

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



NGUYỄN QUỐC NGHĨA

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ TÁC
DỤNG SINH TINH CỦA BÀI THUỐC LỤC
VỊ ĐỊA HOÀNG GIA VỊ TRÊN ĐỘNG VẬT
THỰC NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SỸ Y HỌC

HÀ NỘI, 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



NGUYỄN QUỐC NGHĨA

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ TÁC
DỤNG SINH TINH CỦA BÀI THUỐC LỤC
VỊ ĐỊA HOÀNG GIA VỊ TRÊN ĐỘNG VẬT
THỰC NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SỸ Y HỌC

Chuyên ngành : Y học cổ truyền

Mã số : 8720115

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS ĐOÀN QUANG HUY

PGS.TS NGUYỄN HOÀNG NGÂN

HÀ NỘI, 2025

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, tôi xin chân thành cảm ơn:

- Ban Giám đốc, Phòng Đào tạo sau đại học - Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Với tấm lòng chân thành, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới:

- **PGS.TS. Đoàn Quang Huy** và **PGS.TS Nguyễn Hoàng Ngân** là 2 người thầy đã hết lòng quan tâm, dạy bảo tôi về kiến thức chuyên môn cũng như trực tiếp hướng dẫn tôi trong suốt quá trình hoàn thành luận văn này.

- Các Thầy, Cô trong Hội đồng khoa học chấm luận văn đã đóng góp, chỉ bảo cho tôi nhiều ý kiến quý báu để giúp tôi hoàn thành luận văn của mình.

- Tập thể các giảng viên, bác sỹ bộ môn Dược lý Học viện Quân Y, những người đã trực tiếp giúp đỡ tôi trong quá trình tiến hành thực nghiệm để hoàn thành luận văn.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng cảm kích và biết ơn sâu sắc tới những người thân trong gia đình, bạn bè đã luôn động viên, giúp đỡ và ủng hộ tôi trong suốt quá trình học tập cũng như quá trình hoàn thành luận văn này.

Học viên

Nguyễn Quốc Nghĩa

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Quốc Nghĩa, học viên Cao học khóa 15 Học viện Y Dược học Cổ truyền Việt Nam, chuyên ngành Y học cổ truyền, xin cam đoan:

1. Luận văn này do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của Thầy PGS.TS Đoàn Quang Huy và PGS.TS Nguyễn Hoàng Ngân.

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 tháng năm 2025 .

Người viết cam đoan

Nguyễn Quốc Nghĩa

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Việt	Tiếng Anh
GnRH	Hormone giải phóng gonadotropin	Gonadotropin-releasing hormone
FSH	Hormon kích thích tạo nang	Follicle-stimulating hormone
LH	Hormon tạo hoàng thể	Luteinizing hormone
SGCNTH	Suy giảm chức năng tinh hoàn	Testicular failure
YHHD	Y học hiện đại	Modern medicine
YHCT	Y học cổ truyền	Traditional medicine
WHO	Tổ chức y tế thế giới	World health organization
LVDHGV	Lục vị địa hoàng gia vị	Liuwei DiHoang extra
Cs	Cộng sự	Partner
ALC	Dịch thủy phân Alcalase	Alcalase hydrolysate
PEP	Dịch thủy phân Pepsin	Pepsin hydrolysate
MAPK	Protein kinase hoạt hóa bởi mitogen	Mitogen - activated protein kinase
ERK	Kinase điều hòa tín hiệu ngoại bào	Extracellular signal-regulated kinases
JNK	Protein kinase hoạt hóa mitogen đầu N	The c-Jun N-terminal protein kinase
P38	Protein kinase 38	Protein kinase 38
UV	Tia cực tím	Ultra violet

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Quan điểm của y học hiện đại về suy giảm chức năng tinh hoàn	3
1.1.1. Tinh hoàn và quá trình sinh tinh	3
1.1.2. Các nguyên nhân gây suy giảm chức năng tinh hoàn	7
1.1.3. Chẩn đoán suy giảm chức năng tinh hoàn	8
1.1.4. Hướng điều trị suy giảm chức năng tinh hoàn theo Y học hiện đại.....	10
1.2. Quan niệm của Y học cổ truyền về suy giảm chức năng tinh hoàn	10
1.2.1. Quan niệm về sinh dục và sinh sản nam theo Y học cổ truyền.....	10
1.2.3. Điều trị suy giảm chức năng tinh hoàn theo Y học cổ truyền.....	16
1.3. Tổng quan về bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị	19
1.3.1. Nguồn gốc bài thuốc.....	19
1.3.2. Thành phần bài thuốc nghiên cứu	20
1.4. Tình hình nghiên cứu suy giảm chức năng tinh hoàn trên thế giới và Việt Nam	22
1.4.1. Tại Việt Nam	22
1.4.2. Trên thế giới	23
1.5. Các mô hình gây suy giảm chức năng tinh hoàn trên động vật thực nghiệm	24
CHƯƠNG 2 CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ..	27
2.1. Đối tượng, nguyên vật liệu nghiên cứu	27
2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu	27
2.1.2. Quy trình sản xuất dịch chiết của bài thuốc nghiên cứu.....	27
2.1.3. Đối tượng nghiên cứu	28
2.1.4. Phương tiện nghiên cứu.....	30
2.1.5. Hóa chất nghiên cứu	30
2.2. Phương pháp nghiên cứu	31
2.2.1. Đánh giá độc tính cấp	31
2.2.2. Đánh giá tác dụng cải thiện chức năng sinh tinh của chế phẩm trên chuột cống	

trắng đục gây suy giảm chức năng tinh hoàn bằng Natri valproate.....	34
2.3. Xử lý số liệu	39
2.4. Thời gian và địa điểm thực hiện.....	39
2.5. Đạo đức trong nghiên cứu.....	39
CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	40
3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp	40
3.2. Kết quả nghiên cứu tác dụng cải thiện chức năng sinh tinh của bài thuốc trên thực nghiệm.....	41
3.2.1. Tác dụng của bài thuốc lên nồng độ Testosterone huyết thanh chuột	41
3.2.2. Tác dụng của bài thuốc lên nồng độ FSH huyết thanh chuột	42
3.2.3. Tác dụng của bài thuốc lên số lượng và chất lượng tinh trùng chuột	43
3.2.4. Tác dụng của bài thuốc lên mô học tinh hoàn chuột cống trắng đục.....	48
CHƯƠNG 4 BÀN LUẬN	52
4.1. Về độc tính cấp	52
4.2. Về tác dụng cải thiện khả năng sinh tinh của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị.....	54
KẾT LUẬN.....	71
KIẾN NGHỊ.....	72
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Chỉ số tình dịch độ bình thường theo WHO (2021).....	9
Bảng 1.2. Các vị thuốc nghiên cứu.	21
Bảng 2.1. Thành phần bài thuốc.....	27
Bảng 2.2. Hệ số quy đổi liều dùng có hiệu quả tương đương giữa các loài động vật và người.....	28
Bảng 3.1. Độc tính cấp sớm của mẫu thử trên chuột nhắt trắng (n=10).....	40
Bảng 3.1. Kết quả đánh giá độc tính muộn (từ ngày 4 đến ngày 7) sau uống thuốc ở các lô nghiên cứu.....	41
Bảng 3.2. Nồng độ Testosterone huyết thanh chuột (n = 10, $\bar{X} \pm SD$).....	42
Bảng 3.3. Nồng độ FSH huyết thanh chuột (n = 10, $\bar{X} \pm SD$).....	43
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của bài thuốc lên mật độ tinh trùng (n = 10, $\bar{X} \pm SD$)..	44
Bảng 3.5. Mức độ di động của tinh trùng (n = 10, $\bar{X} \pm SD$).....	45
Bảng 3.6. Tỷ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường (n = 10, $\bar{X} \pm SD$)..	46
Bảng 3.7. Trọng lượng của các cơ quan sinh dục chuột (n = 10).....	47
Bảng 3.8. Đường kính ống sinh tinh của các lô nghiên cứu (n=10, $\bar{X} \pm SD$)	51

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Giải phẫu cơ quan sinh dục nam.	3
Hình 1.2. Cơ chế điều hòa hormone sinh dục nam	4
Hình 2.1. Chuột nhắt trắng và chuột cống trắng sử dụng trong nghiên cứu.....	29
Hình 2.2. Chuột uống thuốc bằng kim đầu tù	32
Hình 2.3. Kỹ thuật chọc kim lấy máu ở tim chuột	35
Hình 3.1. Hình ảnh mô học tinh hoàn (chuột 08, lô chứng).....	48
Hình 3.2. Hình ảnh mô học tinh hoàn (chuột 12, lô mô hình)	48
Hình 3.3. Hình ảnh mô học tinh hoàn (chuột 27, lô tham chiếu).....	49
Hình 3.4. Hình ảnh mô học tinh hoàn (chuột 36, trị 1)	49
Hình 3.5. Hình ảnh mô học tinh hoàn (chuột 45, lô trị 2)	50

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu độc tính cấp.....	33
Sơ đồ 2.2. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng cải thiện sinh tinh của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị	38

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vô sinh là một bệnh mang tính xã hội. Hiện nay, vấn đề hiếm muộn đang có tỷ lệ ngày càng tăng cao và phức tạp hơn. Tại Việt Nam, tỷ lệ vô sinh chiếm khoảng 7-10% dân số. Trong 100 cặp vợ chồng vô sinh thì nguyên nhân do chồng chiếm 30%, do vợ chiếm 40%, do cả hai người là 20%, còn 10% không rõ nguyên nhân. Trong số đó, nguyên nhân dẫn đến vô sinh xuất phát từ nam giới với căn nguyên gặp chủ yếu là do suy giảm chức năng tinh hoàn (SGCNTH) [1].

Việc điều trị vô sinh do suy giảm chức năng tinh hoàn còn gặp nhiều khó khăn, chủ yếu do SGCNTH có nhiều nguyên nhân. Theo E. Carlsen và cộng sự (cs), trong 50 năm từ 1940 - 1990, chất lượng tinh dịch ở nam giới đã thực sự suy giảm [2]. Theo World Health Organization (WHO), mật độ tinh trùng tối thiểu để chẩn đoán vô sinh đang giảm từ 40 triệu/ml (1987) xuống 20 triệu/ml (1999) và 16 triệu/ml (2021). Tỷ lệ tinh trùng di động tối thiểu để chẩn đoán vô sinh giảm từ 50% (1999) xuống 42% (2021) [3],[4]. Mặc dù với sự phát triển của y học hiện đại (YHHĐ), việc điều trị vô sinh đạt được nhiều thành tựu đáng kể, nhưng kết quả chưa ổn định, có nhiều hạn chế như về kinh phí điều trị còn cao, chưa tiếp cận được nhiều tầng lớp xã hội, công tác truyền thông giáo dục sức khỏe còn nhiều điểm hạn chế, đa số thuốc sử dụng đều có những tác dụng không mong muốn do SGCNTH thường phải điều trị kéo dài. Những năm gần đây, khi nền y học cổ truyền Việt Nam ngày càng phát triển và chú trọng, có nhiều các đề tài khoa học đã nghiên cứu và khẳng định tác dụng của thuốc y học cổ truyền (YHCT) trong điều trị bệnh đặc biệt bệnh vô sinh với ưu thế là cải thiện chất lượng tinh trùng cũng như ít tác dụng phụ [5],[6]. Các bài thuốc với các vị thuốc nguồn gốc thảo dược thường có tác dụng bổ trợ tốt đem lại hiệu quả bền vững và giá thành phù hợp với mức thu nhập của đa số người bệnh trong cộng đồng.

Bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị Nhục thung dung, Hải mã, Thỏ ty tử dựa trên nền tảng là bài thuốc cổ phương “Lục vị địa hoàng thang” đã được lưu truyền nhiều đời nay, bài thuốc được mệnh danh là một trong những nền “thập đại danh phương” của nền Y học cổ truyền Trung Quốc, bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị Nhục thung dung, Hải mã, Thỏ ty tử được Thầy Đoàn Quang Huy sáng tạo và đề xuất

nhằm điều trị các trường hợp bệnh nhân suy giảm chức năng tinh hoàn, đặc biệt thể thận dương hư. Bài thuốc trên cơ sở áp dụng lý luận y học cổ truyền theo nguyên tắc “Thiên bổ dương dã tất vu âm trung cầu dương”, tức là muốn bổ dương tất phải bổ dương trong âm. Do đó, các vị thuốc trong bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị Nhục thung dung, Hải mã, Thỏ ty tử là sự phối hợp hài hòa của các dược liệu có tác dụng bổ thận dương và bổ thận âm, bổ khí huyết, mạnh gân cốt, có tác dụng bổ thận sinh tinh, ôn thận tráng dương. Nhiều nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước cũng đã chứng minh tác dụng tăng cường khả năng sinh tinh của các vị thuốc thành phần trong bài thuốc. Để có cơ sở khoa học cho việc phát triển sản phẩm và sử dụng chế phẩm trên lâm sàng, trước tiên cần phải đánh giá tính an toàn và tác dụng của chế phẩm trên thực nghiệm. Xuất phát từ những lý do trên, nhóm nghiên cứu chúng tôi tiến hành đề tài “**Nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng sinh tinh của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị trên động vật thực nghiệm**” nhằm mục tiêu:

- 1. Đánh giá độc tính cấp của bài thuốc “Lục vị địa hoàng” gia vị Nhục thung dung, Hải mã, Thỏ ty tử.*
- 2. Đánh giá tác dụng sinh tinh của bài thuốc “Lục vị địa hoàng” gia vị Nhục thung dung, Hải mã, Thỏ ty tử trên mô hình chuột cống gây suy giảm chức năng tinh hoàn.*

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

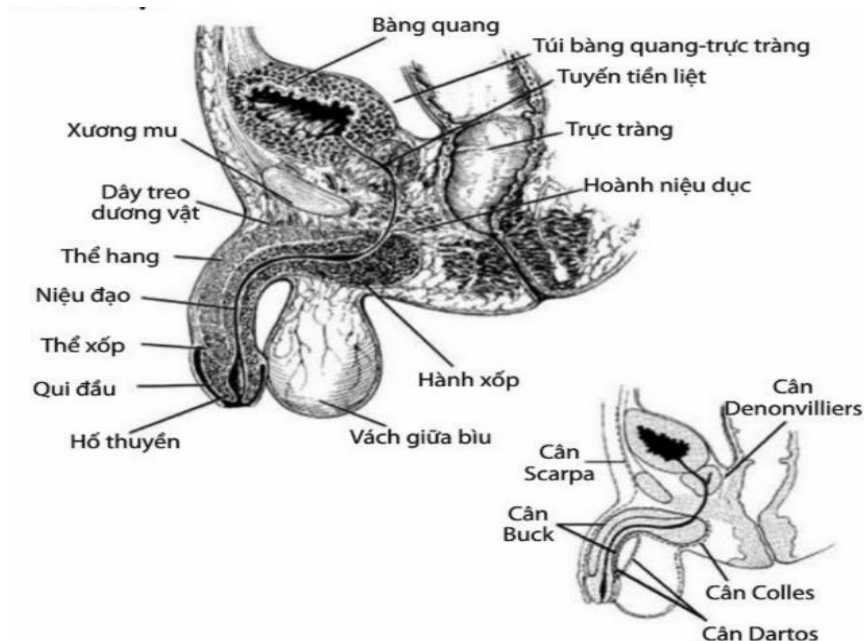
1.1. Quan điểm của y học hiện đại về suy giảm chức năng tinh hoàn

1.1.1. Tinh hoàn và quá trình sinh tinh

Cơ quan sinh dục nam gồm có: Các cơ quan sinh dục trong (tinh hoàn, mào tinh hoàn, ống dẫn tinh, túi tinh, tuyến tiền liệt và tuyến hành niệu đạo) và các cơ quan sinh dục ngoài (dương vật, niệu đạo và bìu). Trong đó tinh hoàn là bộ phận chủ yếu của cơ quan sinh dục nam [7],[8].

