô 3 (tham chiếu) (3)	11,95 ± 0,95	469,81 ± 69,64
Lô 4 (trị 1) (4)	12,32 ± 1,68	422,57 ± 90,16
Lô 5 (trị 2) (5)	12,18 ± 1,05	434,19 ± 88,62
P	$p_{2-1} < 0,01; p_{3,4,5-1} < 0,05$ $p_{3,4,5-2} < 0,05; p_{4,5,3} > 0,05; p_{4,5} > 0,05$	$p_{2-1} < 0,01; p_{3,4,5-1} < 0,05$ $p_{3,4,5-2} < 0,05; p_{4,5,3} > 0,05; p_{4,5} > 0,05$

**Nhận xét:**

- So với lô chứng, chuột ở lô mô hình có nồng độ FSH tăng cao, nồng độ E2 giảm rõ với  $p < 0,01$ .

- Chuột ở các lô dùng thuốc (lô 3, lô 4 và lô 5) có nồng độ FSH giảm, nồng độ E2 tăng so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Như vậy thuốc “HV” cũng như thuốc tham chiếu cho chuột uống có tác dụng làm hồi phục sự rối loạn hormon FSH và E2 ở các chuột gây suy buồng trứng bằng TG. Tuy nhiên sự hồi phục chưa trở về mức tương đương so với lô chứng ( $p_{3,4-1} < 0,05$ ).

- Sự hồi phục rối loạn hormon FSH và E2 ở lô 4 (lô dùng thuốc liều cao) có giá trị hồi phục rõ hơn so với lô dùng thuốc liều thấp (lô 3), tuy nhiên sự khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). So sánh giữa 2 lô dùng cao lỏng HV, sự hồi phục hormon FSH và E2 thấp hơn nhưng khác biệt không ý nghĩa thống kê so với ở lô tham chiếu dùng 17 - beta estradiol + micronized progesteron ( $p > 0,05$ ).

**3.3.4. Kết quả đánh giá chỉ số buồng trứng và tử cung trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV.**

Kết quả được trình bày ở bảng 3.12.

**Bảng 3.12. Chỉ số buồng trứng, tử cung chuột trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV (n = 10).**

<b>Lô chuột nghiên cứu</b>	<b>Chỉ số buồng trứng (%) (Mean ± SD)</b>	<b>Chỉ số tử cung (%) (Mean ± SD)</b>
Lô 1 (lô chứng) (1)	0,054 ± 0,007	0,401 ± 0,042
Lô 2 (mô hình) (2)	0,026 ± 0,006	0,246 ± 0,063
Lô 3 (tham chiếu) (3)	0,036 ± 0,009	0,346 ± 0,062
Lô 4 (trị 1) (4)	0,035 ± 0,010	0,342 ± 0,056
Lô 5 (trị 2) (5)	0,038 ± 0,008	0,351 ± 0,049
p	$p_{2-1} < 0,01; p_{3,4,5-1} < 0,05;$ $p_{3,4,5-2} < 0,05; p_{5,4,3} > 0,05; p_{5,4} > 0,05$	$p_{2-1} < 0,01; p_{3,4,5-1} < 0,05;$ $p_{3,4,5-2} < 0,05; p_{5,4,3} > 0,05; p_{5,4} > 0,05$

**Nhận xét:**

- So với lô chứng, chuột ở lô mô hình có chỉ số buồng trứng và chỉ số tử cung giảm rõ, với  $p < 0,01$ . Hóa chất TG tiêm cho chuột đã làm teo nhỏ tử cung và buồng trứng của chuột.

- Các chuột ở lô 3, lô 4 và lô 5 có chỉ số buồng trứng và chỉ số tử cung tăng so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Như vậy cao lỏng "HV" cũng như thuốc tham chiếu cho chuột uống đã làm hồi phục khối lượng tử cung và buồng trứng bị teo nhỏ do TG. Tuy nhiên sự hồi phục chưa trở về mức tương đương so với lô chứng ( $p_{3,4,5-1} < 0,05$ ).

- Sự hồi phục chỉ số buồng trứng và chỉ số tử cung ở lô 5 (lô dùng cao lỏng HV liều cao) rõ hơn so với lô dùng cao lỏng HV liều thấp (lô 4), tuy nhiên sự khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). So sánh giữa 2 lô dùng cao lỏng HV so với lô dùng thuốc tham chiếu (17 - beta estradiol + micronized progesteron) thấy sự hồi phục chỉ số buồng trứng và chỉ số tử cung giữa các lô khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

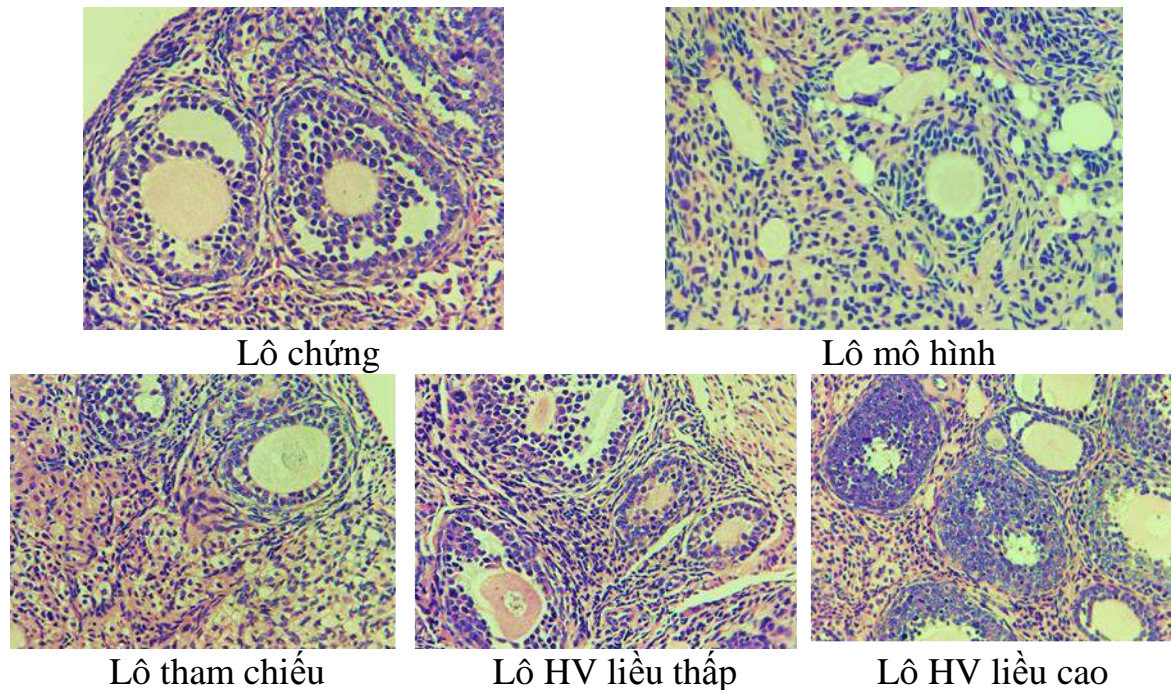


**3.3.5. Kết quả đánh giá mô bệnh học buồng trứng và tử cung nhuộm HE trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV.**

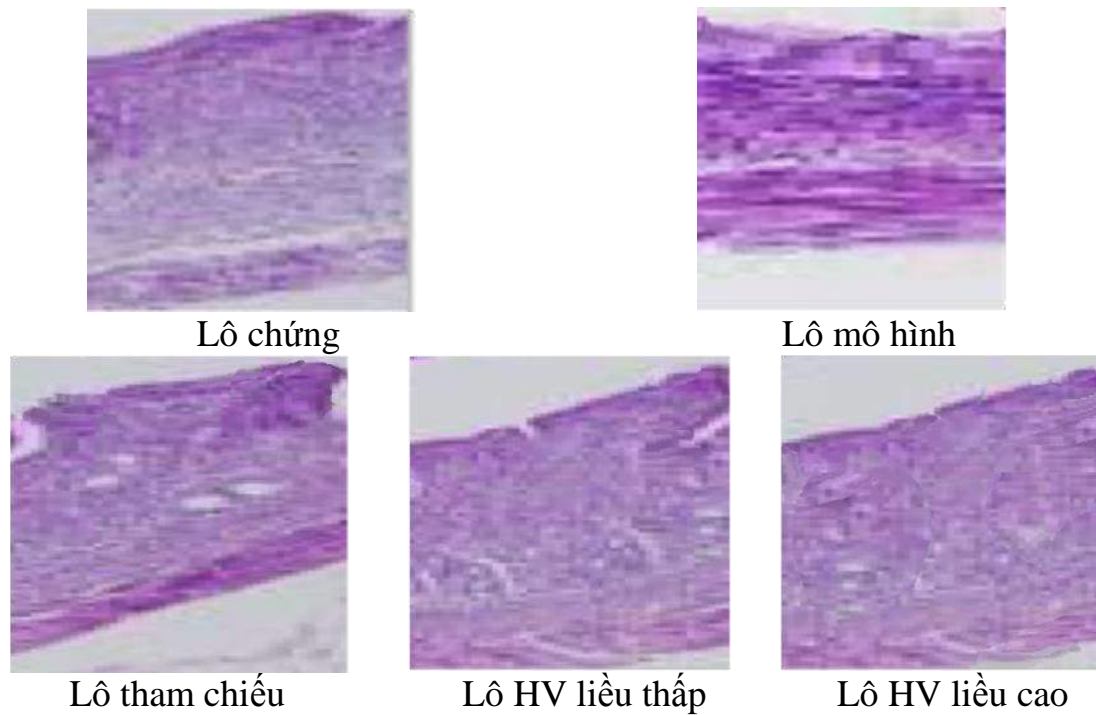
Mô bệnh học buồng trứng và tử cung chuột được làm tiêu bản nhuộm HE. Kết quả đánh giá như sau:

- Mô bệnh học buồng trứng của chuột ở lô mô hình có sự biến đổi rõ rệt với việc giảm các nang trứng phát triển và giảm các hoàng thể, so với chuột ở lô chứng. Ở lô 4 và lô 5 là các lô có dùng cao lỏng "HV", cũng như lô dùng thuốc tham chiếu (17 - beta estradiol + micronized progesteron), số lượng các nang trứng phát triển và các hoàng thể cao hơn so với lô mô hình, tuy nhiên vẫn còn giảm hơn so với lô chứng.

- Mô bệnh học tử cung của chuột ở lô mô hình cho thấy có biểu hiện nội mạc tử cung mỏng hơn và giảm các tuyến khi so sánh với lô chứng. Ở lô 4 và lô 5 là các lô có dùng cao lỏng "HV", cũng như lô dùng thuốc tham chiếu (17 - beta estradiol + micronized progesteron), các biểu hiện trên giảm rõ so với lô mô hình, tuy nhiên chưa hồi phục được về mức tương đương so với lô chứng.