1.1.1.1. Tinh hoàn

Tinh hoàn là một tuyến sinh dục nam ở phía ngoài phúc mạc, nằm ở trong bìu. Ở cơ thể nam giới bình thường có hai tinh hoàn. Mỗi tinh hoàn, hình quả trứng, chiều dài từ 3,5 - 5,5cm, chiều rộng từ 2,0 - 3,0cm tương ứng với thể tích là 12 - 15 mm³, trọng lượng trung bình là 20gram [8]. Tinh hoàn vừa là tuyến ngoại tiết, vừa là tuyến nội tiết. Tinh hoàn có chức năng tạo ra tinh trùng (chức năng ngoại tiết) và tiết vào trong máu những hormon sinh dục nam (chức năng nội tiết) [7],[9],[10].



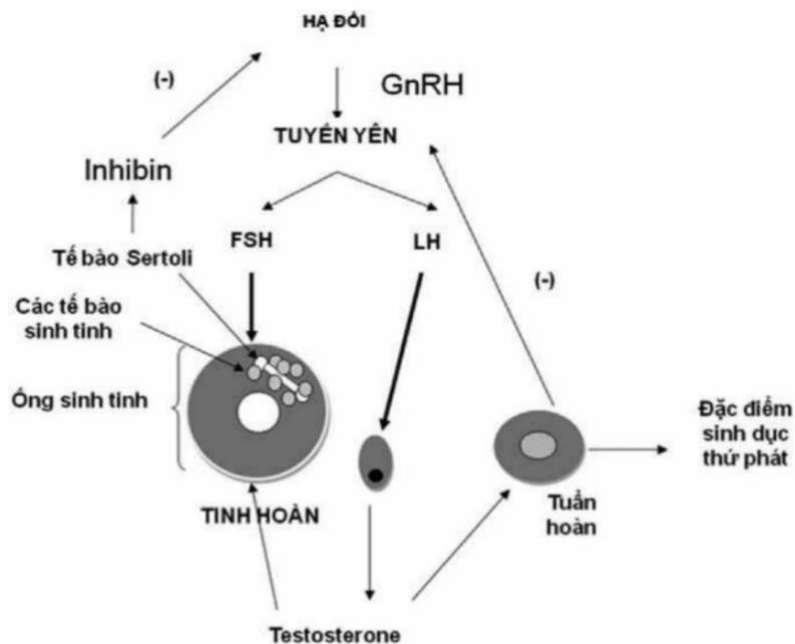
Hình 1.1. Giải phẫu cơ quan sinh dục nam

**Nguồn: Nguyễn Thành Như (2013) [7]*

1.1.1.2. Các hormone nội tiết tham gia vào quá trình sinh tinh

Các hormone kích thích sản sinh tinh trùng ở tinh hoàn theo cơ chế trục vùng dưới đồi - tuyến yên - cơ quan đích, bao gồm Gonadotropin - releasing hormone (GnRH) (vùng dưới đồi), Follicle - stimulating hormone (FSH) (của tuyến yên), Luteinizing hormone (LH) (của tuyến yên) và Testosterone (của tinh hoàn) [7],[9].

Tuyến yên tiết ra hai hormone quan trọng kiểm soát chức năng tinh hoàn là FSH và LH. Sự phóng thích FSH và LH phụ thuộc vào sự kích thích theo nhịp của GnRH với nhịp độ 60 phút/lần. LH là chất kích thích tế bào Leydig sản xuất Testosterone, hormone này tác động phản hồi âm tính lên sự phóng thích LH từ tuyến yên. FSH chịu trách nhiệm khởi đầu và duy trì sự sinh tinh và tác động trên tế bào Sertoli. Tế bào Sertoli - cũng nằm trong những ống sinh tinh, bao quanh các tế bào mầm đang phát triển, có vai trò dinh dưỡng và bảo vệ tinh trùng. Inhibin là một polypeptid do tế bào Sertoli tiết ra, có tác động ức chế sự phóng thích FSH từ tuyến yên. Sự phản hồi âm tính của Testosterone và các steroid khác như Estradiol trên sự phóng thích FSH và LH trước hết được điều hoà bởi hạ đồi và GnRH, hơn là bởi sự ức chế trực tiếp trên tuyến yên [7].



Hình 1.2. Cơ chế điều hòa hormone sinh dục nam

**Nguồn: Nguyễn Thành Như (2013) [7]*

- GnRH là hormone được giải phóng từ vùng dưới đồi kích thích tế bào thùy trước tuyến yên tổng hợp và bài tiết cả hai hormon FSH và LH. GnRH được bài tiết theo nhịp, tuy nhiên nhịp bài tiết GnRH liên quan chặt chẽ đến sự bài tiết LH hơn là FSH. VẮng mặt GnRH hay đưa GnRH vào dòng máu đến tuyến yên liên tục thì cả LH và FSH đều không được bài tiết [9].

- FSH là hormone được giải phóng ở thùy trước tuyến yên, có tác dụng lên tuyến sinh dục nam:

+ Kích thích ống sinh tinh phát triển.

+ Kích thích tế bào Sertoli nằm ở thành ống sinh tinh phát triển và bài tiết các chất tham gia vào quá trình sản sinh tinh trùng [9]

- LH cũng là hormone được giải phóng từ thùy trước tuyến yên, có tác dụng:

+ Kích thích tế bào kẽ Leydig (nằm giữa các ống sinh tinh) phát triển.

+ Kích thích tế bào kẽ Leydig bài tiết Testosterone [9].

- Tinh hoàn bài tiết một số hormone sinh dục nam mà thường gọi là androgen. Các hormone này bao gồm Testosterone, Dihydrotestosterone và Androstenedione. Trong đó Testosterone là hormone quan trọng nhất của hệ sinh dục nam.

Tác dụng của Testosterone: Trong thời kỳ bào thai, Testosterone biệt hoá trung khu sinh dục vùng dưới đồi theo hướng nam (Quy định giới tính nguyên phát), phát triển cơ quan sinh dục. Vào tháng thứ 7 - 8 của thai nhi, Testosterone kích thích sự di chuyển của tinh hoàn từ bụng xuống bìu. Đến tuổi dậy thì Testosterone kích thích sự phát triển và hoàn thiện bộ máy sinh dục: Tinh hoàn, dương vật, bìu, tuyến tiền liệt, túi tinh nở to ra, túi tinh sản xuất nhiều Fructose để nuôi dưỡng tinh trùng.

Cùng với FSH, Testosterone có tác dụng lên ống sinh tinh, làm phát triển tinh trùng, đặc biệt chuyển tiền tinh trùng thành tinh trùng, giúp cho sự hoàn thiện chức năng (sự thành thục) của tinh trùng. Testosterone duy trì bản năng sinh dục, phát triển tâm lý nam, phát triển các giới tính nam thứ phát: Thanh quản to, giọng trầm, mọc lông nách, lông mu, mọc râu, xương - cơ phát triển, da không mịn màng và tăng bài tiết chân lông [7],[9],[10],[11].

Ngoài ra hai hormone Estradiol và Prolactin cũng tham gia vào nội tiết sinh dục nam:

- Estradiol là một hormone sinh dục chính của nữ, Estradiol (E2) là dạng chính của hormone Estrogen và là dạng Estrogen có hoạt lực mạnh nhất, Estradiol ở nam có tác dụng:

+ Kích thích tăng trưởng mô ở vú, vì thể nam giới có quá nhiều Estradiol dẫn tới ngực lớn hơn.

+ Nồng độ Estradiol tăng cao ảnh hưởng đến mất cân bằng giữa Estrogen và Testosterone, mức tinh trùng có khả năng bị giảm, nam giới có lượng Estrogen tăng cao gây rối loạn cương dương [9].

- Prolactin là một hormone được tiết ra ở thùy trước tuyến yên, là hormone bài tiết sữa chủ yếu ở nữ giới, ở nam giới hormone này có vai trò:

+ Điều hòa và duy trì chức năng hệ miễn dịch, tham gia vào quá trình trao đổi chất.

+ Thúc đẩy sự phát triển tuyến vú nên ở nam giới, nồng độ prolactin cao gây chứng vú to ở nam giới [9].

1.1.1.3. Quá trình sinh tinh

Quá trình sinh tinh được diễn ra trong lòng ống sinh tinh của tinh hoàn và kéo dài khoảng 72 ngày. Tuy nhiên, để trưởng thành hoàn toàn về mặt chức năng, tinh trùng phải trải qua một giai đoạn cuối cùng tại mào tinh khoảng 12 – 21 ngày. Quá trình sinh tinh bao gồm ba thời kỳ: Thời kỳ tạo tinh bào, thời kỳ phân bào giảm nhiễm và thời kỳ tạo tinh trùng. Các giai đoạn này diễn ra không đồng bộ ở các ống sinh tinh, do đó ở bất cứ thời điểm nào, khi sinh thiết mô tinh hoàn người ta có thể tìm thấy các tế bào sinh tinh ở nhiều giai đoạn phát triển khác nhau.

Sự biệt hoá về cấu trúc: Các tinh tử trải qua sự biệt hoá về hình thái hình thành nên tinh trùng trưởng thành. Quá trình biệt hoá này được gọi là sự hình thành tinh trùng. Các tinh tử kéo dài ra và phát triển đuôi nhưng vẫn còn gắn với nhau và các tế bào Sertoli bên dưới bởi phương tiện là cầu nối tương bào. Kết quả của quá trình này là hình thành các tinh tử với đơn bội NST có nguồn gốc từ tế bào mẹ.

Sự di chuyển tinh trùng trong đường sinh dục nam: Tinh trùng mới hình thành được gắn vào các tế bào Sertoli, dưới ảnh hưởng Testosterone các tinh trùng được giải phóng vào lòng của tiểu quản và cuối cùng đến mào tinh. Tiếp theo mào tinh, tinh trùng đi vào ống dẫn tinh.

Sự di chuyển của tinh trùng nhờ vào những cơ thắt có tính nhu động của thành ống dẫn tinh. Khoảng cách tinh trùng phải di chuyển khoảng 6-7 m và mất 7-14 ngày.

Sự phóng tinh: Sự kích thích hệ thần kinh giao cảm dẫn đến sự co thắt nhu động các cơ mào tinh và ống dẫn tinh. Một lượng nhỏ dịch có chứa tinh trùng nằm ở mào tinh, ống dẫn tinh và bóng ống dẫn tinh sẽ được chuyển qua ống phóng tinh đến niệu đạo tiền liệt tuyến. Tiếp đó túi tinh cũng chế tiết 2-3 ml dịch dính, kiềm tính qua ống phóng vào niệu đạo tiền liệt tuyến. Các cơ tiền liệt tuyến co thắt và thêm vào 1-2 ml dịch tiết của tiền liệt tuyến giống như nước có tính acid nhẹ. Niệu đạo tiền liệt tuyến tiếp tục vào niệu đạo. Sự co thắt các cơ quanh niệu đạo gây ra lực phóng tinh ra ngoài niệu đạo.

Tinh dịch là một chất dịch đặc, bao gồm 2 thành phần gồm tinh trùng do tinh hoàn sản xuất và tinh tương được hình thành do chất tiết tiền liệt tuyến và túi tinh. Chức năng quan trọng nhất của tinh tương, với pH tổng hợp từ 7,2 - 7,8, là sự vận chuyển tinh trùng và làm tăng pH âm đạo (chức năng đệm).

Sự thành thực của tinh trùng ở mào tinh hoàn: Tinh trùng ở ống sinh tinh hoặc phần đầu của mào tinh hoàn hoàn không có khả năng vận động và không thể thụ tinh với noãn. Sau khi tinh trùng trong mào tinh hoàn 18-24 giờ chúng sẽ có khả năng vận động mạnh cho đến khi chúng phóng được vào sinh dục nữ. Tinh trùng bình thường di chuyển theo đường thẳng với vận tốc khoảng 4mm/phút [7],[10].

1.1.2. Các nguyên nhân gây suy giảm chức năng tinh hoàn

Chủ yếu gồm 3 nhóm nguyên nhân là trước tinh hoàn, tại tinh hoàn và sau tinh hoàn [7],[10],[12].

1.1.2.1 Nhóm nguyên nhân trước tinh hoàn

- *Bệnh của tuyến yên:* Tuyến yên sản xuất ra các hormone trong đó có các hormone hướng sinh dục là FSH và LH. Các nguyên nhân như bẩm sinh, sau phẫu thuật, nhồi máu, các khối u, sau trị liệu xạ trị hoặc bệnh nhiễm khuẩn tuyến yên đều có thể ảnh hưởng đến sự bài tiết các hormone này [13].

- *Bài tiết nội tiết quá mức*: Sản xuất quá nhiều androgen; nồng độ Estradiol quá cao; Prolactin bài tiết quá mức; Rối loạn chế tiết hormone tuyến giáp; Nồng độ Glucocorticoid trong máu cao.

1.1.2.2 Nhóm nguyên nhân tại tinh hoàn

- *Do các yếu tố bất thường về gen, di truyền*: Chủ yếu gồm hội chứng Klinefelter, hội chứng XYY, hội chứng Noonan, hội chứng XX,...[10],[12].