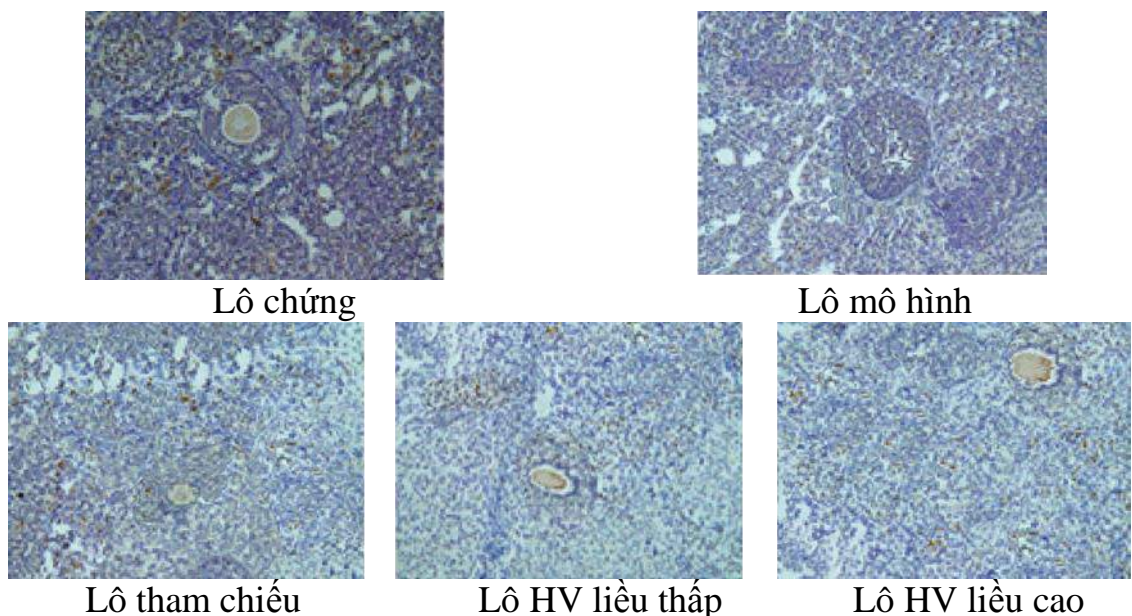


**Hình 3.7. Hình ảnh vi thể buồng trứng chuột nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV (HE, X200)**



**Hình 3.8. Hình ảnh vi thể tử cung chuột nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV (HE,X200)**

**3.3.6. Kết quả đánh giá mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột trong nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV.**



**Hình 3.9. Hình ảnh vi thể buồng trứng chuột nghiên cứu hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng HV, nhuộm hóa mô miễn dịch Anti-NOTCH-1 dương tính mạnh (x 200)**

Mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột đánh giá biểu hiện của protein Notch1, là protein thuộc con đường tín hiệu Notch1 có vai trò quan trọng trong phát triển và cân bằng nội mô bằng cách điều hòa sự tăng sinh, biệt hóa và tự chết (apoptosis) của các tế bào.

Kết quả đánh giá mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột cho thấy:

- Ở lô mô hình, biểu hiện của protein Notch1 giảm rõ rệt so với ở lô chứng.
- Ở lô 4 và lô 5 là các lô có dùng cao lỏng "HV", cũng như lô dùng thuốc tham chiếu (17 - beta estradiol + micronized progesteron), biểu hiện của protein Notch1 thể hiện rõ rệt hơn so với lô mô hình, tuy nhiên vẫn còn giảm hơn so với lô chứng.
- Biểu hiện của protein Notch1 trên tiêu bản mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột ở các lô 4 và lô 5 là các lô có dùng cao lỏng "HV" không có sự khác biệt đáng kể, cũng như không có sự khác biệt khi so với ở lô dùng thuốc tham chiếu (17 - beta estradiol + micronized progesteron).

## Chương 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. Bàn luận luận về mô hình gây SGCNBT

##### 4.1.1. Bàn luận mô hình gây suy giảm chức năng buồng trứng bằng phương pháp tiêm TG dưới da

Suy giảm chức năng buồng trứng (Premature Ovarian Insufficiency- POI) là một hội chứng lâm sàng được định nghĩa bởi sự giảm hoặc ngừng hoạt động chức năng của buồng trứng ở những phụ nữ trước tuổi 40. Suy giảm chức năng buồng trứng được đặc trưng bởi sự rối loạn kinh nguyệt mất kinh hoặc thưa kinh, biểu hiện bởi sự tăng hormon điều hòa sinh dục của tuyến yên Follicle stimulating hormone (FSH) và giảm Estrogen máu.

Hậu quả bệnh suy giảm chức năng buồng trứng gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe, tâm lý và khả năng sinh đẻ, cũng làm nguyên nhân gây tỉ lệ vô sinh ngày càng cao, làm tăng tỷ lệ tử vong theo tuổi tác. Suy giảm chức năng buồng trứng là một bệnh lý phức tạp, đa nguyên nhân và thường khó xác định được nguyên nhân gây bệnh, có tới 90% các ca suy giảm chức năng buồng trứng không xác định được nguyên nhân. Chính vì thế nhóm nghiên cứu muốn gây mô hình SGCNBT trên chuột nhất để giúp các nhà khoa học nghiên cứu sâu hơn về bệnh lý giúp cho quá trình điều trị đạt hiệu quả cao hơn.

Triptetgium glycoside (TG) là hoạt chất được chiết xuất từ cây Lôi công đằng có tác dụng chống viêm, giảm đau, ức chế miễn dịch, được sử dụng để điều trị bệnh tự miễn dịch, các bệnh viêm như thấp khớp, viêm khớp. Trong những năm gần đây với nhiều nghiên cứu cho thấy TG có tác dụng chống ung thư tuyến tụy, gây sự chú ý trong và ngoài nước [67] [68]. Qin Wanzhang và cộng sự đã báo cáo rằng việc sử dụng triptolide trong thời gian dài ở phụ nữ trong độ tuổi sinh đẻ có thể gây ra rối loạn kinh nguyệt, giảm lưu lượng kinh nguyệt và thậm chí là vô kinh [69]. Triptetgium glycoside ảnh hưởng đến hệ thống sinh sản nữ sinh chủ yếu biểu hiện là rối loạn kinh nguyệt, kéo dài kỳ kinh, bế kinh, vô sinh... Do đó, triptetgium glycoside có thể được sử dụng để chuẩn bị mô hình suy buồng trứng sớm.

Gây mô hình chuột SGCNBT bằng thuốc TG được nghiên cứu và thực hiện tại nhiều nước trên thế giới bằng các phương pháp uống, tiêm dưới da hoặc tiêm màng bụng [72]. Trong nghiên cứu bước đầu này, do lần đầu tiên gây mô hình SGCNBT được thực hiện tại Việt Nam, nên để dễ dàng thực hiện cũng như xây dựng được quy trình đánh giá chu kỳ động dục, lấy mẫu và làm phiên đồ âm đạo chuột, ...nhóm tác giả đã sử dụng TG đường uống, liều 100mg/kg/ngày là liều gấp đôi liều của các tác giả khác. Vì vậy, để chuẩn hóa mô hình gây SGCNBT, nghiên cứu cần được thực hiện trên mô hình sử dụng TG bằng tiêm dưới da hoặc tiêm màng bụng với liều TG 50mg/kg/ngày như các nghiên cứu đã được công bố trên thế giới (Bin li) [80].

Kết quả nghiên cứu cho thấy sau khi tiêm dưới da TG 50mg/kg/ngày (0,1 ml/10g) trong 35 ngày liên tục (tương đương với 7 chu kỳ kinh của chuột), chuột ở lô mô hình tất cả các chuột đều xù lông, mệt mỏi, rối loạn chu kỳ động dục, nồng độ FSH huyết thanh tăng cao, nồng độ E2 huyết thanh giảm rõ ( $P < 0,01$ ), làm teo nhỏ tử cung, buồng trứng, thể hiện qua chỉ số tử cung và chỉ số buồng trứng giảm so lô chứng ( $p < 0,01$ ), làm biến đổi rõ rệt mô bệnh học buồng trứng (giảm các nang trứng phát triển và giảm các hoàng thể), và mô bệnh học tử cung (nội mạc tử cung mỏng hơn và giảm các tuyến), làm giảm rõ rệt biểu hiện của protein Notch1 so với ở lô chứng. Kết quả tương đồng với nghiên cứu của của Bin li và cộng sự (2014) [72], gây mô hình suy giảm chức năng buồng trứng bằng TG dạng tiêm gây rối loạn chu kỳ động dục, nồng độ FSH huyết thanh tăng cao, nồng độ E2 huyết thanh giảm rõ ( $P < 0,01$ ), làm teo nhỏ tử cung, buồng trứng, thể hiện qua chỉ số tử cung và chỉ số buồng trứng giảm, làm biến đổi rõ rệt mô bệnh học buồng trứng (giảm các nang trứng phát triển và giảm các hoàng thể), và mô bệnh học tử cung (nội mạc tử cung mỏng hơn và giảm các tuyến).

Kết quả nghiên cứu tương đồng với nghiên cứu của Vũ Thanh Tuyên [7] tuy nhiên kết quả gây dựng mô hình suy giảm chức năng buồng trứng bằng TG dạng tiêm có tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường của chuột lô mô hình là  $95,42 \pm 10,77 \%$  cao hơn so với mô hình gây suy giảm chức năng buồng trứng bằng TG đường uống theo nghiên cứu của Vũ Thanh Tuyên là  $85,42 \pm 20,77 \%$ , cho thấy trị trung bình tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường của chuột và giao động số liệu cao hơn đường tiêm. Như vậy con



đường uống tùy khả năng hấp thụ của chuột mà làm cho mô hình chuột suy giảm chức năng buồng trứng nhiều hơn và có chuột suy giảm chức năng buồng trứng ít hơn, sự không đồng đều này có thể ảnh hưởng đến sai số của nghiên cứu, còn đường tiêm gây suy giảm chức năng buồng trứng tốt hơn, sai số ít hơn và gây suy mức độ đồng đều hơn. Trên mô hình dạng tiêm nồng độ FSH tăng nhiều hơn và E2 giảm nhiều hơn so với mô hình dạng uống cho thấy mức độ ảnh hưởng đến hormone của mô hình tiêm cao hơn. Như vậy cho thấy trên mô hình dạng tiêm TG gây suy giảm chức năng buồng trứng đường tiêm TG vào trong máu là lượng cố định, còn đường uống TG do ảnh hưởng sự hấp thụ qua đường uống nên không có sự đồng đều. Ngoài ra trên mô hình dạng tiêm TG gây suy giảm chức năng buồng trứng có thêm bước tiến mới đánh giá trên mô bệnh học nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột đánh giá biểu hiện của protein Notch1, là protein thuộc con đường tín hiệu Notch1 có vai trò quan trọng trong phát triển và cân bằng nội mô bằng cách điều hòa sự tăng sinh, biệt hóa và tự chết (apoptosis) của các tế bào. Kết quả cho thấy ở lô mô hình có sự biến đổi rõ rệt với việc giảm rõ rệt biểu hiện của protein Notch1 so với ở lô chứng. Đây là bước tiến mới giúp cho quá trình đánh giá mức độ SGCNBT và đánh giá tác dụng của thuốc điều trị trên mô hình gây SGCNBT.