- *Do thương tổn tinh hoàn*: Ngoài các nguyên nhân tiên phát như tật không tinh hoàn hai bên, tật tinh hoàn không xuống bìu, hội chứng chỉ có tế bào sertoli, SGCNTH do rối loạn trương lực cơ, SGCNTH do các bất thường adrogen thì còn có các nguyên nhân thứ phát sau [10],[12]: Do các vi sinh vật sau khi lây nhiễm qua đường tình dục sẽ gây SGCNTH [14],[15]; do yếu tố nhiệt độ (quá cao, quá thấp) [16], giãn tĩnh mạch thừng tinh [17]; tiền sử mắc các bệnh truyền nhiễm cấp tính, hay gặp nhất là quai bị [18]; tia X, các loại tia phóng xạ và hóa chất gây độc cho tinh hoàn; các thuốc nội khoa gây SGCNTH...[10],[12].

1.1.2.3 Nhóm nguyên nhân sau tinh hoàn

- Do chế độ ăn uống thiếu vitamin (A, E, C, B) và một số acid béo, acid amin và kẽm có thể ảnh hưởng trực tiếp lên tinh hoàn gây suy giảm sinh tinh...[10],[12].

- Môi trường sống và làm việc độc hại, stress, thói quen không lành mạnh như nghiện rượu, thuốc lá, thức khuya, sinh hoạt tình dục vô độ...[19],[20],[21].

1.1.3. Chẩn đoán suy giảm chức năng tinh hoàn

Chẩn đoán dựa vào triệu chứng lâm sàng và các xét nghiệm cận lâm sàng [7],[10].

1.1.3.1 Các triệu chứng lâm sàng

- Căn cứ vào định nghĩa vô sinh của WHO: Vô sinh là một bệnh của hệ thống sinh sản nam hoặc nữ được xác định là không thể thụ thai sau 12 tháng quan hệ tình dục thường xuyên không được bảo vệ [3].

1.1.3.2 Các xét nghiệm cận lâm sàng

- **Xét nghiệm tinh dịch đồ:** Xét nghiệm tinh dịch đồ là một xét nghiệm cơ bản đầu tay trong chẩn đoán vô sinh nam. Từ năm 1978, WHO đã có tài liệu hướng dẫn đánh giá tinh dịch đồ và mới đây năm 2021, phiên bản 6 ra đời đưa ra những chỉnh sửa về tiêu chuẩn đánh giá các chỉ số trong tinh dịch đồ [3].

Nên cho bệnh nhân xét nghiệm tinh dịch đồ khi đã kiêng xuất tinh 2 - 7 ngày không giao hợp để cho kết quả chính xác nhất, lấy tinh dịch tại phòng, làm xét nghiệm trong vòng 1 giờ.

Theo WHO năm 2021, giới hạn giá trị tham khảo thấp nhất của tinh dịch ở những người nam giới có khả năng sinh sản như sau:

Bảng 1.1. Chỉ số tinh dịch đồ bình thường theo WHO (2021)

Thông số Parameter	Phân vị thứ 5 5th	Khoảng tin cậy 95% 95%CI
Thể tích (ml) <i>Volume</i>	1,4	1,3-1,5
Mật độ ($10^6/ml$) <i>Concentration</i>	16	15-18
Tổng số tinh trùng (10^6) <i>Total sperm number</i>	39	35-40
Di động (%) (A+B+C) <i>Motility</i>	42	40-43
Tiến tới (%) (A+B) <i>Progressive</i>	30	29-31
Tỷ lệ sống <i>Vitality</i>	54	50-56
Hình dạng bình thường (%) <i>Normal morphology</i>	4	3,9-4,0

- Các xét nghiệm khác:

+ **Xét nghiệm sinh hóa tinh dịch:** Một số chỉ tiêu trong sinh hóa tinh dịch cũng góp phần tìm ra nguyên nhân gây SGCNTH.

Kẽm có vai trò trong phát triển của tinh hoàn, tiền liệt tuyến và khả năng di động của tinh trùng. Kẽm tham gia vào quá trình tổng hợp Testosterone tại tế bào Leydig, vì vậy thiếu kẽm gây giảm khả năng sinh sản ở nam giới [22],[23].

Fructose là nguồn năng lượng chính của tinh trùng, đảm bảo sự sản sinh, phát triển, khả năng sống và di động của tinh trùng. Nồng độ Fructose trong tinh dịch có thể đánh giá chức năng hoạt động của túi tinh. Fructose giảm có liên quan với bất thường về cấu trúc, số lượng tinh trùng, chức năng túi tinh và ống dẫn tinh [23].

+ *Xét nghiệm hormone sinh dục*: Các chỉ số LH, FSH, Prolactin, Estradiol, Testosterone cần thiết để góp phần chẩn đoán nguyên nhân SGCNTH do nội tiết [7],[10].

1.1.4. Hướng điều trị suy giảm chức năng tinh hoàn theo Y học hiện đại

1.1.4.1. Điều trị nội khoa

- Các thuốc chống oxy hoá: *Glutathion, L-arginin, vitamin C, vitamin E, bêtacaroten.*

- Nội tiết tố: *Gonadotropin, Androgen, kháng estrogen tại receptor...*

- Dùng Corticoid trong vô sinh do kháng thể kháng tinh trùng.

- Dùng kháng sinh trong các trường hợp nhiễm trùng niệu, sinh dục [7],[10].

1.1.4.2. Điều trị bằng phẫu thuật

Trong một số bệnh gây ảnh hưởng tới đời sống tinh trùng cần phải tiến hành phẫu thuật như: Giãn tĩnh mạch thừng tinh, tinh hoàn lạc chỗ, nước màng tinh hoàn hoặc thoát vị bẹn...

1.2. Quan niệm của Y học cổ truyền về suy giảm chức năng tinh hoàn

1.2.1. Quan niệm về sinh dục và sinh sản nam theo Y học cổ truyền

1.2.1.1. Vai trò của tạng phủ đối với sinh dục và sinh sản

Về mặt tổng thể, tất cả các cơ quan tạng phủ trong cơ thể có mối liên hệ mật thiết và gắn bó với nhau, vì vậy nhìn chung bất kỳ sự rối loạn của cơ quan tạng phủ nào đều có thể ảnh hưởng tới sinh dục và sinh sản của con người. Tuy nhiên trong số các cơ quan tạng phủ, có 3 tạng có liên quan mật thiết nhất là tạng Thận, Tỳ, Can [24].

- **Thận**: Là một trong năm tạng quan trọng nhất của con người. Trong “Tổ vấn - Mạch yếu tinh vi luận” nói: “Yêu giả, thận chi phủ dã” tức là lưng là phủ của thận. Đời Minh, Triệu Hiến Khả trong “Y quán - Nội kinh thập nhị quan luận” có nói: “Thận hữu nhị, tinh sở xá dã. Sinh vu tích đốc thập tứ chùy hạ, lưỡng bàng các nhất thốn ngũ phân. Hình như hồng đậu, tương tịnh nhi khúc phụ vu tích”. Tức là thận

có hai trái là nơi trữ tinh khí, nằm ở đốt sống 14, hai bên cách cột sống 1,5 thốn. Như vậy cho thấy hình dáng và vị trí thận (tạng) cũng tương tự hình dáng giải phẫu của YHHD [25].

Về chức năng, theo YHCT, thận có chức năng chính là tàng tinh, chủ thủy và thu nạp khí. Trong đó chức năng tàng tinh liên quan trực tiếp tới sinh sản [25]:

+ *Thận tàng tinh*: Là chỉ thận có chức năng tồn trữ, phong tàng “tinh khí”. Tác dụng chủ yếu của thận chủ tàng tinh là đem tinh khí cơ thể tàng trữ tại thận, đồng thời thúc đẩy nó không ngừng bổ sung, đề phòng tinh khí hao hụt, là điều kiện tất yếu để tinh khí phát huy chức năng sinh lý đầy đủ trong cơ thể [25],[26].

Thận tàng tinh bao gồm tinh để nuôi dưỡng lục phủ ngũ tạng và tinh của cơ quan sinh dục. Tinh của cơ quan sinh dục chính là vật chất cơ bản nhất nuôi dưỡng, phát triển sự sinh sản, sinh dục của loài người để duy trì nòi giống. Thứ tinh này do tinh tiên thiên kết hợp với tinh hậu thiên chuyển hóa mà thành, lưu trữ và bài tiết tại tạng thận. Khi con người phát triển đến giai đoạn dậy thì, cũng là lúc tinh khí đầy đủ, có thể sinh đẻ. Trong thiên “Thượng cổ thiên chân luận - Tố vấn” có ghi chép: Con trai 8 tuổi thận khí thực, tóc tốt thay răng, 16 tuổi (nhị bát) thận khí thịnh, thiên quý đến, thận khí dật tả (đầy đủ tràn trề) âm dương điều hòa, có thể có con..., 40 tuổi (ngũ bát) thận khí bắt đầu suy, tóc rụng răng lung lay, 48 tuổi (lục bát) dương khí suy kiệt phần trên, mặt khô, tóc bắt đầu hoa râm. 56 tuổi (thất bát) can khí suy, gân cốt mềm yếu, thiên quý kiệt, tinh thiếu, tạng thận suy. 64 tuổi (bát bát) răng rụng tóc rụng...”. Chính vì vậy YHCT cho rằng: “Thận là gốc của tiên thiên” [25],[26].

Thận tàng trữ tinh tới mức nhất định sẽ hóa khí. Khí do thận tinh hóa gọi là thận khí. Tinh khí của thận khi sung mãn sẽ phát dục. Tinh khí của thận gắn liền với sự sinh trưởng và phát dục của cơ thể. Cơ thể từ khi sinh ra cho đến khi thay răng, dậy thì dần dần đầy đặn, mạnh mẽ, tinh khí bắt đầu đầy đủ, tới khi tràn trề là lúc phát dục, đánh dấu sự trưởng thành của thận khí, thường với nam là sản sinh ra tinh trùng, với nữ là bắt đầu có kinh nguyệt. Lúc này nếu giao hợp thì có thể có con.

+ *Thận chủ thủy*: Là chỉ thận chủ trì và điều tiết chuyển hoá tân dịch. Quá trình chuyển hoá tân dịch trong cơ thể rất phức tạp, thận có tác dụng chủ trì và điều tiết quá trình này. Có thể nhận biết từ hai mặt:

Thứ nhất *thận âm và thận dương có tác dụng điều tiết toàn bộ quá trình chuyển hoá tân dịch của các cơ quan.*

Thứ hai *tạng thận bản thân cũng là một mắt xích quan trọng bắt buộc tân dịch khi chuyển hoá và bài tiết phải đi qua.*

+ *Thận chủ nạp khí:* Thận chủ nạp khí là chỉ về thận có tác dụng giúp phế hít khí vào sâu. Hô hấp tuy là chức năng của phế, thở ra nhờ chức năng tuyên phát, hít vào nhờ chức năng túc giáng, nhưng khi hít vào nhờ tác dụng nhiếp nạp của thận mới hít sâu được [25],[26].

Tóm lại, tạng thận trong YHCT không chỉ là cơ quan “thận” theo YHHD mà còn bao gồm chức năng bài tiết, sinh dục và sinh sản của con người.

- **Tỳ:** Vị trí ở trung tiêu hoành cách. Chức năng sinh lý chủ yếu của tỳ: Chủ vận hoá, thăng thanh và thống nhiếp huyết dịch. Tỳ và vị là cơ quan chủ yếu tiêu hoá, hấp thu và phân bố chất bổ (tinh vi) của đồ ăn. Do đó có thể nói tỳ vị là nguồn sinh ra tinh hậu thiên, sinh ra khí, huyết, là hậu thiên chi bản. Chức năng chính của tỳ [25],[26]:

+ *Tỳ chủ vận hóa:* Vận là vận chuyển, hoá là tiêu hoá, hấp thu.

Tỳ có chức năng vận hóa thủy cốc (thức ăn, thức uống). Thức ăn sau khi tiêu hoá, phân tinh chất được tỳ hấp thu đưa lên phế, do phế chuyển vào tâm mạch, nhờ tác dụng của tỳ khí mà phân bổ khắp cơ thể nuôi dưỡng lục phủ ngũ tạng, tứ chi, xương, cơ nhục, da lông. Nếu chức năng này suy giảm sẽ xuất hiện triệu chứng chướng bụng, tiêu chảy, hư lao,... lâu dần sẽ làm tinh hậu thiên thiếu hụt mà gây vô sinh, hiếm muộn.

Như vậy, thông qua chức năng vận hóa, tỳ có tác dụng bổ sung tinh hậu thiên, nuôi dưỡng thiên quý và các cơ quan sinh sản khác ngoài thận.

+ *Tỳ chủ thăng thanh, thống nhiếp huyết dịch:* Thăng là lên trên, thanh là chỉ về tinh chất của thức ăn uống. Tỳ khí đưa chất bổ dưỡng được hấp thu lên đến tâm, phế, đầu, mắt. Chất bổ dưỡng này thông qua tác dụng của tâm và phế mà hoá thành khí huyết nuôi dưỡng toàn thân. Thống là thống lĩnh, khống chế. Tỳ khí điều khiển huyết dịch không cho chảy ra ngoài huyết mạch. Nếu chức năng này suy sẽ xuất hiện các triệu chứng xuất huyết dưới da, tiểu ra máu, rong kinh, di tinh, hoạt tinh [25],[26].

- **Can:** Vị trí ở trong ổ bụng dưới cơ hoành, có chức năng chính là tàng huyết và chủ sơ tiết [25],[26].

+ **Can tàng huyết:** Can có chức năng trữ tàng huyết dịch, điều tiết lưu lượng huyết và đề phòng xuất huyết. Can tàng trữ huyết dịch nghĩa là có một phần huyết được dự trữ ở Can để cung cấp kịp thời cho các tạng phủ, cơ quan khi cần. Vì vậy, can cũng có tác dụng nuôi dưỡng các cơ quan sinh sản.

+ **Can chủ sơ tiết:** Sơ là thông, tiết là phát tán. Can có tác dụng duy trì các hoạt động chức năng của toàn thân được thông suốt, làm cho khí, huyết, kinh lạc được lưu thông. Khi chức năng sơ tiết của can bị rối loạn, can khí uất kết sẽ dẫn đến tình chí uất ức, chức năng sinh lý hoặc suy giảm, hoặc hưng phấn thái quá [25],[26].

1.2.1.2. *Tinh tiên thiên, tinh hậu thiên và vai trò đối với sinh sản, sinh dục*

Trong YHCT, có một thứ vật chất tàng trữ tại tạng thận và liên quan trực tiếp tới sự phát triển của con người nói chung và sinh sản nói riêng gọi là “Tinh”. “Tinh” không chỉ có nghĩa đơn thuần là tinh trùng, mà tinh là chỉ vật chất cơ bản để cấu tạo nên cơ thể và dinh dưỡng nuôi cơ thể. Trong quá trình phát triển cơ thể, tinh luôn luôn bị tiêu hao và cũng thường xuyên được bổ sung để duy trì hoạt động sống. Tinh chia ra làm 2 loại [25]:

- **Tinh tiên thiên:** Còn gọi là tinh sinh dục, là thứ xuất hiện cùng sự sống, bẩm thụ và tiên thiên, có được trong sự giao hợp của nam nữ, là nguồn gốc để sinh tồn nòi giống nên còn gọi là tinh tiên thiên, nguyên tinh, chân tinh hay tinh sinh dục. Như vậy tinh tiên thiên là sự kết hợp tinh của cha và tinh của mẹ (trứng) thành bào thai. Hiện nay nhiều quan điểm đồng nhất tinh tiên thiên tương tự như tế bào gốc của YHHĐ.