Nhóm nghiên cứu đã xây dựng thành công, đã tạo ra được mô hình gây suy giảm chức năng buồng trứng tốt hơn, mức độ suy tốt hơn và đồng đều hơn, đồng thời phát hiện ra cơ chế protein Notch1 trên hóa mô miễn dịch để thêm cơ chế đánh giá mức độ suy giảm buồng trứng của chuột. Chính vì thế phương pháp gây suy giảm chức năng buồng trứng bằng đường tiêm được nhiều tác giả trên thế giới khuyến dùng [72][80].

#### ***4.1.2. Đánh giá chu kỳ động dục của chuột bằng phương pháp quan sát trực quan và phiên đồ âm đạo.***

Biểu hiện nội tiết của động vật thí nghiệm được xác định bằng ước tính chu kỳ động dục, được đánh giá thông qua phương pháp quan sát trực quan cơ quan sinh dục của chuột kết hợp làm phiên đồ âm đạo.

Chu kỳ động dục bình thường của chuột là 4 - 5 ngày, nếu trên 5 ngày hoặc dưới 4 ngày là bất thường. Đánh giá chu kỳ động dục của chuột trong thời gian 21

ngày cuối của giai đoạn gây suy buồng trứng. Tỷ lệ bất thường của chu kỳ động dục và tần số động dục được phân tích.

Phương pháp quan sát trực quan cơ quan sinh dục của chuột, ban đầu khó đánh giá và mất thời gian. Quan sát trực quan bộ phận sinh dục dựa vào quan sát màu sắc, hình thái, độ đóng mở của lỗ âm đạo; lỗ âm đạo nhỏ và đóng, âm đạo không sưng là giai đoạn không động dục; lỗ âm đạo mở rộng, mô sưng, hồng, ẩm là giai đoạn trước động dục; lỗ âm đạo mở rộng, âm đạo ít hồng hơn, ít ẩm hơn và ít sưng hơn là giai đoạn động dục; lỗ âm đạo không mở rộng, âm đạo không sưng, có thể nhìn thấy mảnh tế bào trắng là giai đoạn hậu động dục. Theo Shannon L. Byers và cộng sự nếu một nghiên cứu viên được huấn luyện tốt quan sát 100 chuột cái có thể đánh giá được các giai đoạn động dục của chuột trong 10- 15 phút mà không cần thiết bị gì, là một phương pháp đơn giản, dễ học. Nhược điểm của phương pháp trực quan là có sự thiên lệch và có thể nhầm lẫn do sự quan sát sơ sài của nghiên cứu viên trong quan sát. Trong quan sát trực quan bằng mắt thường có thể xác định được các giai đoạn động dục và không động dục của chuột, nhưng các giai đoạn trước động dục và chuyển tiếp giữa các giai đoạn sẽ khó xác định bằng phương pháp này [82][83].

Phương pháp phết phiến đồ âm đạo dùng pipet pasteur nhựa 1ml bơm 1-2 giọt nước muối sinh lý vào âm đạo chuột, thực hiện động tác hút ra hút vào vài lần, hút nước muối sinh lý trong âm đạo chuột, cố định bằng cồn và nhuộm giem sa phết âm đạo, soi phết âm đạo dưới kính hiển vi VK100. Dựa vào quan sát sự có mặt của các tế bào bạch cầu, tế bào mô vảy sừng hóa và tế bào có nhân để xác định giai đoạn động dục của chuột.

- Giai đoạn không động dục hàm lượng oestrogen rất thấp, hàm lượng progesteron cao, tế bào biểu mô sừng hóa ít, niêm mạc tử cung mỏng, tế bào bạch cầu nhiều giúp ngăn chặn sự lây nhiễm của vi sinh vật do giảm glycogen. Lúc này trên phết phiến đồ âm đạo chủ yếu là sự có mặt của tế bào bạch cầu đa nhân và một ít tế bào biểu mô.

- Giai đoạn trước động dục bắt đầu tiết ra estrogen, nhưng trong xét nghiệm thì hàm lượng estrogen còn thấp, sự kích thích biểu mô âm đạo cũng ít hơn, do đó sự tăng sinh của các tế bào biểu mô âm đạo chậm, các tế bào biểu mô âm đạo thường

có hình bầu dục hoặc gần tròn điển hình bởi sự xuất hiện chủ yếu các tế bào có nhân và một vài tế bào biểu mô.

- Giai đoạn động dục hàm lượng estrogen trong máu đạt đỉnh điểm, estrogen có thể kích thích biểu mô âm đạo dày lên, tế bào phát triển nhanh chóng, trở nên lớn và phẳng, và các khối to, đa giác, có góc tù, các ô liên kết lỏng lẻo với nhau dễ rơi ra; dưới tác dụng của oestrogen, trong tế bào biểu mô nhiều glycogen xuất hiện; sau khi các tế bào rụng đi, glycogen ở trong âm đạo *Lactobacillus* phân hủy thành axit lactic, làm cho dịch âm đạo có tính axit. Và ức chế sự phát triển của vi sinh vật nên giai đoạn này chủ yếu là các tế bào biểu mô vảy sừng hóa.

- Giai đoạn hậu động dục là giai đoạn nghỉ ngơi trong chu kỳ động dục nên chủ yếu là các tế bào biểu mô vảy sừng hóa và một vài tế bào bạch cầu đa nhân.

Bốn giai đoạn của chu kỳ động dục chuột là một quá trình diễn ra liên tục và thay đổi giữa các tế bào theo chu kỳ. Có thể thấy sự thay đổi về cấu trúc, hình thái của tế bào trong niêm mạc âm đạo trong chu kỳ động dục chuột chủ yếu chịu tác động của sự thay đổi estrogen, do đó phương pháp phết phiến đồ âm đạo là phương pháp ưu việt trong quá trình đánh giá và phân biệt chính xác từng giai đoạn của chu kỳ động dục chuột [82][83]. Tuy nhiên phương pháp còn một số hạn chế như thời gian quy trình đọc phiến đồ âm đạo lâu, mất thời gian, cần các thiết bị chuyên dụng và đòi hỏi kỹ thuật chính xác, việc bơm rửa âm đạo chuột liên tục trong thời gian kéo dài cũng gây kích thích vùng âm đạo gây hiện tượng mang thai giả, gây stress trên chuột và kích ứng âm đạo gây viêm dẫn đến khi phết phiến đồ âm đạo có bạch cầu và tế bào khác dễ gây nhầm lẫn trong quan sát và xác định giai đoạn chu kỳ động dục [82][83].

Cho nên để đánh giá chu kỳ động dục của chuột một cách chính xác, khách quan cần kết hợp giữa 2 phương pháp quan sát trực quan bộ phận sinh dục của chuột và phương pháp phết phiến đồ âm đạo để giúp cho quá trình đánh giá và phân biệt chính xác giai đoạn của chu kỳ động dục chuột.

#### **4.2. Bàn luận về hiệu quả của bài thuốc HV trên tử cung, buồng trứng chuột bị gây suy giảm chức năng buồng trứng bằng TG tiêm dưới da**

Một phụ nữ được gọi là suy buồng trứng sớm khi tuổi nhỏ 40 và có bộ ba tiêu



chuẩn: thiếu kinh hoặc vô kinh trên 4 tháng, FSH tăng cao và E2 giảm. Như vậy triệu chứng lâm sàng nổi bật, dễ nhận biết và là triệu chứng để bệnh nhân đến khám bệnh là triệu chứng thiếu kinh, vô kinh. Điều này hoàn toàn tương đồng với YHCT. Trong y học cổ truyền không có bệnh danh suy giảm chức năng buồng trứng, bệnh danh thuộc phạm vi chứng thiếu kinh, bế kinh, vô sinh... Trong “Tổ vấn. Thượng cổ thiên chân luận”, “Phó thanh chủ nữ khoa” có viết: “nữ tử nhị thất, thiên quý đến, nhân mạch thông, mạch thái xung thịnh, sau thời kỳ kinh nguyệt, tắc có con.... thất thất nhân mạch hư, mạch thái xung hư, thiên quý suy, địa đạo bất năng, tắc hình hoài mà vô tử giả” [25]. Cho thấy quá trình sinh trưởng, phát dục đến khi hư lão của nữ giới là chức năng sinh lý là kinh nguyệt và sinh sản. Nguyên nhân gây bệnh rất phức tạp, đến nay nhà nghiên cứu và y gia cho rằng nguyên nhân gây bệnh SBCNBT chủ yếu là do thận. Trong “Tổ Vấn. Âm dương ứng tượng đại luận” có ghi: “thận khí thịnh, nguyệt kinh thủy, thận khí suy, nguyệt kinh kiệt.” [26] “Phó thanh chủ nữ khoa” viết: “Kinh thủy xuất chư thận, kinh bản dư thận” [25]. Hai tác phẩm đều chỉ ra rõ tác dụng quan trọng của thận trong việc sản sinh ra kinh nguyệt. Thận tàng tinh, chủ sinh dục, nữ tử 2x7, thận khí thực, thiên quý thịnh, kinh nguyệt đến, thận chỉ đạo và quyết định việc sản sinh kinh nguyệt. Nếu bẩm tố tiên thiên bất túc, hậu thiên sinh hoạt quá độ sinh sản quá nhiều lần hoặc mắc trọng bệnh, bệnh mạn tính, đều có thể dẫn đến thận suy mà ảnh hưởng đến xung nhâm, chủ yếu do thận tinh hư, thận khí bất cố, thận âm hư và thận dương hư. Nếu thận tinh hư, thiên quý kiệt sớm, không thể ra đúng thời gian, xung nhâm bất thịnh, huyết hải không đầy đủ, không có máu để ra, có thể dẫn đến bế kinh hoặc vô sinh. Nếu thận khí suy, mất đi chức trách tàng giữ, xung nhâm bất cố, tử cung tàng tiết bất thường, kinh nguyệt ra rất nhiều, lâu ngày hao tổn tinh huyết, có thể dẫn đến mãn kinh sớm, hoặc vô sinh, như trong “Thánh tề tổng luận” có viết: “người mà vô sinh, do xung nhâm bất túc, thận khí hư hàn.” Thận âm là cơ sở âm dịch của toàn cơ thể, nếu thận âm bất túc, tinh huyết sinh hóa thất thường, vật chất cơ bản thiếu hụt, âm dương chuyển hóa bất lợi, tinh noãn bài xuất thất thường, lâm sàng có thể xuất hiện kinh nguyệt sau kỳ, bế kinh, vô sinh. Tỳ mất kiện vận, thủy dịch vận hóa thất thường, lâu ngày

tích hóa đàm thành ẩm, trở trệ khí cơ, khí huyết vận hành không thông sảng, tử cung tàng tiết thất trách, dẫn đến kinh nguyệt lượng ít, thậm chí bế kinh [29],[30].

Lý luận trung y cho rằng can chủ sơ tiết, kỳ dung thuộc dương, vừa chủ tàng huyết, kỳ thể thuộc âm, có chức năng điều tiết thời kỳ kinh nguyệt và lượng kinh...vừa có tác dụng tàng huyết dịch, điều tiết lưu lượng huyết và phòng ngừa xuất huyết.

Diệp Thiên Thổ có viết: “nữ tử lấy can làm tiên”. Can là huyết hải, huyết hải khi đầy đủ, tàng huyết dịch trong cơ thể đầy đủ thì kinh nguyệt đến đúng thời kỳ, lượng kinh nguyệt đầy đủ. Can thận tinh huyết đồng nguồn, thận tàng tinh, can tàng huyết. Tinh huyết đồng nguồn mà hỗ sinh, là vật chất cơ bản của kinh nguyệt. Can chủ sơ tiết, can chủ đóng tàng, cùng điều tiết tử cung. Chức năng sơ tiết của can có sự trợ giúp của thận tinh, mà thận tinh chủ sinh sản dựa vào sinh hóa can huyết để bổ sinh tinh. Can là bản của mạch xung, điều tiết phân bố lượng huyết qua chức năng điều tiết huyết hải trên cơ thể. Lịch sử trung y nhấn mạnh nguyên nhân điều tiết tình trí trong bệnh lý phụ khoa. Cùng với góc độ Phụ nữ trong cuộc sống xã hội hiện đại, áp lực xã hội ngày càng gia tăng, tinh thần căng thẳng trong thời gian dài, u uất làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe, tâm sinh lý nữ sinh. Theo y học hiện đại vai trò hệ thống nội tiết do “trục dưới đồi - tuyến yên - buồng trứng” , mà hệ thống thần kinh với hệ thống sinh sản có mối quan hệ mật thiết với nhau. SGCNBT thường do tinh thần u uất trong thời gian dài hoặc tinh thần đột nhiên bị kích động đột ngột. Tình chí nội thương, cơ khí uất kết nghịch loạn, can khí mất sơ tiết, làm khí uất lâu ngày hóa hỏa, khí huyết không lưu thông, làm khí huyết hư, không thể vinh thận bổ tinh, tư dưỡng xung nhâm, hạ dưỡng bào cung bào mạch, huyết hải không hư, dẫn đến kinh huyết lúc có lúc không, hình thành suy giảm chức năng buồng trứng; Với tư duy can mất sơ tiết làm khắc tỳ, làm tỳ mất khả năng vận hóa, (mà tỳ có chức năng vận hóa thủy cốc sinh khí huyết) làm cho huyết kinh vô chủ, huyết hải hư không dẫn suy giảm chức năng buồng trứng ; Can với thận có mối quan hệ mẹ con, con bị tổn thương tác ích kỳ mẫu khí, không thể tự dưỡng, tổn thương mạch xung nhâm, huyết hải hư, kinh thủy khó sinh, dẫn đến suy giảm chức năng buồng trứng.

Bài thuốc nghiên cứu HV là bài thuốc "Dật kinh thang" gia thêm 3 vị thuốc Câu kỷ tử, Thỏ ty tử và Tỏa dương. Bài thuốc HV có tác dụng: Bổ thận, bổ khí kiện tỳ, tán uất. Nên nhóm nghiên cứu đã tiến hành đánh giá tác dụng điều trị bài thuốc HV trên mô hình suy giảm chức năng buồng trứng chuột nhất.

Trên cơ sở mô hình chuẩn gây suy giảm chức năng buồng trứng bằng Trippetgium glycoside (TG) tiêm dưới da đã đánh giá tác dụng bài thuốc HV liều 51.84g dược liệu/kg/ngày và liều 103.68g dược liệu/kg/ngày hai mức độ điều trị. Các kết quả về cơ bản tương đồng với kết quả nghiên cứu của tác giả Vũ Thanh Tuyền sau 20 ngày dùng thuốc HV với liều điều trị 51,84g dược liệu/kg/ngày và liều 103,68g dược liệu/kg/ngày làm phục hồi rối loạn hormon FSH và E2 huyết thanh của chuột, phục hồi khối tử cung, buồng trứng bị teo nhỏ do tiêm TG dưới da, làm phục hồi biến đổi mô bệnh học buồng trứng, tử cung [7]. Càng khẳng định hiệu quả điều trị của bài thuốc HV trong điều trị suy giảm chức năng buồng trứng. Trong nghiên cứu này nhóm nghiên cứu có bước đánh giá so sánh với thuốc tham chiếu 17 - beta estradiol 60  $\mu$ g/kg/day + micronized progesteron 24 mg/kg/ngày kết quả cho thấy tác dụng điều trị của bài thuốc HV là tương đương với lô thuốc tham chiếu. Những bằng chứng có giá trị càng khẳng định hiệu quả của bài thuốc HV trong điều trị suy giảm chức năng buồng trứng trên mô hình chuột nhất gây suy giảm chức năng buồng trứng bằng TG đường tiêm.

Kết quả nhóm nghiên cứu tương đồng với kết quả nghiên cứu của You fang và cộng sự nghiên cứu tác dụng của bài thuốc điều kinh trợ sản trên mô hình gây suy giảm chức năng buồng trứng của chuột. Kết quả sau điều trị lô thuốc tham chiếu và lô điều trị thuốc điều kinh trợ sản làm khôi phục chỉ số huyết thanh FSH, LH giảm so lô mô hình, chỉ số E2, AMH tăng cao hơn so lô chứng ( $p < 0,01$ ); chỉ số buồng trứng, tử cung lô tham chiếu và lô dùng thuốc điều kinh trợ sản tăng cao hơn so lô mô hình ( $p < 0,05$ ); lô tham chiếu và lô dùng thuốc điều kinh trợ sản mô bệnh học buồng trứng của chuột ở lô mô hình có sự biến đổi rõ rệt với việc giảm các nang trứng phát triển và giảm các hoàng thể, so với chuột ở lô chứng; lô thuốc tham chiếu và lô dùng thuốc điều kinh trợ sản mô bệnh học tử cung của chuột ở lô mô hình cho thấy có biểu hiện nội mạc tử cung mỏng hơn và giảm các tuyến khi so

sánh với lô chứng. Cho thấy phương điều kinh trợ sản với tác dụng bổ thận, sơ can giải uất có tác dụng bảo vệ, phục hồi buồng trứng, tử cung tuy nhiên chưa thể phục hồi lại như ban đầu, góp phần hỗ trợ điều trị vô sinh và IVF [84].

Kết quả nghiên cứu tương đồng với nghiên cứu của Li Cheng Ting (2014) và cộng sự đánh giá tác dụng bài thuốc bổ thận hoạt huyết trên mô hình thực nghiệm gây suy giảm chức năng buồng trứng bằng TG. Kết quả nghiên cứu sau thời gian dùng phương bổ thận hoạt huyết làm giảm thiểu tác nhân ảnh hưởng đến buồng trứng do TG, làm giảm chỉ số huyết thanh FSH, tăng chỉ số E2, phục hồi tế bào miễn dịch IL2, chỉ số buồng trứng phục hồi so lô mô hình, tăng cao hoạt động của tế bào TNF- $\alpha$  buồng trứng; Hiệu quả điều trị của bài thuốc bổ thận hoạt huyết với pháp bổ thận hoạt huyết ưu việt hơn phương lục vị địa hoàng thang với pháp bổ thận cải thiện chức năng buồng trứng, hạn chế tổn thương buồng trứng.

Kết quả các nghiên cứu mà hai tác giả trên cho thấy trên cùng mô hình gây giảm chức năng buồng trứng bằng TG cho thấy hiệu quả như nhau, kết quả tương đồng, có những bằng chứng chung về khoa học trên thế giới đã có nghiên cứu và đánh giá hiệu quả điều trị và hiệu quả trong phục hồi buồng trứng. Về mặt cấu trúc bài thuốc tác giả nghiên cứu có một số thành phần giống nhau và một số thành phần khác nhau, cho thấy tính năng điều trị tương đồng với bài thuốc HV mà nhóm nghiên cứu sử dụng. Càng khẳng định định hướng nhóm nghiên cứu là đúng [85].

Bài thuốc HV với tác dụng Bổ thận, bổ ích kiện tỳ, tán uất với các thành phần vị thuốc: Thục địa 35g, Hoài sơn 20g, Bạch truật 25g, Bạch thược 15g, Mẫu đơn bì 08g, Nhân sâm 07g, Sài hồ 08g, Táo nhân 08g, Đương quy 20g, Sa sâm 15g, Đỗ trọng 08g, Câu Kỷ tử 20g, Thỏ ty tử 15g và Tỏa dương 12g. Trong đó Thục địa làm quân dược có tác dụng bổ thận, ích tinh, tác dụng dược lý: Cường tim, lợi niệu, giảm glucose máu, tăng bạch cầu, tăng cường miễn dịch. Có nhiều nghiên cứu đã cho thấy thục địa có tác dụng làm hạ chỉ số huyết thanh E2 và giảm quá trình suy buồng trứng [39]; nhân sâm, đương quy làm thần dược có tác dụng kiện tỳ dưỡng huyết, bổ huyết ; bạch truật, hoài sơn, sa sâm làm tá dược hỗ trợ tăng tác dụng cho kiện tỳ, đỗ trọng, kỳ tử làm tá dược hỗ trợ bổ thận, kỳ tử có Tác dụng dược lý: có tác dụng điều tiết dưới đồi - tuyến yên - buồng trứng làm giảm triệu chứng suy giảm

chức năng buồng trứng [50]; toan táo nhân, sài hồ, bạch thược, mẫu đơn bì làm sứ được giải khí uất trong tâm can vừa tán uất trong huyết phân, sa sâm bổ ích phế khí, dưỡng âm phế vị. Kết hợp thổ ty tử, tảo dương làm tăng tác dụng bổ thận ích tinh. Bài thuốc với sự kết hợp 14 vị thuốc có tác dụng bổ thận, bổ khí kiện tỳ, tán uất. có nhiều nghiên cứu cho thấy cho chuột uống nước sắc của Thổ ty tử ngày 2 lần trong 5 ngày làm tăng trọng lượng của tuyến yên, buồng trứng và tử cung chuột, nhưng LH không theo dõi rõ rệt, FSH không thay đổi, ngoài ra nó còn có tác dụng tăng tạo máu, đề phòng thiếu máu cơ tim và điều hòa hoạt động trục dưới đồi- tuyến yên- buồng trứng [51]. Bài thuốc "Dật kinh thang" là bài thuốc được trích trong quyển "Biện chứng kỳ văn" có tác dụng đại bổ thận, bổ khí kiện tỳ, tán uất 3 kinh tâm, can, tỳ đã được sử dụng từ rất lâu đời để sử dụng điều trị chứng rối loạn kinh nguyệt, đặc biệt là chứng bế kinh [5]. Trong "Phó thanh chủ nữ khoa" của các y gia phụ khoa hậu thế có bài điều trị "mất kinh sớm" dùng phương thuốc ích kinh thang để điều trị [25]. Trên nghiên cứu ứng dụng lâm sàng năm 2010 Thoát Trường Vũ và Kim Lê Quân dùng "Dật kinh thang" gia vị điều trị chứng thiếu kinh trên 25 bệnh nhân từ năm 2005 đến 2007 cho thấy đạt hiệu quả tốt trên 18 bệnh nhân sau 1 đợt điều trị, đạt hiệu quả tốt trên 5 bệnh nhân sau 2 đợt điều trị và đạt hiệu quả khá trên 2 bệnh nhân. Năm 2011 Đông Nhan Thóa và Trần Hội Thắng cũng nghiêm cứu "Dật kinh thang điều trị bế kinh" trên 7 bệnh nhân có thời gian bế kinh lâu nhất là 20 tháng, ngắn nhất là 7 tháng, trong đó có 5 bệnh nhân điều trị y học hiện đại không có kết quả, kết quả nghiên cứu sau 10 ngày uống thuốc các triệu chứng của bệnh nhân cải thiện, sau 2 tháng bệnh nhân đã có kinh nguyệt trở lại.