- **Tinh hậu thiên:** Còn gọi là tinh dinh dưỡng, là thứ vật chất tinh hoa, có nguồn gốc từ thức ăn do vị thu nạp, nhờ tỳ vận hóa để các tạng hấp thu trong quá trình hoạt động. Tinh hậu thiên là vật chất nuôi dưỡng cơ thể, làm cơ sở cho sinh mạng tồn tại và hoạt động, nên còn gọi là tinh dinh dưỡng, còn dư thừa thì giữ lại ở thận. So sánh với YHHĐ, tinh hậu thiên tương ứng với các chất điện giải, đường, axit amin, các vitamin, chất béo, ATP... là các thành phần duy trì sự sống của con người.

1.2.1.3. Vai trò của mệnh môn với sinh sản và sinh dục của con người

Mệnh môn là một danh từ chuyên dùng trong YHCT, lần đầu tiên xuất hiện trong cuốn Nội kinh. Theo Nội kinh, mệnh môn là chỉ đôi mắt: “Mệnh môn, mục dã”. Đến khi cuốn “Nạn kinh” ra đời, mệnh môn mới được định nghĩa như là một cơ quan trong tạng phủ. Nạn kinh điều 36 viết: “Thận có hai quả không phải hoàn toàn đều gọi là thận, ở phía tả là thận, ở phía bên hữu gọi là mệnh môn. Mệnh môn là chỗ ở của tinh khí và thần khí của toàn thân, cũng là chỗ đầu mối của nguyên khí, nam giới dùng đó để tàng chứa tinh khí, nữ giới dùng đó để giàng giữ bào thai”. Hải Thượng Lãn Ông trong tác phẩm Y tông tâm lĩnh cũng rất nhiều lần nhắc tới Mệnh môn. Trong tập “Huyền Tân Phát Vi” ông cũng nhắc tới: “Chính ở chỗ bên đôt sống số 8, có một quả tiểu tâm, bên tả là một quả Thận thuộc Âm Thủy, bên hữu là một quả thận thuộc Dương Thủy, đều cách ra ngang một thốn 5 phân, khoảng giữa là cung Mệnh môn” [27].

Như vậy, có thể nói mối quan hệ của thận và Mệnh môn rất gắn kết, như “âm dương hổ căn, thủy hỏa tương tế”, liên quan chặt chẽ tới sinh dục, sinh sản của con người. Thận chủ thủy, tàng tinh, tinh là nguyên âm, là chân thủy. Mệnh môn là chỗ liên quan đến nguyên khí nên gọi là nguyên dương, là chân hỏa. Nếu chân hỏa của nam giới suy yếu (hay còn gọi là mệnh môn hỏa suy) sẽ làm giảm công năng tạng thận và sinh dục làm cho nam giới vô sinh, thiếu tinh, tảo tiết, dương nuy... [24],[25].

1.2.1.4. Sinh lý thiên quý

“Thiên quý” là một chất thúc đẩy và duy trì sự sinh trưởng và phát dục của con người. Thiên quý có nguồn gốc từ thận tinh, được nuôi dưỡng bởi nguồn các chất tinh túy, dần dần thành thực, sung thịnh, sau đó dần suy giảm cho đến khi mất hẳn. Thận là gốc của tiên thiên, thuộc thủy, quý là một thiên can, cũng thuộc thủy, cho nên chất đó gọi là thiên quý. Thiên quý suy giảm thì chức năng sinh sản và sinh dục nói chung của con người cũng suy giảm, khó có con. Chính vì vậy, một số tác giả gần đây cho rằng thiên quý có những đặc điểm tương tự như các hormone sinh dục của nam và nữ [25].

1.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến suy giảm chức năng tinh hoàn theo Y học cổ truyền

1.2.2.1. Bệnh danh suy giảm chức năng tinh hoàn trong Y học cổ truyền

Y học cổ truyền không có tên bệnh danh là suy giảm chức năng tinh hoàn mà chỉ có các triệu chứng như tinh dịch trong loãng, bệnh danh như chứng “bất dục”, “hư lao”, “vô tử”, “tinh thiếu chứng”, “tinh lãnh”, “tinh loãng”,... Đối chiếu triệu chứng của bệnh giữa y học hiện đại và y học cổ truyền thì có thể xếp vào phạm trù của các bệnh trên [24].

1.2.2.2. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh suy giảm chức năng tinh hoàn theo Y học cổ truyền

Y học cổ truyền cho rằng, các nguyên nhân thất tinh, lục dâm, sang chấn, hoặc do nội thương lâu ngày sẽ ảnh hưởng tới các cơ quan tạng phủ, gây rối loạn sinh lý các cơ quan tạng phủ, qua đó dẫn đến thiếu tinh, bất dục. Cơ chế bệnh sinh gây nên chứng tinh thiếu, bất dục chủ yếu là [24],[28],[29]:

- ***Thận tinh khuy tổn***: Do phú bẩm thiên bất túc hoặc phòng dục quá độ làm cạn kiệt tinh khí. Vì tinh sinh ra ở huyết, không những tình dục làm tổn tinh, mà tất cả những việc làm tổn huyết hàng ngày đều làm tổn tinh: Mắt nhọc vì trông, tinh do trông bị hao, tai nhọc vì nghe, tinh do nghe bị hao, tâm nhọc vì nghĩ, tinh do nghĩ bị hao, thân thể nhọc vì dùng sức, tinh do sức bị hao. Hoặc tổn thương do thất tinh, sợ hãi làm hại thận, tinh khí thiếu hụt. Thận tàng tinh chủ về sinh dục, thận tinh hư suy gây liệt dương, tinh dịch ít, số lượng tinh trùng ít, không thụ thai.

- ***Mệnh môn hỏa suy***: Nguyên dương bất túc, thiên quý suy ở người già, ốm lâu ngày và tất cả các nguyên nhân gây thận tinh suy tổn ở trên làm thận dương hư. Thận dương mất chức năng khí hóa, không còn tác dụng sưởi ấm, làm tinh khí hư lạnh, dần dần thận khí hư làm thận dương hư không ôn dưỡng tinh khí, công năng sinh tinh kém.

- ***Tỳ hư tinh tổn***: Do suy nghĩ quá độ, lao động quá sức dẫn đến mệt mỏi làm tổn thương tâm tỳ, ăn uống thiếu thốn, hoặc do bệnh lâu cơ thể suy nhược mệt mỏi quá làm tổn thương tỳ, hoặc do thận dương không đủ không ôn ấm được tỳ dương làm không vận hoá được thủy cốc, hậu thiên mất điều hoà, tinh chất thức ăn không thể hoá sinh khí huyết làm thận tinh suy yếu.

- **Can khí uất kết, khí trệ huyết ứ:** Do tình chí không thư sướng, uất giận làm mất đi sự sơ tiết dẫn đến khí cơ uất trệ, mạch không điều đạt mà gây bệnh.

Theo Hải Thượng Lãn Ông: Thận chủ bể tàng, can chủ sơ tiết, hai tạng này đều có tướng hỏa, giận quá làm tổn thương can, mà tướng hỏa động, động thì can sơ tiết mà thận bỏ mất chức năng bể tàng, tuy không giao hợp mà tinh cũng chảy hao ngầm. Do vậy mà làm khuynh tổn tinh [27].

- **Thấp nhiệt hạ trí:** Do ăn uống không điều độ, uống rượu, hút thuốc, thức khuya, ăn đồ béo, mặc quần chật hoặc do nhiễm phải tà khí thấp nhiệt ứ trọc đều có thể ảnh hưởng tới tinh hoàn gây ảnh hưởng tới tinh dịch.

Hạ tiêu thấp nhiệt: Do hạ tiêu nhiễm phải tà khí thấp nhiệt ứ trọc, thấp nhiệt nung nấu, câu kết ở bàng quang hoặc thận chuyển nhiệt xuống bàng quang làm chảy mủ dương vật, đái đục, đái rắt, đái buốt.

- **Ấm thực bất tiết, lao dật quá độ:** Uống rượu nhiều, những người lao lực quá độ, tinh huyết không đủ nuôi dưỡng cơ thể tất thận tinh suy tổn. Hoặc những người béo phì, lười vận động lâu ngày sinh ra khí trệ, đàm thấp cũng ảnh hưởng tới tinh khí.

1.2.3. Điều trị suy giảm chức năng tinh hoàn theo Y học cổ truyền

Dựa trên các ghi chép của cổ nhân và kinh nghiệm lâm sàng, các chuyên gia nam học YHCT ngày nay đã tổng hợp và hệ thống rất cơ bản về nguyên nhân, cơ chế và phân thể lâm sàng và điều trị bệnh thiếu tinh, vô sinh do nam giới. Chúng tôi tổng hợp lại gồm những thể chính được đa số các tác giả công nhận, đó là các thể:

- Hư chứng: Thận tinh khuỵu tổn, mệnh môn hỏa suy, khí huyết lưỡng hư.
- Thực chứng: Can khí uất kết, khí trệ huyết ứ, thấp nhiệt hạ trí.

Các phương pháp YHCT điều trị suy giảm chức năng tinh hoàn chủ yếu gồm dùng thuốc YHCT, châm cứu, điện châm, thực dưỡng hoặc kết hợp các phương pháp để điều trị hiệu quả [15],[18].

1.2.3.1. Nội trị pháp

- **Thận tinh khuỵu tổn**

+ Chứng trạng: Kết hôn nhiều năm không có con, lượng tinh dịch ít hoặc loãng

kèm sắc mặt kém nhuận, chóng mặt, ù tai, lưng gối yếu mỏi, răng trồi hoặc rụng, râu tóc bạc sớm, tinh thần mệt mỏi hay quên, trí nhớ giảm sút, hoặc đần độn, chân tay mềm yếu, động tác chậm chạp, mau già yếu, dương nuy. Mạch xích trầm tế vô lực.

+ *Pháp điều trị*: Bổ thận điền tinh.

+ *Bài thuốc*: Ngũ tử diễm tông hoàn kết hợp Tả quy hoàn gia giảm [24],[28].

Nghiên cứu của Shanshan Yong và cs (2020) cho thấy, bài thuốc Ngũ tử diễm tông hoàn có tác dụng cải thiện chất lượng và số lượng tinh trùng trên mô hình chuột cống gây SGCNTH theo thể thận tinh khuy tổn thông qua cơ chế hồi phục tế bào Sertoli [30].

- ***Mệnh môn hỏa suy***:

+ *Chứng trạng*: Kết hôn nhiều năm không có con, tinh dịch loãng lạnh, số lượng tinh trùng giảm kèm sắc mặt tối sạm, sợ lạnh, chân tay lạnh, lưng gối mỏi và lạnh, tinh thần mệt mỏi không phấn chấn, tiểu trong lượng nhiều hoặc són đái, đái nhiều lần, đái tiện nát vào lúc sáng sớm, liệt dương, mạch trầm tế hoặc trầm trì, chất lưỡi nhợt, rêu trắng.

+ *Pháp điều trị*: Ôn thận tráng dương, sinh tinh ích thận.

+ *Bài thuốc*: Kim quĩ thận khí hoàn kết hợp Bảo nguyên thang gia vị [24],[28].

Nghiên cứu của Liu He Liang (2009) cũng chứng minh bài thuốc Kim quĩ thận khí hoàn có tác dụng hồi phục chất lượng và số lượng tinh trùng, nồng độ Testosterone huyết thanh ở chuột cống đực gây suy giảm chức năng tinh hoàn theo thể thận dương hư [31].

- ***Tỳ hư tinh tổn***

+ *Chứng trạng*: Tinh dịch loãng, số lượng tinh trùng ít, giảm ham muốn, hoặc dương nuy, tảo tiết, kèm các triệu chứng toàn thân như đau nhức lưng, gối, chân tay hơi lạnh, sắc mặt trắng, toàn thân mệt mỏi vô lực, bụng trướng tiêu lỏng, ăn uống không ngon, chất lưỡi nhạt, rêu trắng, có dấu răng, mạch trầm tế.

+ *Pháp điều trị*: Ôn bổ tỳ thận, ích khí sinh tinh.

+ *Bài thuốc* : Thập tử thang hợp lục quân tử thang gia giảm [24],[28].

- Khí huyết lưỡng hư

+ *Chứng trạng*: Kết hôn nhiều năm không có con, tinh dịch lượng ít, số lượng tinh trùng giảm kèm mệt mỏi, sắc mặt không tươi, đầu vầng, mắt hoa, ngủ ít hay mê, hay quên, ăn kém, đại tiện phân nát, sức sống tinh trùng yếu, liệt dương, chất lưỡi bệu, nhớt, có thể có vết hằn răng, rêu lưỡi trắng, mạch vô lực.

+ *Pháp điều trị*: Bổ khí dưỡng huyết, bổ thận sinh tinh.

+ *Bài thuốc*: Ích tinh tự dục thang kết hợp Bát quân tử thang gia giảm [24],[28].

- Can khí uất kết, khí trệ huyết ứ

+ *Chứng trạng*: Kết hôn nhiều năm không có con, tinh dịch lượng ít, tinh trùng yếu, chết nhiều, số lượng tinh trùng ít, hay nhói đau tinh hoàn, ngực sườn đầy chướng, hay cáu gắt, chất lưỡi tối có chấm ứ huyết, mạch huyền sáp hoặc huyền khẩn.

+ *Pháp điều trị*: Sơ can giải uất, hành khí hoạt huyết sinh tinh.

+ *Bài thuốc*: Huyết phủ trục ứ thang gia giảm [24],[28].

- Thấp nhiệt hạ trí

+ *Chứng trạng*: Kết hôn nhiều năm không có con, số lượng tinh trùng ít, kèm mệt mỏi nặng nề, miệng đắng, biếng ăn, đầu vầng, không muốn uống nước, tinh dịch đặc mùi hôi, trong tinh dịch có nhiều hồng cầu, bạch cầu, tiểu tiện đục và nhỏ giọt, cảm giác nóng rát niệu đạo khi tiểu hoặc khi phóng tinh, lưỡi đỏ, rêu lưỡi vàng nhớt, mạch hoạt sắc hoặc nhu sắc.

+ *Pháp điều trị*: Thanh nhiệt, lợi thấp, giải độc, sinh tinh.

+ *Bài thuốc*: Long đởm tả can thang kết hợp Lục vị địa hoàng hoàn gia giảm [24],[28].

1.2.3.2. Ngoại trị pháp

Ngoại trị pháp điều trị suy giảm chức năng tinh hoàn chủ yếu là châm, cứu, điện châm. Các phương pháp này thường được kết hợp sử dụng với phương pháp dùng thuốc YHCT uống để đạt hiệu quả tốt nhất. Thông thường phác đồ như sau [25]:

- **Châm cứu**: Thường dùng các huyệt mệnh môn, yêu dương quan, quan nguyên, trung cực, tam âm giao, thận du, chí thất, thái uyên, túc tam lý...

Thủ thuật: Châm bổ vào các huyệt vị theo nhóm, khi nào đạt tới hiện tượng đặc khí thì mắc điện vào các cặp huyệt, tần số khoảng 14-26 lần/ phút, lưu kim 30 phút.

- **Điện châm:** Phân làm 2 nhóm huyệt cách ngày thay đổi:

+ Nhóm 01: Khí hải, quan nguyên, trung cực, thái khê, túc tam lý.

+ Nhóm 02: Mệnh môn, thận du, thứ liêu, tam âm giao.

Thủ thuật: châm bổ vào các huyệt vị theo nhóm, khi nào đạt tới hiện tượng đặc khí thì mắc điện vào các cặp huyệt, tần số khoảng 14-26 lần/ phút, lưu kim 30 phút.

1.2.3.3. Thực liệu, dưỡng sinh và điều hộ

- **Thực liệu:** Trong YHCT, thực liệu (ăn uống điều trị bệnh) cũng là một phương pháp điều trị có hiệu quả, đặc biệt là các bệnh mạn tính và cần thời gian điều trị lâu dài.

- **Dự phòng và điều hộ:**

Không sinh hoạt tình dục quá sớm, cũng không nên quá muộn mà nên vào đúng giai đoạn các chức năng tạng phủ đã phát triển thành thực, nam từ 24 tuổi là thời kỳ thích hợp nhất để có con. Không nên sinh hoạt tình dục quá nhiều, không nên uống rượu hút thuốc quá nhiều, không dùng chất kích thích. Tiêu trừ những ảnh hưởng bất lợi như tiếp xúc tia phóng xạ, thuốc độc hại và môi trường làm việc có nhiệt độ cao...[24],[28].

1.3. Tổng quan về bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị

1.3.1. Nguồn gốc bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị

Trong số rất nhiều bài thuốc cổ truyền Trung Hoa, thì Lục vị địa hoàng hoàn có lẽ được nhiều người biết đến nhất, do hiệu quả rõ rệt, được tin tưởng sử dụng nghìn năm theo suốt chiều dài lịch sử. Nhiều người tin dùng Lục vị địa hoàng hoàn để bổ thận, nhưng ít ai biết rằng ban đầu nó được sử dụng chủ yếu cho trẻ nhỏ.

Thời nhà Tống, có một danh y họ Tiền danh Ất, tự là Trọng Dương, sinh ra ở Vân Châu, Sơn Đông (nay là Đông Bình, tỉnh Sơn Đông). Tiền Ất được người đời sau suy tôn là “Ấu Khoa Chi Ty Tôn” (Ông tổ của khoa nhi).

Tiền Ất nói: “Bát vị địa hoàng hoàn của Trương Trọng Cảnh là dành cho người lớn sử dụng, trẻ em thể chất thuần dương lại non nớt, vì vậy mới bỏ đi 2 vị thuốc Nhục quế và Phụ tử trở thành Lục vị địa hoàng hoàn, để tránh việc trẻ nhỏ trong người quá nóng mà dẫn đến chảy máu cam”. Các học trò của Tiền Ất sau này biên soạn bài thuốc Lục vị địa hoàng hoàn trong cuốn sách “Tiểu Nhi Dược Chứng Trục Quyết”. Cứ như vậy Lục vị địa hoàng hoàn do Tiền Ất sáng tạo ra vẫn được lan rộng và sử dụng rộng rãi trên lâm sàng cho đến tận ngày nay.

Bài thuốc Bát vị địa hoàng hoàn trong “Kim Quỹ Yếu Lược” của Trương Trọng Cảnh, còn được gọi là “Thận Khí hoàn”, chủ yếu được sử dụng cho các chứng thận dương hư với các triệu chứng trạng lưng gối đau mỏi, nửa người dưới lạnh. Vào thời điểm đó, Tiền Ất chủ yếu sử dụng Lục vị địa hoàng hoàn để điều trị các chứng gọi là “ngũ trì” ở trẻ em như thóp chậm liền, chậm đứng, chậm đi, chậm lớn, chậm mọc răng và chậm nói. Y học cổ truyền Trung Quốc cho rằng những chứng này ở trẻ em chủ yếu là do thận âm bất túc gây ra [33]. Trải qua chiều dài lịch sử, bài thuốc Lục vị địa hoàng hoàn được ứng dụng rộng rãi và lưu truyền cho đến hiện nay vẫn còn được sử dụng mang lại nhiều kết quả tốt cũng như giá trị về mặt lý luận y học cổ truyền.

1.3.2. Thành phần bài thuốc

Bảng 1.2. Thành phần bài thuốc

Tên vị thuốc	Tên khoa học	Hàm lượng
Thục địa	<i>Radix Rehmanniae glutinosae praeparata</i>	16g
Hoài sơn	<i>Dioscorea persimilis Prain et Burkill</i>	8g
Sơn thù	<i>Fructus Corni officinalis</i>	8g
Trạch tả	<i>Rhizoma Alismatis</i>	6g
Phục linh	<i>Poria</i>	6g
Đan bì	<i>Cortex Radicis Paeoniae suffruticosae</i>	6g
Thỏ ty tử	<i>Semen Cuscutae</i>	15g
Nhục thung dung	<i>Herba Cistanches</i>	20g
Hải mã	<i>Hippocampus</i>	20g
Tổng bài thuốc		105g

- *Công năng và chủ trị phương thuốc*

Công năng: Bổ thận ích tinh, ôn thận tráng dương. Chủ trị: Thận dương hư, lưng đau mỏi gối, chân tay lạnh, hoa mắt ù tai, di tinh, liệt dương, tinh trong loãng.

- *Phân tích phương thuốc*

Thục địa tư âm bổ Thận, thêm tinh ích tủy mà sinh huyết, là chủ dược; Sơn thù ôn bổ Can Thận, thu sáp tinh khí, Sơn dược kiện Tỳ cố tinh, là “Tam bổ” trong bài thuốc, nhưng lấy Thục địa bổ Thận làm chính, Sơn thù bổ Can, Sơn dược bổ tỳ làm phụ, vì vậy liều lượng Thục địa gấp đôi vị kia; Đơn bì lương huyết thanh nhiệt mà tả hỏa ở Can Thận, giảm bớt tính ôn của Sơn dược; Trạch tả thanh tả Thận hỏa, giảm bớt tính nê trệ của Thục địa, Phục linh lợi thủy thẩm thấp, giúp Sơn dược kiện Tỳ. Đơn bì, Trạch tả, Bạch linh là “Tam tả” của bài thuốc này. Vì bài thuốc này bổ là chính nên liều lượng các vị thuốc tả dùng ít thôi. Kết hợp gia vị Nhục thung dung, Thỏ ty tử, Hải mã là 3 vị thuốc bổ dương có tác dụng bổ thận ích tinh, ôn thận tráng dương.

Các vị thuốc Nhục thung dung, Hải mã, Thỏ ty tử đã chứng minh có tác dụng cải thiện khả năng sinh tinh trong một số nghiên cứu đã có cụ thể:

Đậu Xuân Cảnh (2007): Nghiên cứu tác dụng của Hải mã và Sâm Việt Nam lên hình thái – chức năng của tinh hoàn chuột cống trắng trưởng thành. Hải mã và Sâm Việt Nam liều 120 mg/100g thể trọng chuột/24h có khả năng thúc đẩy sự hồi phục hình thái – chức năng tinh hoàn chuột cống trắng bị tổn thương do tiếp xúc với nhiệt độ cao 43 độ C trở lại bình thường, sớm hơn 15 ngày và với tốc độ nhanh hơn so với sự hồi phục tự nhiên [34].

Chen Xiao Lu, Su Qin Hu và cs (2023): Nghiên cứu dược chất Flavonoid có trong Thỏ ty tử có trong điều trị vô sinh nam bằng cách điều chỉnh sự tăng sinh và biệt hóa của tế bào Sertoli và tính toàn vẹn của hàng rào máu - tinh hoàn thông qua con đường truyền tín hiệu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase-protein kinase B (PI3K-AKT) [35].

Trần Thanh Tùng, Nguyễn Thị Giáng Hương, Nguyễn Kiều Vân và cs (2009): Đánh giá tác dụng của Nhục thung dung (*Cistanche deserticola* Y.C.Ma) trên chức

năng sinh sản chuột cống đực non, khi cho chuột uống dịch chiết Nhục thung dung hàng ngày với liều 5g/kg trong 10 ngày làm tăng trọng lượng tinh hoàn, túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper một cách có ý nghĩa thống kê so với lô chứng [36].

1.4. Tình hình nghiên cứu về suy giảm chức năng tinh hoàn trên thế giới và Việt Nam

1.4.1. Tại Việt Nam

Nguyễn Hoài Bắc, Trần Văn Kiên, Hoàng Long (2021): Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đặc điểm di truyền của những bệnh nhân vô sinh không có tinh trùng không do tắc. Kết quả cho thấy tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là $29,8 \pm 5,5$ tuổi. Tỷ lệ vô sinh nguyên phát chiếm 90,3%. Tiền sử viêm tinh hoàn do quai bị chiếm tỉ lệ 38,6%. Nồng độ hormone FSH, LH, Testosterone huyết thanh trung bình lần lượt là $31,6 \pm 16,5$ mIU/ml, $15,5 \pm 10$ mIU/ml, $12,8 \pm 7,13$ nmol/l. Bất thường NST chiếm tỉ lệ 30,7% [23].

Vũ Thị Bích Loan, Nguyễn Việt Tiến, Vũ Văn Tâm (2015): Nghiên cứu phương pháp tiêm tinh trùng trữ lạnh từ mào tinh vào bào tương noãn trong điều trị vô sinh nam. Qua nghiên cứu 89 trường hợp rã đông tinh trùng được chọc hút từ mào tinh và 79 cặp vợ chồng được thực hiện kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) với tinh trùng rã đông, một số kết luận rút ra: Tỷ lệ tinh trùng sống sau rã đông đạt 88,8%; Tỷ lệ có thai lâm sàng là 59,7%, tỷ lệ làm tổ là 19,2% [37].

Đoàn Minh Thụy (2011): Nghiên cứu tính an toàn và hiệu quả của viên nang “Hồi xuân hoàn” trong điều trị bệnh nhân bị suy giảm tinh trùng thể thận dương hư. Viên nang Hồi xuân hoàn làm tăng cả số lượng và chất lượng tinh trùng với 15,69% kết quả rất tốt (tinh dịch đồ bình thường và/ hoặc vợ có con ở một số bệnh nhân), 64,70% kết quả tốt. Ngoài ra viên nang còn tăng bài tiết Testosterone nội sinh, điều hòa bài tiết LH và FSH [38].

Vũ Ngọc Thắng (2021): Nghiên cứu độc tính và tác dụng tăng cường chức năng sinh dục đực của viên nang Trường Xuân CB trên động vật thực nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy trên mô hình thỏ đực gây suy giảm sinh sản bằng Fluconazol, viên nang Trường Xuân CB liều 180 mg/kg và 360 mg/kg đã làm tăng số lượng và chất lượng tinh trùng [39].

Quách Thị Yến (2021): Nghiên cứu sự biến đổi hình thái cấu trúc, siêu cấu trúc ống sinh tinh, tinh trùng sau uống Khang bảo tử trên bệnh nhân vô tinh. Qua nghiên cứu 198 bệnh nhân và được chia đều làm 3 nhóm, trong đó có 66 bệnh nhân được uống Khang bảo tử cho thấy khi cho bệnh nhân uống chế phẩm nghiên cứu làm tăng số lượng các tế bào dòng tinh so với nhóm không điều trị ($p < 0,001$) và tăng có ý nghĩa về số lượng tinh bào so với nhóm điều trị bằng kẽm +vitamin E ($p < 0,01$) [40].

Nguyễn Tuấn Lượng, Trịnh Hoài Nam, Trịnh Thị Hạnh, Nguyễn Văn Cường (2023): Đánh giá tác dụng cải thiện khả năng sinh tinh của viên hoàn mềm Tinh kỳ trên chuột cống trắng gây suy giảm tinh trùng bằng Natri valproat. Kết quả cho thấy viên hoàn mềm Tinh kỳ với cả 2 liều thử 4,08 g/kg/ngày và 12,24 g/kg/ngày làm tăng nồng độ Testosterone trong máu chuột lên 76,17% và 85,08% so với lô mô hình ($p < 0,05$), tăng mật độ và tăng khả năng di động của tinh trùng, giảm tỷ lệ tinh trùng có hình thái bất thường và hồi phục đường kính ống sinh tinh tốt hơn so với lô mô hình ($p < 0,05$), tương đương lô Testosterone và không có sự khác biệt giữa 2 liều thử ($p > 0,05$) [41].

Mai Phương Thanh, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Trọng Thông và cs (2020): Nghiên cứu tác dụng phục hồi của TD0014 trên chuột cống trắng bị gây suy giảm sinh sản bằng Natri Valproate cho kết quả: Viên hoàn TD0014 cả hai mức liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày và liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày đều thể hiện tác dụng đẩy nhanh sự phục hồi trọng lượng các cơ quan sinh dục, tăng nồng độ Testosterone huyết thanh, cải thiện cả số lượng và chất lượng tinh trùng, giảm mức độ tổn thương trên hình ảnh mô học tinh hoàn. Kết quả nghiên cứu trên đã chỉ ra rằng, TD0014 có tác dụng phục hồi trên mô hình gây suy giảm sinh sản bằng Natri valproate, với tác dụng mạnh hơn ở mức liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày so với mức liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày [42].

1.4.2. Trên thế giới

Song Hui (宋辉.): Điều trị vô sinh nam bằng Viên nang Shengjing trên 440 bệnh nhân vô sinh nam nhập viện từ tháng 4 năm 2012 đến tháng 4 năm 2014. Kết quả: Tổng tỷ lệ có hiệu quả của bệnh nhân ở nhóm quan sát là 96,64%, trong khi tổng tỷ lệ có hiệu quả của bệnh nhân ở nhóm đối chứng là 71,82%, so với hai nhóm

thì sự khác biệt là rõ ràng và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) [43].