Bài thuốc HV có tác dụng bổ thận, bổ khí kiện tỳ, tán uất với phương pháp điều trị bắt buộc phải tán uất tâm can tỳ, hơn nữa phải đại bổ thận thủy và đại bổ khí của tâm can tỳ, thì tinh đầy đủ mà kinh thủy tự thông. Bài thuốc dùng điều trị 4 kinh tâm can tỳ thận. Diệu ở bổ mà thông, tán mà khai; thường chỉ bổ thì gây uất bất khai mà sinh hỏa, chỉ tán thì khí suy mà hao tinh, nếu chủ dùng pháp công kiên, thuốc cay nóng mà không hành, không bổ mà gây tổn hại. Chính vì sự diệu trong pháp điều trị của bài thuốc HV liều 51,84g được liệu/kg/ngày và liều 103,68g được liệu/ kg/ ngày, uống trong 20 ngày, đã thể hiện hiệu quả điều trị trên chuột nhất cái

suy buồng trứng do tiêm TG: Làm giảm rõ các biểu hiện rối loạn chu kỳ động dục ở chuột suy buồng trứng: tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường giảm so với lô mô hình ( $p < 0,01$ ), tần số chu kỳ động dục tăng so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ), hồi phục về mức tương đương so với lô chứng sinh lý ( $p > 0,05$ ). Làm giảm nồng độ FSH, tăng nồng độ E2 huyết thanh chuột so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ). Làm hồi phục khối lượng tử cung và buồng trứng bị teo nhỏ do TG, thể hiện qua chỉ số tử cung và chỉ số buồng trứng tăng ( $p < 0,05$ ) so với lô mô hình. Làm hồi phục sự biến đổi mô bệnh học buồng trứng, và mô bệnh học tử cung so với lô mô hình. Làm tăng rõ rệt biểu hiện của protein Notch1 trên tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột so với ở lô mô hình, tuy nhiên vẫn còn giảm hơn so với lô chứng. Hiệu quả điều trị của 2 liều như nhau không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

#### **4.3. Bàn luận về tác dụng bảo vệ của bài thuốc HV trên mô hình chuột gây suy buồng trứng bằng TG tiêm dưới da**

**So sánh kết quả nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ của bài thuốc HV và hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của bài thuốc HV trên mô hình chuột gây suy buồng trứng bằng TG tiêm dưới da.**

Theo kết quả đánh giá chu kỳ động dục của chuột sau khi dùng thuốc HV liên tục 20 ngày tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường của chuột trên mô hình đánh giá tác dụng bảo vệ lô dùng thuốc liều 1 giảm so lô mô hình là 42% và lô liều 2 giảm so lô mô hình là 54 % và mô hình đánh giá tác dụng điều trị sau khi dùng thuốc 20 ngày lô trị 1 là  $61,75 \pm 9,96$  % giảm so lô mô hình là 29% và lô trị 2 là  $56,89 \pm 10,12$  % giảm hơn so lô mô hình là 34 %; cho trên mô hình bảo vệ làm giảm chu kỳ động dục bất thường của chuột cao hơn so mô hình điều trị giảm ở 2 liều từ 42- 54%.

Tần số chu kỳ động dục của chuột ở mô hình bảo vệ và điều trị ở các lô dùng thuốc làm phục về tương đương với lô chứng ( $p > 0,05$ ) tuy nhiên trên mô hình bảo vệ trị 1 phục hồi 91% so lô chứng và trị 2 phục hồi về 100% so lô chứng, và mô hình điều trị 1 phục hồi 84% so lô chứng và trị 2 phục hồi 86% so lô chứng cho thấy hiệu quả bảo vệ của bài thuốc HV cao hơn so với mô hình bảo vệ.

Chuột ở các lô dùng thuốc (lô 3, lô 4) ở hai mô hình có nồng độ FSH giảm, nồng độ E2 tăng so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Tuy nhiên ở mô hình bảo vệ chỉ số FSH lô trị 1 giảm so lô mô hình là 21,98%, lô trị 2 giảm so lô mô hình là

23,8%, giảm nhiều hơn so mô hình điều trị lô trị 1 17%, lô trị 2 giảm 17,9 % so lô mô hình. Trên mô hình bảo vệ lô trị 2 giảm nồng độ FSH và tăng E2 về mức tương đương so với lô chứng ( $p > 0,05$ ). Như vậy thuốc “HV” cho chuột uống có tác dụng làm hồi phục sự rối loạn hormon FSH và E2 ở các chuột gây suy buồng trứng bằng TG và lô trị 2 liều 103,68g được liệu/ kg/ ngày phục hồi về tương đương với lô chứng.

Các chuột ở lô dùng thuốc của 2 mô hình chỉ số buồng trứng và chỉ số tử cung tăng so với lô mô hình với  $p < 0,05$ . Như vậy cao lỏng “HV” cho chuột uống đã làm hồi phục khối lượng tử cung và buồng trứng bị teo nhỏ do TG.

Nhưng sự hồi phục ở mô hình bảo vệ cao hơn với lô trị 2 chỉ số buồng trứng phục hồi tương đương với lô chứng ( $p > 0,05$ ) và chỉ số tử cung ở 2 lô dùng thuốc phục hồi tương đương so với lô chứng ( $p_{4,31} > 0,05$ ) trong khi sự phục hồi chỉ số buồng trứng và chỉ số tử cung của mô hình điều trị chưa trở về mức tương đương so với lô chứng ( $p_{4,5-1} < 0,05$ ).

Kết quả nghiên cứu cho thấy bài thuốc HV với liều 51.84g được liệu/kg/ngày, liều 103.68g được liệu/kg/ngày có tác hiệu quả trong điều trị và bảo vệ trên mô hình gây suy buồng trứng bằng tiêm TG dưới da làm phục hồi rối loạn hormon FSH và E2 huyết thanh của chuột, phục hồi khối tử cung, buồng trứng bị teo nhỏ do tiêm TG dưới da, làm phục hồi biến đổi mô bệnh học buồng trứng, tử cung, làm tăng rõ rệt biểu hiện của protein Notch 1. Sự phục hồi trên mô hình bảo vệ tăng hơn so mô hình điều trị, trên lô dùng liều 103.68g được liệu/kg/ngày làm phục hồi rối loạn hormon FSH và E2 huyết thanh của chuột, phục hồi khối tử cung, buồng trứng bị teo nhỏ do tiêm TG dưới da, làm phục hồi biến đổi mô bệnh học buồng trứng, tử cung, làm tăng rõ rệt biểu hiện của protein Notch 1 tương đương với lô chứng với  $p > 0,05$  và tương đồng với lô dùng liều 51.84g được liệu/kg/ngày ( $p > 0,05$ ). Với sự tác động liên tục của TG bằng đường tiêm trong 35 ngày (tương ứng với 7 chu kỳ sinh sản của chuột) là tác nhân ảnh hưởng rất mạnh gây suy buồng trứng mà nhóm nghiên cứu dùng bài thuốc HV liều 51.84g được liệu/kg/ngày cho thấy kết quả bảo vệ và làm phục hồi rối loạn hormon FSH và E2 huyết thanh của chuột, phục hồi khối tử cung, buồng trứng bị teo nhỏ do tiêm TG dưới da, làm phục hồi biến đổi mô bệnh học buồng trứng, tử cung, làm tăng rõ rệt biểu hiện của protein Notch 1. Cho

thấy với những tác nhân gây suy giảm chức năng buồng trứng kém hơn thì bài thuốc HV với liều 51.84g dược liệu/kg/ngày có thể phục hồi chức năng buồng trứng về như bình thường.

Cho nên nhóm nghiên cứu khuyến nghị nên dùng bài thuốc HV sớm để phòng ngừa các tác nhân gây suy giảm chức năng buồng trứng sớm với liều 51.84g dược liệu/kg/ngày, với nhưng tác nhân gây suy giảm buồng trứng mạnh hơn thì nên dùng với liều 103.68g dược liệu/kg/ngày để tăng hiệu quả bảo vệ và phục hồi chức năng sinh lý của buồng trứng. Nhưng tính an toàn và sự tác động với Gen của bài thuốc HV còn chưa có nghiên cứu sâu. Nên cần thêm các nghiên cứu sâu hơn nữa đánh giá sự tác động, ảnh hưởng và tính an toàn của bài thuốc HV cũng như các nghiên cứu đánh giá tác dụng, hiệu quả điều trị và bảo vệ trên lâm sàng.

Kết quả nghiên cứu tương đồng với kết quả nghiên cứu của Xu Wen jun và cộng sự dùng phương bổ thận điều xung bảo vệ TG gây SBCNBT trên chuột, kết quả nghiên cứu cho thấy bài thuốc bổ thận điều xung có hiệu quả ưu việt trong bảo vệ SGCNBT, làm giảm tổn thương buồng trứng, tỉ lệ bất thường chu kỳ động dục các lô dùng thuốc bảo vệ giảm hơn so lô chứng với  $p < 0,05$ , chỉ số huyết thanh E2 ở các lô dùng thuốc tăng hơn so lô chứng với  $p < 0,01$ , FSH, LH giảm so với lô chứng với  $p < 0,05$  [86].

Tương đồng với nghiên cứu đánh giá tác dụng của bài thuốc bổ thận hoạt huyết trên chuột gây SGCNBT bằng TG đường uống của tác giả Li Cheng Ting và cộng sự; với 6 lô mỗi lô 8 chuột, kết quả cho thấy trên mô hình bảo vệ lô dùng thuốc bổ thận hoạt huyết liều thấp, trung bình, cao và lô dung thuốc lục vị địa hoàng thang cải thiện chỉ số buồng trứng, tử cung; làm giảm chỉ số huyết thanh FSH so với lô mô hình với  $p < 0,001$ ; lô dùng thuốc bổ thận hoạt huyết liều trung bình, liều cao và lô dùng lục vị địa hoàng thang làm tăng chỉ số E2 so với lô chứng với  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ; lô dùng thuốc bổ thận hoạt huyết liều trung bình và cao làm tăng các nang trứng và hoàng thể, nội mạc tử cung dày hơn so lô chứng với  $p < 0,05$ . Cho thấy phương thuốc bổ thận hoạt huyết và phương lục vị địa hoàng thang (bổ thận pháp) cải thiện chức năng buồng trứng, hạn chế tổn thương buồng trứng tử cung [85].



## KẾT LUẬN

### **1. Về tác dụng bảo vệ của cao lỏng bài thuốc HV trên chuột nhắt trắng suy giảm chức năng buồng trứng do tiêm TG.**

Bài thuốc HV liều 51,84g dược liệu/kg/ngày và liều 103,68g dược liệu/kg/ngày, uống trong 35 ngày, đã thể hiện hiệu quả bảo vệ trên chuột nhắt cái suy buồng trứng do tiêm TG:

- Làm giảm biểu hiện xù lông, mệt mỏi ở các chuột so với ở lô mô hình.

- Làm giảm rõ các biểu hiện rối loạn chu kỳ động dục ở chuột suy buồng trứng: tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường giảm so với lô mô hình ( $p < 0,01$ ), tuy nhiên chưa hồi phục về tương đương với lô chứng ( $p < 0,01$ ); tần số chu kỳ động dục tăng so với lô mô hình ( $p < 0,01$ ), hồi phục về mức tương đương so với lô chứng sinh lý ( $p > 0,05$ ).

- Làm giảm rõ sự rối loạn hormon FSH và E2 huyết thanh ở các chuột gây suy buồng trứng: làm giảm nồng độ FSH, tăng nồng độ E2 huyết thanh chuột so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ). Tuy nhiên sự hồi phục ở lô uống liều 51,84g dược liệu/kg/ngày chưa trở về mức tương đương so với lô chứng ( $p < 0,05$ ), sự phục hồi ở lô liều 103,68g dược liệu/kg/ngày trở về mức tương đương so với lô chứng ( $p > 0,05$ ).

- Làm giảm rõ biểu hiện tổn thương tử cung và buồng trứng do TG, thể hiện qua chỉ số tử cung và chỉ số buồng trứng tăng ( $p < 0,01$ ) so với lô mô hình, sự phục hồi trở về mức tương đương so với lô chứng ( $p > 0,05$ ); giảm tổn thương mô bệnh học buồng trứng (tăng các nang trứng phát triển và các hoàng thể) và tử cung (nội mạc tử cung dày hơn và tăng các tuyến) trên tiêu bản nhuộm HE, làm tăng biểu hiện của protein Notch1 (có vai trò quan trọng trong phát triển và cân bằng nội mô bằng cách điều hòa sự tăng sinh, biệt hóa và tự chết của các tế bào) trên tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng.

### **2. Kết luận về hiệu quả phục hồi chức năng buồng trứng của cao lỏng bài thuốc HV trên mô hình gây suy buồng trứng ở chuột nhắt cái do tiêm TG.**

Bài thuốc HV liều 51,84g dược liệu/ kg/ ngày và liều 103,68g dược liệu/ kg/ ngày, uống trong 20 ngày, đã thể hiện hiệu quả điều trị trên chuột nhắt cái suy buồng trứng do tiêm TG:

- Làm giảm biểu hiện xù lông, mệt mỏi ở các chuột so với ở lô mô hình.
- Làm giảm rõ các biểu hiện rối loạn chu kỳ động dục ở chuột suy buồng trứng: tỷ lệ chu kỳ động dục bất thường giảm so với lô mô hình ( $p < 0,01$ ), tuy nhiên chưa hồi phục về tương đương với lô chứng ( $p < 0,01$ ); tần số chu kỳ động dục tăng so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ), hồi phục về mức tương đương so với lô chứng sinh lý ( $p > 0,05$ ).
- Làm hồi phục sự rối loạn hormon FSH và E2 huyết thanh ở các chuột gây suy buồng trứng: làm giảm nồng độ FSH, tăng nồng độ E2 huyết thanh chuột so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ). Tuy nhiên sự hồi phục chưa trở về mức tương đương so với lô chứng ( $p < 0,05$ ).
- Làm hồi phục khối lượng tử cung và buồng trứng bị teo nhỏ do TG, thể hiện qua chỉ số tử cung và chỉ số buồng trứng tăng ( $p < 0,05$ ) so với lô mô hình. Tuy nhiên sự hồi phục chưa trở về mức tương đương so với lô chứng ( $p < 0,05$ ).
- Làm hồi phục sự biến đổi mô bệnh học buồng trứng (tăng các nang trứng phát triển và các hoàng thể), và mô bệnh học tử cung (nội mạc tử cung dày hơn và tăng các tuyến) so với lô mô hình. Tuy nhiên sự hồi phục chưa trở về mức tương đương so với lô chứng.
- Làm tăng rõ rệt biểu hiện của protein Notch1 (là protein thuộc con đường tín hiệu Notch1 có vai trò quan trọng trong phát triển và cân bằng nội mô bằng cách điều hòa sự tăng sinh, biệt hóa và tự chết (apoptosis) của các tế bào) trên tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch của buồng trứng chuột so với ở lô mô hình, tuy nhiên vẫn còn giảm hơn so với lô chứng.

Các tác dụng này cao lỏng HV tương đương so với thuốc tham chiếu 17 - beta estradiol 60  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  + micronized progesteron 24  $\text{mg}/\text{kg}/\text{ngày}$ .

**KHUYẾN NGHỊ**

Kết quả nghiên cứu cho thấy cao lỏng bài thuốc HV thể hiện rõ tác dụng bảo vệ và điều trị suy buồng trứng trên mô hình thực nghiệm. Nghiên cứu trước đó cũng cho thấy cao lỏng bài thuốc HV an toàn trong đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn. Từ các kết quả có được, chúng tôi xin kiến nghị:

- Đánh giá sâu thêm về tính an toàn trên sinh sản và trên nhiễm sắc thể của bài thuốc.
- Đánh giá tính an toàn và hiệu quả của bài thuốc trên lâm sàng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. L. Webber *et al.*, “ESHRE Guideline: Management of women with premature ovarian insufficiency,” *Hum. Reprod.*, vol. 31, no. 5, pp. 926–937, 2016.  
doi: 10.1093/humrep/dew027.
2. Z. Li-, “Effects of ‘ Bushen Huoxue Prescription ’ on hormone levels and granulosa cells apoptosis regulated in premature ovarian Failure rat models na ZHENG Jin LIU Te ZHAO Wei Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine S p,” pp. 2–6, 2015.
3. D. Y. Guo *et al.*, “Experimental study on protective effect and mechanism of Shengdihuang Decoction on ovary of rats with premature ovarian failure,” *China J. Chinese Mater. Medica*, vol. 44, no. 21, pp. 4698–4703, 2019.  
doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20190827.403.
4. L. U. Yan and J. Han, “Clinical research of bushen tiaojing cream formula in the treatment of premature o-,” vol. 14, no. 3, pp. 1–5, 2019.
5. Biện chứng kỳ văn (1858), Nhà xuất bản Đồng Nai, tr.577-579.
6. V. T. Tuyen, D. M. Thuy, N. H. Ngan, T. T. Son, and D. X. Canh, “The Effectiveness of Hoi kinh HV on Mice Induced Premature Ovarian Insufficiency,” *Res. Gate*, no. November, 2019.
7. Vũ Thanh Tuyền (2019). Đánh giá tác dụng của bài thuốc HV trên chức năng sinh sản của chuột nhắt cái, Luận văn thạc sỹ Y học, Học viện Y- Dược học cổ truyền Việt Nam.
8. Đại học Y Hà Nội (2013). *Bài Giảng Sản Phụ Khoa tập 1*. Nhà xuất bản y học, tr.118-225
9. R. Islam and R. Cartwright, “The impact of premature ovarian failure on quality of life: Results from the UK 1958 Birth Cohort,” *Hum. Reprod.*, 2011.
10. K. Maclaran and N. Panay, “Current concepts in premature ovarian insufficiency,” *Women’s Health*. pp. 54–65, 2015.  
doi: 10.2217/whe.14.82.

11. J. L. Luborsky, P. Meyer, M. F. Sowers, E. B. Gold, and N. Santoro, "Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition," *Hum. Reprod.*, 2003.  
doi: 10.1093/humrep/deg005.
12. L. Cox and J. H. Liu, "Primary ovarian insufficiency: An update," *International Journal of Women's Health*. 2014.  
doi: 10.2147/IJWH.S37636.
13. N. T. N. Trang, "Điều trị suy sớm buồng trứng: mối nguy hại nếu không điều trị đúng là đủ," *Bệnh viện Từ Dũ Hosrem.org.vn*, 2016.
14. N. Lawrence, "Clinical manifestations and evaluation of spontaneous primary ovarian insufficiency. Ipremature ovarian failure," *up to Date online*, 2014.
15. R. C, D. S, and S. S, "Hormone replacement therapy and the risk of venous thromboembolism: a population-based study," *J Thromb Haemost*, vol. 8, no. 5, pp. 979–986, 2010.  
doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.03839.x.
16. M. Canonico *et al.*, "Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women: Impact of the route of estrogen administration and progestogens: The ESTHER study," *Circulation*, vol. 115, no. 7, pp. 840–845, 2007.  
doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.642280.
17. M. Mittal *et al.*, "A randomised controlled trial comparing the effects of micronized progesterone to medroxyprogesterone acetate on cardiovascular health, lipid metabolism and the coagulation cascade in women with premature ovarian insufficiency: Study protocol and review o," *Menopause Int*, vol. 19, no. 3, pp. 127–132, 2013.  
doi: 10.1177/1754045313503635.
18. P. M. Crofton *et al.*, "Physiological versus standard sex steroid replacement in young women with premature ovarian failure: Effects on bone mass acquisition and turnover," *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. Oxf, no. 73, pp. 707–714, 2010.

- doi: 10.1111/j.1365-2265.2010.03868.x.
19. L. M. Nelson, “Clinical practice. Primary ovarian insufficiency.,” *The New England journal of medicine*. pp. 606–614, 2009.  
doi: 10.1056/NEJMcp0808697.
  20. M. Bidet, A. Bachelot, and P. Touraine, “Premature ovarian failure: Predictability of intermittent ovarian function and response to ovulation induction agents,” *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. pp. 416–420., 2008.  
doi: 10.1097/GCO.0b013e328306a06b.
  21. K. Kawamura, “Infertility Treatment in Primary Ovarian Insufficiency: Fertility Preservation and In Vitro Activation,” *J. Gynecol. Womens Heal.*, vol. 7, no. 1, 2017.  
doi: 10.19080/jgwh.2017.07.555704.
  22. A. Hershlag and M. W. Schuster, “Return of fertility after autologous stem cell transplantation,” *Fertil. Steril.*, vol. 77, pp. 419–421, 2002,  
doi: 10.1016/S0015-0282(01)02987-9.
  23. A. Bukovsky, “Can ovarian infertility be treated with bone marrow- or ovary-derived germ cells?,” *Reprod. Biol. Endocrinol.*, no. 3, p. 36, 2005.  
doi: 10.1186/1477-7827-3-36.
  24. 陈素庵, 陈素庵妇科补解. 山西科学技术出版社, 2013.  
Chen Su An (2013). *Chen Su An bổ giải Phụ khoa*, Nhà xuất bản Khoa học và Công nghệ Sơn Tây.
  25. 佚名, 傅青主女科. 1978.  
Khuyết Danh (1978). *Phó Thanh chủ phụ khoa*.
  26. 佚名, 黄帝内经素问. 2010.  
Khuyết Danh (2010). *Hoàng đế nội kinh tố vấn*.
  27. 佚名, 景岳全书集要. 2007.  
Khuyết Danh (2007). *Cảnh Nhạc toàn thư tập yếu*.
  28. 露红, “辨治闭经规律探析,” in *万氏女科, 新中医*, pp. 263–265.