- Wang Zhiyong, Wang Yuanyuan (王志勇,王缓缓) : Phân tích hiệu quả lâm sàng của châm cứu trong điều trị vô sinh nam trên 140 bệnh nhân vô sinh nam điều trị tại từ tháng 5 năm 2015 đến tháng 5 năm 2018. Kết quả phân tích được sau khi châm cứu, tỷ lệ hiệu quả của bệnh nhân đạt 94,29% [44].

- You Yi (攸毅) : Nghiên cứu tình trạng căng thẳng tình dục của 150 bệnh nhân vô sinh nam tại Viện Khoa học Y tế Khai Phong vào tháng 12 năm 2018. Kết luận: Căng thẳng tình dục phổ biến hơn ở bệnh nhân vô sinh nam, có trình độ học vấn cao hơn và số năm vô sinh dài hơn [45].

1.5. Các mô hình nghiên cứu gây suy giảm chức năng tinh hoàn trên động vật thực nghiệm

Các phương pháp được sử dụng để gây suy giảm chức năng tinh hoàn ở động vật thực nghiệm bao gồm: Mô hình gây suy giảm chức năng tinh hoàn do tuổi, do stress, do tia xạ, do thuốc/hóa chất và do đột biến. Trên cơ sở gây được các động vật có tình trạng SGCNTH, các nhà nghiên cứu sử dụng các phương pháp nghiên cứu đã trình bày trên đây nhằm đánh giá tác dụng của thuốc nghiên cứu.

1.5.1. Mô hình gây suy giảm chức năng tinh hoàn do tuổi

Loại động vật già thường được sử dụng là chuột cống đực Brown Norway (25 tháng tuổi), chuột cống đực Sprague-Dawley (9-10 tháng tuổi), chuột nhắt (22-26 tháng tuổi), thỏ (20 tháng tuổi). Đặc điểm của các loại động vật này là có tình trạng rối loạn cương, suy chức năng nội mạc mạch máu, suy giảm Testosterone do tuổi già gây ra [46].

1.5.2. Mô hình gây suy giảm chức năng tinh hoàn do stress

Stress có thể gây ức chế tổng hợp steroid ở tinh hoàn, dẫn đến giảm Testosterone. Có thể gây stress bằng cách nhốt chuột cống đực trưởng thành bất động trong buồng nhốt kích thước nhỏ (20 x 7 cm) bằng nhựa trong suốt có đục lỗ 12 tiếng/ ngày (thường là từ 6 giờ đến 18 giờ). Sau đó, đánh giá ảnh hưởng của thuốc thử trên test hành vi tình dục, test cương dương, nồng độ Testosterone....[47].

1.5.3. Mô hình gây suy giảm chức năng tinh hoàn do nhiệt

Nhiệt có thể gây tác động ức chế quá trình sinh tinh, ức chế chức năng sinh sản. Một trong những phương pháp được sử dụng để gây suy giảm sinh sản do nhiệt là cho động vật thí nghiệm (thường là chuột cống) tiếp xúc với môi trường nhiệt độ cao (40 độ C) mỗi ngày 2 giờ trong 7 ngày liên tục [48].

1.5.4. Mô hình gây suy giảm chức năng tinh hoàn do tia xạ

Chiếu xạ làm giảm quá trình sinh tinh, rối loạn hormone dẫn đến suy giảm chức năng tinh hoàn thông qua cơ chế tạo các gốc tự do. Chuột cống đực trưởng thành được chiếu xạ (tia gamma) ở vùng bìu. Chuột được dùng thuốc nghiên cứu và đánh giá tác dụng trên chức năng sinh sản, số lượng, chất lượng tinh trùng, hình thái tinh hoàn và định lượng Testosterone [49].

1.5.5. Mô hình gây suy giảm chức năng tinh hoàn do thuốc/hóa chất

Chuột cống đực trưởng thành được dùng thuốc/hóa chất gây suy giảm chức năng tinh hoàn, sau đó dùng thuốc nghiên cứu (bảo vệ hoặc phục hồi). Từ đó đánh giá ảnh hưởng của thuốc lên cấu trúc, chức năng cơ quan sinh dục. Một số thuốc/hóa chất được sử dụng để gây suy giảm chức năng tinh hoàn gồm:

- Estrogen: Tiêm bắp 500 µg/kg/ngày trong 14 ngày [50].
- Natri valproate: Uống 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần [51].
- Cyclophosphamid: Tiêm màng bụng 100 mg/kg, 1 lần duy nhất; hoặc tiêm màng bụng 15 mg/kg, 1 tuần 1 lần, trong 4 tuần [52].

1.5.6. Mô hình gây suy giảm chức năng tinh hoàn do đột biến

Một số mô hình gây suy giảm chức năng tinh hoàn trên động vật thực nghiệm bằng đột biến di truyền bao gồm: Đột biến gen GnRH vùng dưới đồi, đột biến mất receptor đáp ứng với androgen, đột biến chuyển đoạn gen, đột biến điểm do hóa chất. Những nghiên cứu trên các chủng chuột di truyền này cho phép đánh giá sâu sắc hơn tác dụng riêng biệt của từng loại hormone đối với chức năng sinh sản ở nam giới.

Mô hình gây suy giảm chức năng tinh hoàn do đột biến gen có độ chính xác và độ tin cậy cao, tuy nhiên ở Việt Nam chưa phổ biến và yêu cầu nhiều trang thiết bị kèm theo tốn kém về mặt kinh phí.

Trong luận án này, nhóm nghiên cứu sử dụng Natri valproate gây suy giảm chức năng tinh hoàn cho chuột cống đực trưởng thành, sau đó đánh giá các chỉ số nghiên cứu trực tiếp trên chuột cống đực.

Chương 2

CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, nguyên vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu

Bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị Nhục thung dung, Thỏ ty tử, Hải mã các vị thuốc đạt tiêu chuẩn dược điển Việt Nam 5 và đạt tiêu chuẩn cơ sở.

Bảng 2.1. Thành phần bài thuốc

Tên vị thuốc	Tên khoa học	Hàm lượng
Thục địa	<i>Radix Rehmanniae glutinosae praeparata</i>	16g
Hoài sơn	<i>Dioscorea persimilis Prain et Burkill</i>	8g
Sơn thù	<i>Fructus Corni officinalis</i>	8g
Trạch tả	<i>Rhizoma Alismatis</i>	6g
Phục linh	<i>Poria</i>	6g
Đan bì	<i>Cortex Radicis Paeoniae suffruticosae</i>	6g
Thỏ ty tử	<i>Semen Cuscutae</i>	15g
Nhục thung dung	<i>Herba Cistanches</i>	20g
Hải mã	<i>Hippocampus</i>	20g
Tổng bài thuốc		105g

2.1.2 Quy trình sản xuất dịch chiết của bài thuốc nghiên cứu

- Bài thuốc với các dược liệu đạt tiêu chuẩn dược điển Việt Nam V, được cân theo tỷ lệ của các dược liệu trong thang thuốc, được chiết xuất với dung môi nước, đóng chai 500ml. Dịch chiết được chiết xuất từ bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị có tỉ lệ 1:1 (1ml dịch chiết tương đương 1g dược liệu của bài thuốc). Quá trình chiết xuất được thực hiện tại công ty cổ phần Dược phẩm Phú Tín. Từ dịch chiết 1:1 thuốc được cô đặc về dịch chiết 5:1 (1ml dịch chiết tương đương 5g dược liệu của bài thuốc), sau đó được pha loãng với nước cất đến tỷ lệ thích hợp để cho chuột uống.

- Liều dùng: được tính theo gram dược liệu/kg/ngày. Theo Viện Dược liệu, có rất nhiều cách tính liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm, tuy nhiên phương pháp đơn giản nhất là tính liều có hiệu quả tương đương dựa vào diện tích

bề mặt cơ thể của các loài động vật khác nhau và của người. Khi đã tính liều theo diện tích bề mặt cơ thể, thì bất kỳ là người cao to, hoặc lùn bé, hoặc trẻ em, đều chỉ dùng một liều duy nhất giống nhau, tính theo một đơn vị diện tích bề mặt cơ thể. Cũng như vậy, liều cho các con vật nhỏ như chuột nhắt trắng, chuột cống trắng; con vật trung bình như mèo, thỏ, khỉ; con vật lớn hơn như chó, cho đến người, cũng vẫn dùng một liều duy nhất giống nhau [53]. Mối tương quan của liều dùng giữa các con vật khác nhau và người tính theo 1 kg thể trọng được trình bày ở bảng 2.2

Bảng 2.2. Hệ số quy đổi liều dùng có hiệu quả tương đương giữa các loài động vật và người

Từ \ Sang	Chuột nhắt trắng	Chuột cống trắng	Thỏ	Chó	Người
Chuột nhắt trắng	1	1/2	1/4	1/7	1/12
Chuột cống trắng	2	1	1/2	1/4	1/7
Thỏ (Khỉ, mèo)	4	2	1	3/5	1/3
Chó	7	4	5/3	1	1/2
Người	12	7	3	2	1

Liều dự kiến sử dụng trên người là 01 thang/người/ngày, tương ứng 105 g/người/ngày. Tính quân bình một người 50 kg thì liều dùng dự kiến trên người sẽ là 2,1 g/kg/ngày. Quy đổi theo hệ số quy đổi từ người sang động vật thực nghiệm, liều tương đương trên chuột cống với hệ số quy đổi là 07 thì liều dự kiến có tác dụng trên chuột cống là 14,7 g/kg/ngày. Liều tương đương trên chuột nhắt với hệ số quy đổi là 12 thì liều dự kiến có tác dụng trên chuột nhắt là 25,2 g/kg/ngày.

2.1.3. Đối tượng nghiên cứu

Động vật do Ban chăn nuôi động vật thí nghiệm - HVQY cung cấp, được nuôi trong phòng nuôi động vật thí nghiệm một tuần trước khi nghiên cứu bằng thức ăn chuẩn dành cho động vật nghiên cứu, nước sạch uống tự do, đảm bảo tiêu chuẩn nghiên cứu.

Chuột nhắt trắng trưởng thành, dòng Swiss, cả 2 giống, cân nặng 18 - 22g, tổng số 50 con.

Chuột cống trắng trưởng thành, chủng Wistar, giống đực, cân nặng từ 160 đến 180g, số lượng 50 con.

Các chuột khỏe mạnh được đánh giá gồm: Lông mượt, mắt trong, hậu môn khô, hoạt động, vận động bình thường, ăn uống bình thường, chất thải bình thường. Việc lựa chọn chuột nghiên cứu được tiến hành bởi 2 kỹ thuật viên có nhiều kinh nghiệm. Sau khi lựa chọn xong, trực tiếp cán bộ nghiên cứu kiểm tra, đánh giá lại.

Chuột thí nghiệm được cho ăn thức ăn theo tiêu chuẩn thức ăn cho động vật nghiên cứu, nước sạch đun sôi để nguội uống tự do. Hàng ngày theo dõi ghi chép diễn biến kết quả thí nghiệm.



*Chuột cống trắng trưởng thành,
chủng Wistar, giống đực,*



*Chuột nhắt trắng trưởng thành, dòng
Swiss, cả 2 giống,*

Hình 2.1. Chuột nhắt trắng và chuột cống trắng sử dụng trong nghiên cứu

2.1.4. Phương tiện nghiên cứu

- Máy phân tích tinh trùng tự động IVOS II của hãng Hamilton Thorne xuất xứ Hoa Kỳ.
- Máy định lượng nồng độ Testosterone, nồng độ FSH Immulite 1000, của hãng Siemens, xuất xứ Hoa Kỳ.
- Kính hiển vi Olympus CH 30 (Nhật), có gắn camera và phần mềm chuyên dụng để chụp ảnh và ghi hình hoạt động tinh trùng chuột.
- Cân phân tích 10^{-4} , model CP224S (Sartorius - Đức).
- Bộ dụng cụ mô động vật cỡ nhỏ.
- Kim cong đầu tù dùng cho chuột uống thuốc, sản xuất tại Nhật Bản.
- Các dụng cụ thí nghiệm khác.

2.1.5. Hóa chất nghiên cứu

- Testosterone undecanoate ống tiêm 25 mg/ml, biệt dược Tesmon, do công ty Tai Yu Chemical & Pharma Co.,Ltd sản xuất.
- Kit test định lượng Testosterone, định lượng FSH do hãng DRG instruments GmbH sản xuất tại Đức.
- Natri valproate (biệt dược Depakine), dung dịch thuốc uống, chai 40 ml, chứa Natri valproate 200 mg/1ml, do công ty Sanofi- Aventis sản xuất.
- Ketamin, dung dịch tiêm 10 mg/ml.
- Cồn 70 độ, betadine.
- Nước cất pha tiêm của Công ty Cổ phần Dược Vật tư y tế Hải Dương sản xuất.
- Các hóa chất xét nghiệm và làm tiêu bản mô bệnh học.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá độc tính cấp

Nghiên cứu độc tính cấp và xác định LD₅₀ của thuốc thử trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon và theo hướng dẫn của WHO [49]. Trước khi tiến hành thí nghiệm, cho chuột nhịn ăn qua đêm.

Chuột được chia ngẫu nhiên thành các lô khác nhau, mỗi lô 10 con. Cho chuột uống dung dịch thuốc thử với liều tăng dần trong cùng một thể tích. Tìm liều cao nhất không gây chết chuột (0%), liều thấp nhất gây chết chuột hoàn toàn (100%) và các liều trung gian.

** Mô tả kỹ thuật cho chuột uống thuốc*

- Chuột được cho uống cưỡng bức bằng kim cong đầu tù chuyên dụng. Kỹ thuật cho chuột uống cưỡng bức được mô tả như sau:

- Cố định chuột bằng một tay. Hai ngón trỏ và ngón cái túm chặt da gáy chuột, đuôi chuột được kẹp vào giữa các ngón tay còn lại.

- Hút thuốc (hoặc nước cất) vào xilanh đến thể tích xác định (thông qua tính toán lượng thuốc cho uống).

- Tay còn lại dùng bơm tiêm có gắn kim đầu tù đã được hút đủ lượng thuốc (hoặc nước cất), khéo léo đưa đầu kim luôn thẳng từ miệng chuột vào đến dạ dày chuột.

- Bơm nước cất hoặc thuốc nghiên cứu vào thẳng dạ dày chuột theo liều đã xác định.



Hình 2.2. Chuột uống thuốc bằng kim đầu tù

- ***Chỉ tiêu theo dõi đánh giá kết quả***

- Theo dõi các biểu hiện nhiễm độc sớm:

- + Theo dõi tình trạng chung của chuột, quá trình diễn biến bắt đầu và có dấu hiệu nhiễm độc (như nôn, co giật, kích động, bài tiết...), khả năng và thời gian hồi phục và số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc.

- + Tất cả chuột chết (nếu có) được mổ để đánh giá tổn thương đại thể và xác định nguyên nhân gây độc.

- + Tìm liều cao nhất không gây chết chuột, liều thấp nhất gây chết 100% số chuột và các liều trung gian, số chuột chết ở các liều trung gian (nếu có).

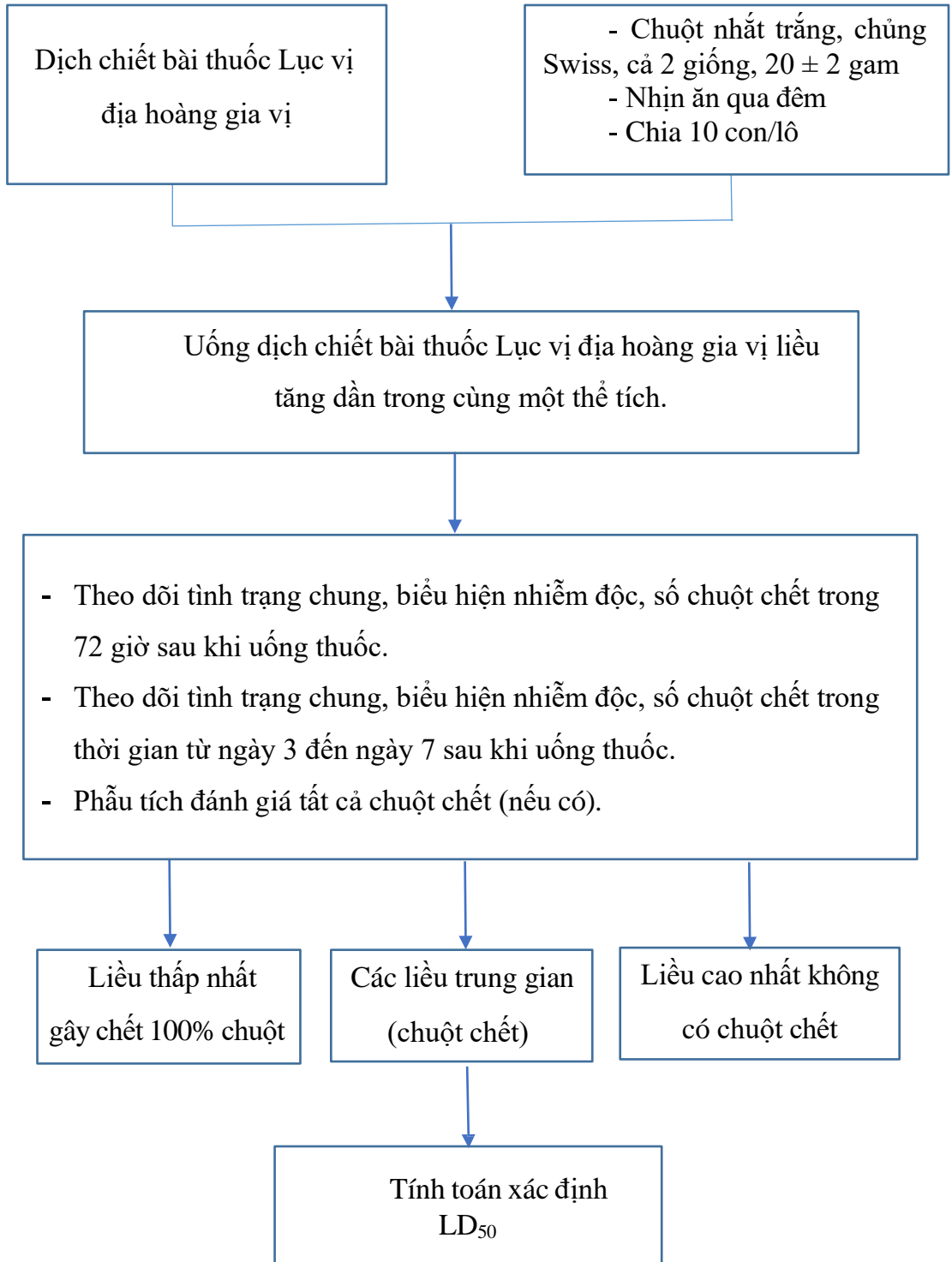
Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính (sử dụng giấy probit hoặc phần mềm excel) để xác định LD₅₀ của mẫu thử.

- Theo dõi các biểu hiện nhiễm độc muộn và khả năng hồi phục các biểu hiện nhiễm độc:

- + Tiếp tục theo dõi tình trạng của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống dịch chiết bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị. Các chỉ tiêu theo dõi tương tự như theo dõi trong 72 giờ đầu.

Tiến hành phẫu tích quan sát tình trạng các tạng ngay sau khi có chuột chết để xác định nguyên nhân gây độc.

*** Quy trình nghiên cứu**



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu độc tính cấp

2.2.2. Đánh giá tác dụng sinh tinh của chế phẩm trên chuột cống trắng đực gây suy giảm chức năng tinh hoàn bằng Natri valproate.

Natri valproate là một thuốc chống động kinh được sử dụng rộng rãi. Trên cơ quan sinh sản, Natri valproate đã được chứng minh làm giảm nồng độ Testosterone máu trên chuột thực nghiệm [51],[54]. Nhiều nghiên cứu về độc tính sinh sản của Natri valproate cũng cho thấy Natri valproate làm giảm các chỉ số sinh sản như làm giảm số lượng tinh trùng ở đuôi mào tinh, giảm độ di động của tinh trùng, thay đổi hình thái và cấu trúc của tinh trùng cũng như tinh hoàn [51],[54].

Chính vì thế, trong nghiên cứu này Natri valproate được sử dụng như một tác nhân gây suy giảm chức năng tinh hoàn cho chuột thực nghiệm, trên cơ sở đó đánh giá tác dụng sinh tinh của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị.

Trước khi tiến hành nghiên cứu, chuột được nuôi dưỡng trong phòng thí nghiệm của Bộ môn Dược lý - Học viện Quân y ít nhất một tuần.

Chuột cống đực trưởng thành, được chia ngẫu nhiên thành 5 lô nghiên cứu, mỗi lô 10 con.

+ Lô 1 (chứng sinh lý): Không gây SGCNTH, uống nước cất.

+ Lô 2 (lô mô hình): Gây SGCNTH, uống nước cất.

+ Lô 3 (lô tham chiếu): Gây SGCNTH, uống Testosterone undecanoat liều 16 mg/kg/ngày.

+ Lô 4 (lô trị 1): Gây SGCNTH, uống mẫu thử liều 14,7 g/kg/ngày.

+ Lô 5 (lô trị 2): Gây SGCNTH, uống mẫu thử liều 29,4 g/kg/ngày.

Các lô chuột gây SGCNTH bằng uống Natri valproate liều 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần. Chuột ở lô không gây SGCNTH được cho uống nước cất với cùng thể tích trong 7 tuần.

Chế phẩm nghiên cứu và thuốc tham chiếu được cho uống trong thời gian 6 tuần, bắt đầu tại thời điểm sau khi kết thúc 7 tuần uống Natri valproate.

Sau 6 tuần điều trị, chuột được gây mê nhẹ bằng Ketamin 90 mg/ml/kg tiêm phúc mạc để lấy máu đo nồng độ Testosterone; nồng độ FSH huyết thanh chuột, lấy

tinh dịch của chuột để đánh giá mật độ tinh trùng; mức độ di động của tinh trùng; làm tiêu bản hình thái tinh trùng; xác định tỷ lệ các tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường. Sau đó, chuột được giết bằng cách gây mê quá liều bằng Ketamin 150 mg/ml/kg tiêm phúc mạc, nhanh chóng bóc tách lấy các cơ quan sinh dục (tinh hoàn, mào tinh hoàn, túi tinh, tuyến Cowper, đầu dương vật, tuyến tiền liệt, cơ nâng hậu môn) đem cân trọng lượng để xác định trọng lượng các cơ quan sinh dục trên 100g khối lượng cơ thể. Tinh hoàn sau khi đem cân nhanh chóng làm tiêu bản đánh giá các biến đổi mô bệnh học tinh hoàn, đo kích thước đường kính ống sinh tinh. Các bước lấy máu, lấy tinh dịch, làm tiêu bản phải tiến hành nhanh chóng, yêu cầu thực hiện các bước lấy mẫu không quá một giờ tránh ảnh hưởng sai lệch đến kết quả nghiên cứu.

** Lấy máu định lượng nồng độ Testosterone, nồng độ FSH huyết thanh*

Cố định chuột trên bàn phẫu thuật nhỏ tư thế ngửa. Chọc kim qua lồng ngực lấy máu ở tim. Máu để đông tự nhiên, ly tâm lấy huyết thanh để định lượng Testosterone, nồng độ FSH huyết thanh.



Hình 2.3. Kỹ thuật chọc kim lấy máu ở tim chuột

** Phân tích tinh trùng*

Bộc lộ tinh hoàn và mào tinh hoàn, cô lập mào tinh và để ngay vào 0,2ml dung dịch F10 nuôi tinh trùng. Nhẹ nhàng nặn ép lấy tinh trùng từ đuôi mào tinh, tinh trùng vẫn được nuôi dưỡng trong môi trường F10. Dung dịch thu được từ quá trình nặn ép tinh trùng ra trong môi trường F10 này được xem là tinh dịch của chuột.

Cho tinh dịch của chuột thu được theo cách ở trên vào tủ ấm 37⁰C trong 10 phút để ly giải (làm hóa lỏng tinh dịch).

- Đánh giá mật độ và khả năng di động của tinh trùng

+ Xác định mật độ tinh trùng

Là số lượng tinh trùng tính trên 1ml. Cách tiến hành như sau: dùng potanh pha loãng bạch cầu (pha loãng 1/20) hút tinh dịch đến vạch 0,5 sau đó hút tiếp dung dịch NaHCO₃ 5% đến vạch 11. Lắc đều nhỏ lên buồng đếm Neubauer và đếm tại các khu vực như đếm bạch cầu. Tính kết quả như đếm bạch cầu trong máu và kết quả cuối cùng sẽ là số lượng tinh trùng tính trên 1ml tinh dịch.

+ Xác định tinh trùng di động tiến tới

Là tỉ lệ các tinh trùng di động đi theo hướng nhất định trên tiêu bản soi tươi. Đầu tiên, hút 1 giọt tinh dịch lên lam, đặt lam kính và quan sát ở vật kính 10 để xem mật độ, tùy thuộc vào lượng tinh trùng nhiều hay ít mà ta sẽ ước lượng độ pha loãng. Sau đó ta sẽ nhỏ 1 giọt nước muối sinh lý lên lam khác, hút 1 lượng tinh dịch (nhiều hay ít phụ thuộc vào bước sơ bộ trên) trộn đều chúng sau đó đặt lam kính và quan sát ở vật kính 40. Việc pha loãng giúp cho ta đếm được dễ dàng hơn. Tiến hành đếm trong ba vi trường, ghi số lượng tinh trùng di động trong tổng số tinh trùng ở mỗi vi trường đếm được sau đó lấy trị số trung bình. Tinh trùng di động tiến tới còn được phân ra thành tiến tới nhanh và tiến tới chậm. Những tinh trùng tiến tới nhanh sẽ di chuyển hết một thân tinh trùng trong 1s.

+ Xác định tinh trùng di động không tiến tới

Cách làm như di động tiến tới nhưng đếm các tinh trùng đứng lắc lư 1 chỗ hoặc di động theo vòng tròn.

+ Xác định tinh trùng không di động.

Làm như trên nhưng đếm các tinh trùng đứng im không chuyển động.

Trên vi trường các di động tiến tới (nhanh và chậm), di động không tiến tới và không di động được đếm, sau đó chia tỉ lệ từng loại trên tổng đã đếm. Thông thường người làm xét nghiệm sẽ lần lượt đếm hết các tinh trùng không di động, sau đó đếm

sang tinh trùng di động không tiến tới và cuối cùng đếm tinh trùng di động tiến tới. Đồng thời, sử dụng camera quay lại hình ảnh tinh trùng dưới kính hiển vi, sau đó phân tích đọc kiểm tra lại kết quả phân tích tinh trùng bằng người đọc trên máy tính.

- Đánh giá hình thái tinh trùng: Lấy một lượng nhỏ tinh trùng trong môi trường F10 ở trên cho cố định trên lam kính bằng dung dịch methanol 96%, sau đó nhuộm Papanicolaou. Tiêu bản hình thái tinh trùng được quan sát dưới kính hiển vi vật kính x100 để xác định hình thái và phát hiện những cấu trúc bất thường ở đầu, cổ hay đuôi tinh trùng.