- Lu Hồng. Quy luật biện trị bế kinh. Vạn thị phụ khoa, tân trung y, pp. 263–265.
29. 佚名, 新编中医妇科学. 2001.  
Khuyết Danh (2001). Tân biên trung y phụ khoa học.
30. 佚名, 实用中医妇科学. 1985.  
Khuyết Danh (1985). Thực dụng trung y phụ khoa học.
31. 张岩, 谈勇, and 夏桂成, “夏桂成调心补肾治疗卵巢早衰经验,” 广州中医药大学学报, no. 5, pp. 934–936, 2015.  
Zhang Yan, Tan Yong và Xia Guicheng (2015). Kinh nghiệm Hạ Quế Thành điều tâm bổ thận điều trị suy buồng trứng sớm. Tạp chí đại học trung y dược Quảng Châu, no. 5, pp. 934–936, 2015.
32. 佚名, 妇人大全良方. 1985.  
Khuyết Danh (1985). Phụ nhân đại toàn lương phương.
33. 佚名, 灵枢经校释. 1982.  
Khuyết Danh (1982). Linh khu kinh hiệu đính.
34. 温景荣 and 马晓辉, “对‘任主胞胎’理论思考,” 天津中医药大学学报, vol. 33, no. 1, pp. 9–10, 2014.  
Wen Jingrong và Ma Xiaohui (2014) Suy luận với lý luận Nhân chủ bào thai. Tạp chí đại học trung y dược Thiên Tân, vol. 33, no. 1, pp. 9–10, 2014.
35. 柴嵩岩, 滕秀香, , 姚海洋, , and 刘丹, , “柴嵩岩辨证治疗早发性卵巢功能不全经验,” *Beijing J. Tradit. Chinese Med.*, vol. 37, no. 04, pp. 292–294, 2018.  
Chai Songyan, Teng Xiuxiang, Yao Haiyang và Liu Dan (2018). Chai Songyan biện chứng trị liệu theo kinh nghiệm với bệnh suy giảm chức năng buồng trứng sớm. *Beijing J. Tradit. Chinese Med.*, vol. 37, no. 04, pp. 292–294.
36. J. Oliver, 李丽芸, and 胡向丹. “李丽芸教授治疗卵巢早衰的经验撷要,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, no. 9, pp. 1689–1699, 2013.  
doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

37. 汪玉珍, “导师王翠霞教授治疗卵巢早衰经验总结,” 辽宁中医药大学, 2012.  
Wang Yuzhen (2012). Tổng kết kinh nghiệm điều trị suy giảm chức năng buồng trứng sớm của giáo sư Wang Cuixia. Đại học trung y dược Liễu Ninh.
38. Hội dược điển Việt Nam, *Dược điển Việt Nam 5*. Nhà xuất bản y học, 2018.
39. 夏庆华 and 路千里, “熟地黄药理研究进展,” 江西中医药大学学报, vol. 20, no. 6, pp. 96–97, 2008.  
Xia Qinghua và Lu Qianli (2008). Nghiên cứu phát triển dược lý của thực địa hoàng. Tạp chí đại học trung y dược Giang Tây, vol. 20, no. 6, pp. 96–97.
40. H. J. Yuan *et al.*, “Research Progress on Chemical Constituents , Pharmacological Activity and Clinical Application of Chinese yam,” *Res. Cent. of Natural Drug, Jilin Univ. 130021, China*, vol. 04, no. 19, pp. 98–103, 2018.  
doi: 10.16720/j.cnki.tcyj.2018.04.019.
41. Z. Y., L. J.-J., J. B.-X., and X. X.-Y., “Advances in research on chemical constituents, pharmacological actions and processing of *Atractylodes macrocephala*,” *Chinese Arch. Tradit. Chinese Med.*, vol. 31, no. 10, p. 1012, 2019,  
[Online]. Available:  
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L620923839>.
42. 李岩, “白芍及其化学成分的药理研究进展,” *Occup Heal.*, vol. 31, no. 15, pp. 2153–2155, 2015.  
Li Yan (2015). Nghiên cứu phát triển thành phần hóa học, dược lý của Bạch thược. *Occup Heal.*, vol. 31, no. 15, pp. 2153–2155.
43. 杨小龙, , 珂, 张, 许俊锋, and 王志超, “Research on Pharmacological Activities of Cortex Moutan,” 河南科技大学学报(医学版), vol. 30, no. 2, pp. 157–158, 2012  
doi: 10.15926/j.cnki.issn1672-688x.2012.02.041.  
Yang Xiaolong, Ke, Zhang, Xu Junfeng và Wang Zhichao (2012). “Research



- on Pharmacological Activities of Cortex Moutan,”. *Tạp chí đại học khoa kỹ Hồ Nam*. vol. 30, no. 2, pp. 157–158.  
doi: 10.15926/j.cnki.issn1672-688x.2012.02.041.
44. 李倩, 陈云志, 柴艺汇, 张孟之, 洁高, and 文李, “人参现代药理作用研究进展,” *J. Guiyang Univ. Chinese Med.*, vol. 41, no. 5, pp. 89–92, 2019.  
doi: 10.16588/j.cnki.issn1002–1108.2019.05.022.  
Li Qian, Chen Yunzhi, Chai Yihui, Zhang Mengzhi, Jie Gao và Wen Li (2019). Phát triển nghiên cứu tác dụng dược lý của Nhân sâm. *J. Guiyang Univ. Chinese Med.*, vol. 41, no. 5, pp. 89–92.  
doi: 10.16588/j.cnki.issn1002–1108.2019.05.022.
45. 国辛, 赵昕彤, and 黄晓巍, “柴胡化学成分及药理作用研究进展,” *Jilin J. Chinese Med. Oct.*, vol. 38, no. 10, pp. 1196–1197, 2018,  
doi: 10.13463/j.cnki.jlzyy.2018.10.024.  
Guo Xin, Zhao Xintong, và Huang Xiaowei (2018). Phát triển nghiên cứu tác dụng dược lý và thành phần hóa học của Sài Hồ. *Jilin J. Chinese Med. Oct.*, vol. 38, no. 10, pp. 1196–1197, 2018.  
doi: 10.13463/j.cnki.jlzyy.2018.10.024.
46. 王玉, 杨雪, 夏鹏飞, 马肖, 杨蕊菁, and 王玉霞, “酸枣仁汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析,” *China J. Chinese Mater. Medica*, pp. 1–10, 2019,  
doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20190812.201.  
Wang Yu, Yang Xue, Xia Pengfei, Ma Xiao, Yang Ruijing và Wang Yuxia (2019). Phát triển nghiên cứu thành phần hóa học, tác dụng dược lý, ứng dụng lâm sàng và phân tích tiêu chuẩn thành phần của toan táo nhân thang. *China J. Chinese Mater. Medica*, pp. 1–10.  
doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20190812.201.
47. 华王 and 娜孙, “当归的有效化学成分及药理作用研究进展分析,” *山东化工 SHANDONG Chem. INDUSTRY*, vol. 46, pp. 59–60, 2017,  
doi: 10.19319/j.cnki.issn.1008-021x.2017.18.021.

- Hua Wang và Na Sun. Phân tích nghiên cứu tác dụng dược lý, thành phần hóa học của Đương Quy. *SHANDONG Chem. INDUSTRY*, vol. 46, pp. 59–60, 2017.  
doi: 10.19319/j.cnki.issn.1008-021x.2017.18.021.
48. 涛张, 马艳杰, and 王晓琴, “沙参属植物化学成分与药理作用研究进展,” *北方药学* 2013, vol. 10, no. 6, pp. 74–75, 2013.  
Tao Zhang, Ma Yanjie và Wang Xiaoqin. Nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng dược lý của Sa Sâm. *Dược học Phương bắc* 2013, vol. 10, no. 6, pp. 74–75.
49. Z. Shuainan and L. Xuzhao, “The Research Review of the Components and Pharmacological Action of the Bark of *Eucommia ulmoides* Oliv” *Chinese J. Ethnomedicine Ethnopharmacy*, vol. 26, no. 10, pp. 56–60, 2017.
50. 沈学英 and 蒋亚生, “枸杞子药理研究进展,” *时珍国医国药*, vol. 10, no. 10, pp. 798–799, 1999.  
Shen Xueying và Jiang Yasheng. Nghiên cứu phát triển dược lý Cầu kỳ tử. *Quốc dược quốc y Thời Chân*. vol. 10, no. 10, pp. 798–799, 1999.
51. 林玉榕 and 郑丽燕, “中药冤丝子药理研究,” *生物技术世界*, vol. 4, p. 84, 2014.  
Lin Yurong và Zheng Liyan. Nghiên cứu dược lý của thỏ ty tử. *Thế giới khoa kỹ sinh vật*. vol. 4, p. 84, 2014.
52. Đỗ Tất Lợi, “*Những Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*.” Nhà xuất bản y học, 2004.
53. R. Meng-yun, “Research advances in medicinal plants of *Cynomorium songaricum*,” *J. Biol.*, vol. 35, no. 5, pp. 95–98, 2018.  
doi: 10. 3969 / j. issn. 2095 — 1736. 2018. 05. 095.
54. Bộ Y Tế, “*Hướng dẫn thử nghiệm lâm sàng thuốc đông y*,” *Quyết định số 4313/QĐ-BYT ngày 19/10/2015*, pp. 13–21, 2015.
55. L. Ar, M. MM, and O. C et al. “Autoimmune etiology in premature ovarian failure [J] *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 1988, 16(3) : 115 - 122.
56. J. Horejsi, D. Novakova, and J. Martinek, “Circulating ovarian autoantibodies

- and FSH and LH levels in adolescent girls with primary menstrual cycle disorders,” *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.*, vol. 9, no. 2, pp. 74–78, 1996.  
doi: 10.1016/s1083-3188(96)70014-1.
57. V. K. Tuohy and C. Z. Altuntas, “Autoimmunity and premature ovarian failure,” *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. pp. 366–369, 2007,  
doi: 10.1097/GCO.0b013e328220e90c.
58. O. Taguchi, Y. Nishizuka, T. Sakakura, and A. Kojima, “Autoimmune oophoritis in thymectomized mice: Detection of circulating antibodies against oocytes,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 40, no. 3, pp. 540–553, 1980.
59. Z. Bin Tong and L. M. Nelson, “A mouse gene encoding an oocyte antigen associated with autoimmune premature ovarian failure,” *Endocrinology*, vol. 140, no. 8, pp. 3720–3726, 1999.  
doi: 10.1210/endo.140.8.6911.
60. S. Smith and S. Hosid, “Premature ovarian failure associated with autoantibodies to the zona pellucida,” *Int. J. Fertil. Menopausal Stud.*, vol. 39, no. 6, pp. 316–319, 1994.
61. S. H. Rhim *et al.*, “Autoimmune disease of the ovary induced by a ZP3 peptide from the mouse zona pellucida,” *J. Clin. Invest.*, vol. 89, no. 1, pp. 28–35, 1992.  
doi: 10.1172/JCI115572.
62. 付莉, 赵怡璇, 李守柔, “卵巢早衰实验动物模型的建立,” *生殖医学杂志*, vol. 15, no. 3, pp. 179–183, 2006.  
Fu Li, Zhao Yixuan, Li Shourou. Thành lập mô hình thực nghiệm suy buồng trứng sớm trên động vật. *Tạp chí y học sinh sản*. vol. 15, no. 3, pp. 179–183, 2006.
63. K. Jagarlamudi, P. Reddy, D. Adhikari, and K. Liu, “Genetically modified mouse models for premature ovarian failure (POF),” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 315, no. 1–2, pp. 1–10, 2010.  
doi: 10.1016/j.mce.2009.07.016.
64. D. Schmidt *et al.*, “The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is

- required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance,” *Development*, vol. 131, no. 4, pp. 933–942, 2004.  
doi: 10.1242/dev.00969.
65. F. Gücer *et al.*, “Effect of paclitaxel on primordial follicular reserve in mice,” *Fertil. Steril.*, vol. 76, no. 3, pp. 628–629, 2001.  
doi: 10.1016/S0015-0282(01)01959-8.
66. M. S. Yucebilgin *et al.*, “Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: An animal model of premature ovarian failure and infertility,” *Aust. New Zeal. J. Obstet. Gynaecol.*, vol. 44, no. 1, pp. 6–9, 2004,  
doi: 10.1111/j.1479-828X.2004.00143.x.
67. P. A. Phillips *et al.*, “Triptolide induces pancreatic cancer cell death via inhibition of heat shock protein 70,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 19, pp. 9407–9416, 2007.  
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1077.
68. R. Chugh *et al.*, “A preclinical evaluation of minnelide as a therapeutic agent against pancreatic cancer,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 4, no. 156, pp. 156–159, 2012.  
doi: 10.1126/scitranslmed.3004334.
69. 秦万章, “雷公藤治疗红斑性狼疮等结缔组织病的研究体会,” *江苏医药*, vol. 13, no. 12, p. 655, 1987.  
Qin Wanzhang. Nghiên cứu Lô công đằng điều trị bệnh luput ban đỏ và bệnh lý hệ thống. *Giang Tô y dược*, vol. 13, no. 12, p. 655, 1987.
70. Y. Fu *et al.*, “Therapeutic mechanisms of Tongmai Dasheng Tablet on tripterygium glycosides induced rat model for premature ovarian failure,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 139, no. 1, pp. 26–33, 2012,  
doi: 10.1016/j.jep.2011.08.077.
71. 高慧, 杨涓, 韩冰, 等. , “药物型卵巢早衰动物模型的研究,” *国医论坛*, vol. 22, no. 3, pp. 22–26, 2007.  
Gao Hui, Yang Juan, Han Bing. Nghiên cứu mô hình suy buồng trứng sớm do dược vật. *Quốc y luận biên*. vol. 22, no. 3, pp. 22–26, 2007.

72. X. Y. Chen *et al.*, “A mouse model of premature ovarian insufficiency induced by tripterygium glycoside via subcutaneous injection,” *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 7, no. 1, pp. 144–151, 2014.
73. N. V. Guerrero, R. H. Singh, A. Manatunga, G. T. Berry, R. D. Steiner, and L. J. Elsas, “Risk factors for premature ovarian failure in females with galactosemia,” *J. Pediatr.*, vol. 137, no. 6, pp. 833–841, 2000, doi: 10.1067/mpd.2000.109148.
74. S. Bandyopadhyay *et al.*, “Prenatal exposure to high galactose adversely affects initial gonadal pool of germ cells in rats,” *Hum. Reprod.*, vol. 18, no. 2, pp. 276–282, 2003, doi: 10.1093/humrep/deg058.
75. L. Wen, T. People, and H. Wuhan, “D( + ) 半乳糖对小鼠卵巢功能影响的 实验性研,” *中国优生与遗传杂志*, vol. 14, no. 12, pp. 98–100, 2006.
76. T. Xia, Y. Fu, H. Gao, Z. Zhao, L. Zhao, and B. Han, “Recovery of ovary function impaired by chemotherapy using Chinese herbal medicine in a rat model,” *Syst. Biol. Reprod. Med.*, vol. 60, no. 5, pp. 293–303, 2014, doi: 10.3109/19396368.2014.920057.
77. H. A, Y. S, A. M, S. F, and E. M., “Ovarian protection in cyclophosphamide-treated mice by fennel,” *Toxicol Rep*, vol. 4, no. 1, pp. 160–164, 2017, doi: 10.1016/j.toxrep.2017.03.002.
78. J. Of, P. Traditional, and C. Medicine, “Journal of practical traditional chinese medicine 2013.Vol.29 No.11,” *J. Pract. Tradit. CHINESE Med.*, vol. 35, no. 2, p. 200, 2019.
79. 宋坤琨 *et al.*, “补肾活血方改善卵巢早衰小鼠卵巢储备的作用及机制研究,” *China Acad. J. Electron. Publihing House. All rights reseved.*, pp. 102–103, 2019.  
Song Kunkun. Nghiên cứu cơ chế tác dụng của bài thuốc bổ thận hoạt huyết cải thiện chức năng buồng trứng trên mô hình suy giảm chức năng buồng trứng chuột nhắt. *China Acad. J. Electron. Publihing House. All rights*

- reseved.*, pp. 102–103, 2019.
80. X. Xu *et al.*, “Effects of Bushen Tianjing Recipe in a rat model of tripterygium glycoside-induced premature ovarian failure,” *Chinese Med. (United Kingdom)*, p. 10:12, 2017.  
doi: 10.1186/s13020-017-0131-3.
  81. M. Ma, X. Y. Chen, B. Li, and X. T. Li, “Melatonin protects premature ovarian insufficiency induced by tripterygium glycosides: Role of SIRT1,” *Am. J. Transl. Res.*, vol. 9, no. 4, pp. 1580–1602, 2017.
  82. S. L. Byers, M. V. Wiles, S. L. Dunn, and R. A. Taft, “Mouse estrous cycle identification tool and images,” *PLoS One*, vol. 7, no. 4, pp. 1–5, 2012.  
doi: 10.1371/journal.pone.0035538.
  83. C. Caligioni, “ARV and Nutrition Interactions,” *Curr. Protoc. Neurosci.*, vol. 48, no. 1, p. A.4I.1-A.4I.8, 2009,  
doi: 10.1002/0471142301.nsa04is48.Assessing.
  84. 游方, “调经助孕方对DOR模型大鼠卵泡发育障碍影响的实验研究,” 2015.  
You Fang (2015). Nghiên cứu ảnh hưởng của bài thuốc điều kinh trợ sản đến buồng trứng và chức năng sinh sản của chuột cống trên mô hình thực nghiệm.
  85. 李成婷, “补肾活血方调节雷公藤多甙致卵巢储备功能下降大鼠卵巢免疫功能实验研究,” 南京中医药大学, 2014.  
Li Cheng Ting. Nghiên cứu thực nghiệm phương bổ thận hoạt huyết điều tiết chức năng miễn dịch của chuột do Lôi công đằng gây suy giảm chức năng buồng trứng . Luận án tiến sỹ. Đại học trung y dược Nam Kinh, 2014.
  86. XU Wen-jun, G. Hui, and L. Yang, “Effect of Bushen Tiaochong Prescription on sex hormone level and TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  protein expression in rats with premature ovarian failure,” *North China Univ. Sci. Technol. Tangshan 063000, China*, pp. 953–957, 2016,  
doi: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.06.007.

**Phụ lục 2**  
**MỘT SỐ HÌNH ẢNH TRONG NGHIÊN CỨU**



**Máy xét nghiệm Elisa**



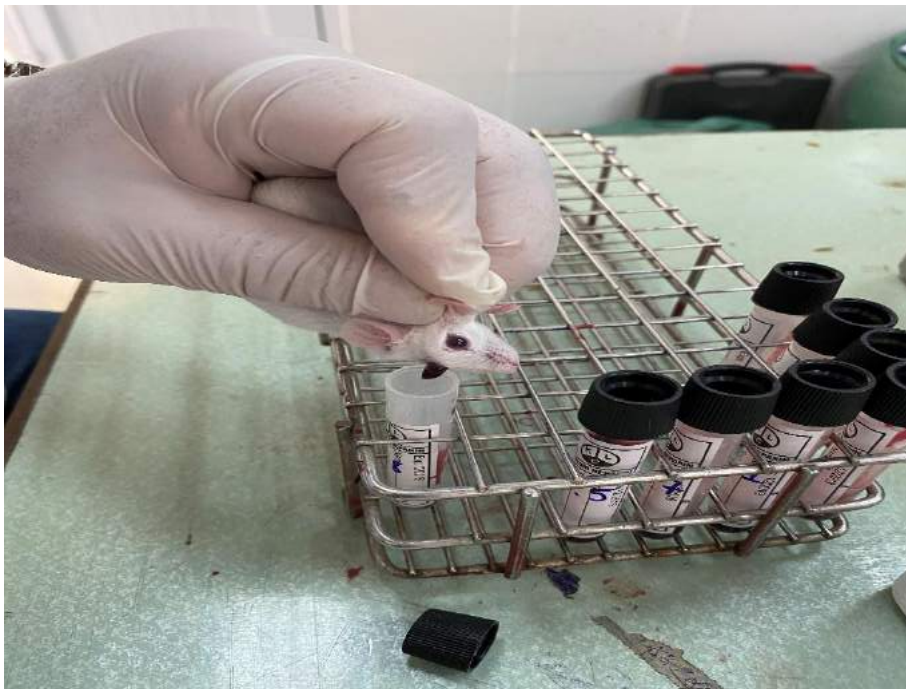
**Cân và chia lô chuột**



**Kĩ thuật tiêm TG dưới da chuột**



**Phết phiên đồ âm đạo chuột**



**Lấy máu hốc mắt chuột**





**Mô lấy tử cung và buồng trứng chuột**



**Hình ảnh tử cung và buồng trứng chuột lô chứng**