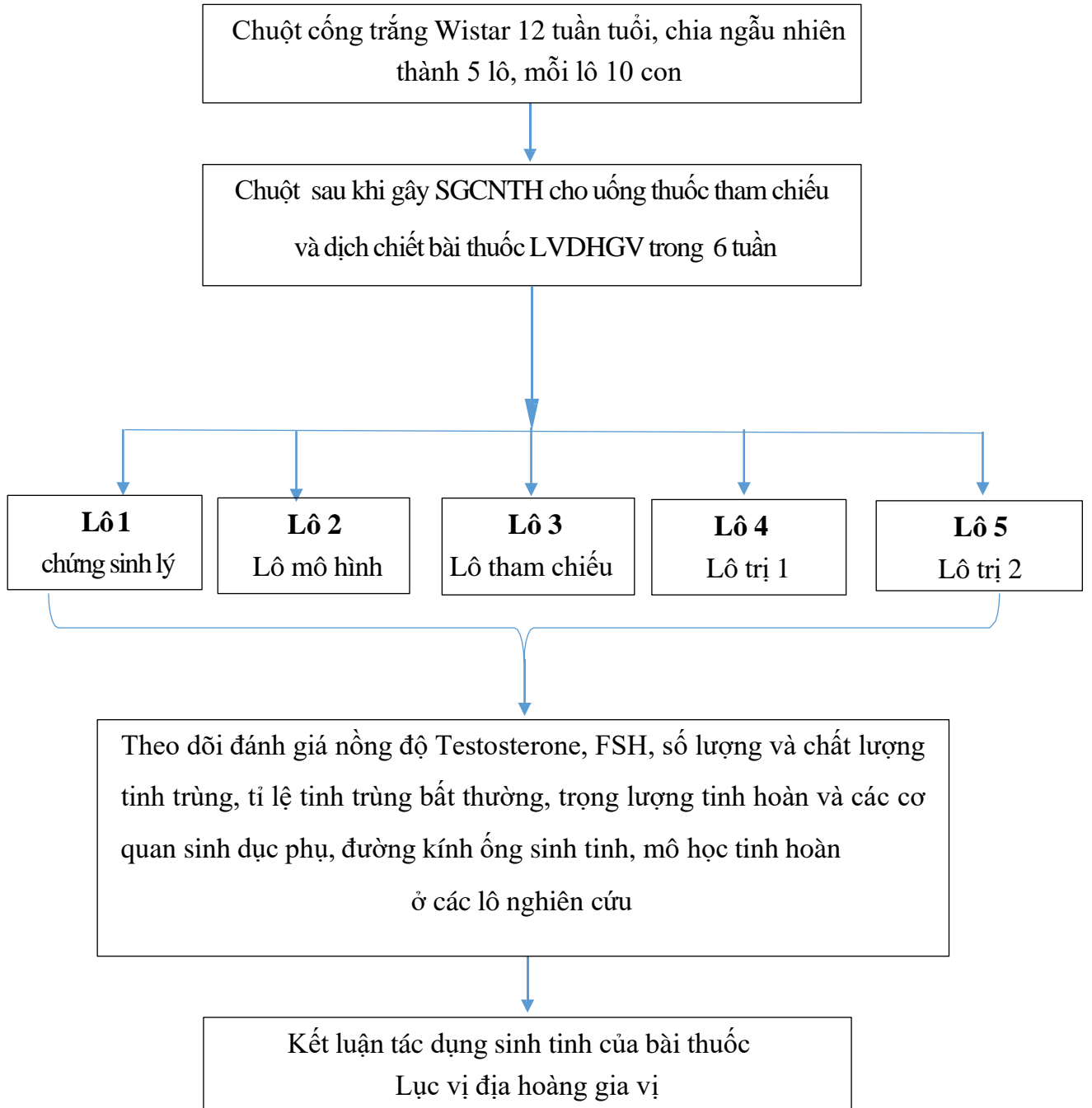
* *Bóc tách các cơ quan sinh dục (tinh hoàn, túi tinh, tuyến Cowper, đầu dương vật, tuyến tiền liệt, cơ nâng hậu môn) đánh giá cân nặng*

Bộ lộ các cơ quan sinh dục (tinh hoàn, mào tinh hoàn, túi tinh, đầu dương vật, cơ nâng hậu môn, tuyến Cowper, tuyến tiền liệt), bóc tách nhẹ nhàng, cắt ra và đặt ngay lên tờ giấy lọc có tấm nước muối sinh lý ở trong các đĩa petri để tránh khô. Bóc tách sạch phần tổ chức xung quanh, dùng giấy thấm khô dịch trước khi cho vào đĩa cân. Cân trọng lượng các cơ quan sinh dục của từng con chuột trên cân có độ chính xác 0,1 mg và ghi lại kết quả, xác định cân nặng của các cơ quan sinh dục trên 100 g thể trọng.

* *Làm tiêu bản đánh giá sự thay đổi tổ chức học tinh hoàn.*

Tinh hoàn sau khi cân xong được cho ngay trong dung dịch Bouin để bảo quản và làm tiêu bản đánh giá sự thay đổi tổ chức học tinh hoàn chuột. Đúc khối parafin. Cắt lát mỏng có độ dày 5 μm , trải lên lam kính và đem nhuộm Hematoxyline - Eosin (HE). Các tiêu bản sau khi nhuộm HE được đọc trên kính hiển vi quang học, người nhận định kết quả không biết lô chuột nào là lô dùng thuốc, lô nào là lô chứng.

* *Quy trình nghiên cứu*



Sơ đồ 2.2. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng sinh tinh của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị

2.3. Xử lý số liệu

Dữ liệu được lưu trữ, phân tích bằng phần mềm SPSS 16.0 và được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn $\bar{X} \pm SD$. Mẫu được kiểm định bằng T test để so sánh sự khác biệt giữa các lô. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

2.4. Thời gian và địa điểm thực hiện

- Thời gian thực hiện đề tài từ tháng 3 năm 2024 đến tháng 9 năm 2024.
- Địa điểm thực hiện: Bộ môn Dược lý - Viện Đào tạo Dược - Học viện Quân y.

2.5. Đạo đức trong nghiên cứu

- Nghiên cứu được tiến hành sau khi được Hội đồng thông qua đề cương của Học viện Y - Dược học cổ truyền Việt Nam và thông qua.

- Nghiên cứu được thực hiện trên chuột cống trắng và chuột nhắt trắng, số lượng động vật sử dụng trong các mô hình thí nghiệm được hạn chế ở mức tối thiểu, đủ để thu được kết quả đảm bảo độ tin cậy và đủ xử lý thống kê.

- Các số liệu, thông tin thu thập được chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu, không phục vụ cho mục đích nào khác.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp

3.1.1. Kết quả đánh giá biểu hiện độc tính sớm (72 giờ sau uống thuốc)

Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả đánh giá độc tính sớm (72 giờ sau uống thuốc) của mẫu thử ở các lô nghiên cứu (n=10 ở mỗi lô)

Lô chuột	Liều dùng (g/kg thể trọng)	Thể tích cho uống	Trong 72 giờ đầu sau uống thuốc	
			Số chuột có biểu hiện bất thường	Số chuột sống/chết
Lô 1	60 g/kg	20 mL/kg x 3 lần	Không	10/0
Lô 2	120 g/kg	20 mL/kg x 3 lần	Không	10/0
Lô 3	180 g/kg	20 mL/kg x 3 lần	Không	10/0
Lô 4	240 g/kg	20 mL/kg x 3 lần	Không	10/0
Lô 5	300 g/kg	20 mL/kg x 3 lần	Không	10/0

Nhận xét:

Chuột được cho uống dịch chiết bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị với các mức liều từ 60g/kg thể trọng đến 300g/kg thể trọng. Theo dõi sát sau uống thuốc 72 giờ đầu sau uống thuốc, tất cả các chuột ở tất cả các lô nghiên cứu đều không thấy có biểu hiện bất thường cũng như không thấy có chuột chết.

3.1.2. Kết quả đánh giá biểu hiện độc tính muộn (từ ngày 4 đến ngày 7 sau uống thuốc)

Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.2.

Bảng 3.2. Kết quả đánh giá độc tính muộn (từ ngày 4 đến ngày 7) sau uống thuốc) ở các lô nghiên cứu (n=10 ở mỗi lô)

Lô chuột	Liều dùng (g/kg thể trọng)	Thể tích cho uống	Từ ngày 4 đến ngày 7 sau uống thuốc	
			Số chuột có biểu hiện bất thường	Số chuột sống/chết
Lô 1	60 g/kg	20 mL/kg x 3 lần	Không	10/0
Lô 2	120 g/kg	20 mL/kg x 3 lần	Không	10/0
Lô 3	180 g/kg	20 mL/kg x 3 lần	Không	10/0
Lô 4	240 g/kg	20 mL/kg x 3 lần	Không	10/0
Lô 5	300 g/kg	20 mL/kg x 3 lần	Không	10/0

Nhận xét:

Tiếp tục theo dõi chuột trong thời gian từ ngày 4 đến ngày 7 sau uống dịch chiết bài thuốc, tất cả các chuột ở tất cả các lô nghiên cứu đều không thấy có biểu hiện bất thường cũng như không thấy có chuột chết.

Như vậy chuột đã uống đến liều 300 g/kg thể trọng mà không thấy có biểu hiện độc tính. So với mức liều quy đổi từ liều dùng trên người sang chuột nhất trắng (25,2 g/kg/ngày), chuột đã được cho uống với liều gấp trên 10 lần liều lâm sàng quy đổi. Với mức liều này nhưng chưa quan sát thấy có độc tính chứng tỏ thuốc nghiên cứu là an toàn trong thử nghiệm độc tính cấp.

3.2. Kết quả nghiên cứu tác dụng sinh tinh của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị trên thực nghiệm

3.2.1. Tác dụng của mẫu thử lên nồng độ Testosterone huyết thanh chuột

Kết quả tác dụng của bài thuốc lên nồng độ Testosterone trong huyết thanh chuột được trình bày trong bảng 3.3

Bảng 3.3. Nồng độ Testosterone huyết thanh chuột**(n = 10 ở mỗi lô, $\bar{X} \pm SD$)**

Lô nghiên cứu	Nồng độ Testosterone huyết thanh (ng/ml)	% tăng giảm	Giá trị p
Lô 1 (chứng sinh lý) (1)	3,19 ± 1,63	-	$p_{2-1} < 0,01$ $p_{4,5-2} < 0,05$ $p_{3-2} < 0,01$ $p_{3,4,5-1} > 0,05$ $p_{4,5-3} > 0,05$ $p_{4-5} > 0,05$
Lô 2 (mô hình) (2)	1,59 ± 0,94	Giảm 50,02 % so với chứng sinh lý	
Lô 3 (tham chiếu) (3)	3,15 ± 1,37	Tăng 97,61 % so với lô mô hình	
Lô 4 (Lô trị 1) (4)	2,45 ± 0,89	Tăng 54,15 % so với lô mô hình	
Lô 5 (Lô trị 2) (5)	2,99 ± 1,27	Tăng 87,69 % so với lô mô hình	

Nhận xét:

- Nồng độ Testosterone huyết thanh ở lô 2 (lô mô hình) giảm rõ rệt so với ở lô 1 (chứng sinh lý), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

Natri valproate cho uống liều 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần đã gây suy giảm rõ rệt nồng độ Testosterone huyết thanh trên chuột.

- Nồng độ Testosterone huyết thanh ở các lô 3, 4, 5 tăng có ý nghĩa thống kê so với ở lô 2 (lô mô hình) ($p_{4,5-2} < 0,05$; $p_{3-2} < 0,01$) và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 1 (chứng sinh lý) ($p_{3,4,5-1} > 0,05$).

- So sánh giữa các lô 3, 4, 5 cho thấy không có khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.2. Tác dụng của mẫu thử lên nồng độ FSH huyết thanh chuột

Kết quả tác dụng lên nồng độ FSH trong huyết thanh chuột được trình bày trong bảng 3.4

Bảng 3.4. Nồng độ FSH huyết thanh chuột
(n = 10 ở mỗi lô, $\bar{X} \pm SD$)

Lô nghiên cứu	Nồng độ FSH huyết thanh (mIU/ml)	% tăng giảm	Giá trị p
Lô 1 (chứng sinh lý) (1)	2,88 ± 0,36	-	<p>p₂₋₁ < 0,05 p_{4,5-2} < 0,05 p₃₋₂ < 0,05 p_{3,4,5-1} > 0,05 p_{4,5-3} > 0,05 p₄₋₅ > 0,05</p>
Lô 2 (mô hình) (2)	3,46 ± 0,55	Tăng 20,01 % so với chứng sinh lý	
Lô 3 (tham chiếu) (3)	2,90 ± 0,52	Giảm 16,27 % so với lô mô hình	
Lô 4 (Lô trị 1) (4)	2,99 ± 0,42	Giảm 13,67 % so với lô mô hình	
Lô 5 (Lô trị 2) (5)	2,93 ± 0,51	Giảm 15,37 % so với lô mô hình	

Nhận xét:

- Nồng độ FSH huyết thanh ở lô 2 (lô mô hình) tăng có ý nghĩa thống kê so với ở lô 1 (chứng sinh lý) (p < 0,05).

Natri valproate cho uống liều 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần đã gây ảnh hưởng làm tăng nồng độ FSH huyết thanh trên chuột.

- Nồng độ FSH huyết thanh ở các lô 3, 4, 5 giảm so với ở lô 2 (lô mô hình) (p < 0,05) và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 1 (chứng sinh lý) (p > 0,05).

- So sánh giữa các lô 3, 4, 5 không có khác biệt có ý nghĩa thống kê (p > 0,05).

3.2.3. Tác dụng của bài thuốc lên số lượng và chất lượng tinh trùng chuột

3.2.3.1. Tác dụng của bài thuốc lên mật độ tinh trùng

Kết quả tác dụng của bài thuốc lên mật độ tinh trùng của các lô chuột được trình bày trong bảng 3.5

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của bài thuốc lên mật độ tinh trùng**(n = 10 ở mỗi lô, $\bar{X} \pm SD$)**

Lô nghiên cứu		Mật độ tinh trùng ($\times 10^6/\text{mL}$)	% tăng giảm	Giá trị p
Lô 1 (chứng sinh lý)	(1)	81,69 \pm 18,54	-	$p_{1,3,4,5-2} < 0,001$ $p_{3,4,5-1} > 0,05$ $p_{4,5-3} > 0,05$ $p_{4-5} > 0,05$
Lô 2 (mô hình)	(2)	44,72 \pm 15,47	Giảm 45,26% so với chứng sinh lý	
Lô 3 (tham chiếu)	(3)	71,75 \pm 17,37	Tăng 60,44% so với lô mô hình	
Lô 4 (Lô trị 1)	(4)	74,21 \pm 17,06	Tăng 65,94% so với lô mô hình	
Lô 5 (Lô trị 2)	(5)	77,69 \pm 17,25	Tăng 73,72% so với lô mô hình	

Nhận xét:

- Mật độ tinh trùng ở lô 2 (lô mô hình) giảm rõ rệt so với ở lô 1 (chứng sinh lý), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Natri valproate cho uống liều 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần đã gây giảm rõ rệt mật độ tinh trùng trên chuột.

- Mật độ tinh trùng ở các lô 3, 4, 5 tăng rõ rệt so với ở lô 2 (lô mô hình) ($p < 0,001$) và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 1 (chứng sinh lý) ($p > 0,05$).

- So sánh giữa các lô 3, 4, 5 mật độ tinh trùng chuột ở các lô này chưa thấy có khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.3.2. Tác dụng của bài thuốc lên mức độ di động của tinh trùng

Kết quả tác dụng của bài thuốc lên mức độ di động của tinh trùng được trình bày trong bảng 3.6

Bảng 3.6. Mức độ di động của tinh trùng**(n = 10 ở mỗi lô, $\bar{X} \pm SD$)**

Lô nghiên cứu	Tỉ lệ đánh giá mức độ di động (%)			
	Tiến tới nhanh	Tiến tới chậm	Không tiến tới	Không di động
Lô 1 (chứng sinh lý) (1)	36,86 ± 8,28	4,67 ± 1,36	6,99 ± 1,79	51,49 ± 10,41
Lô 2 (mô hình) (2)	21,51 ± 5,57	7,39 ± 3,02	9,95 ± 2,60	61,15 ± 6,44
Lô 3 (tham chiếu) (3)	32,95 ± 4,74	4,75 ± 1,72	6,95 ± 2,32	55,34 ± 5,03
Lô 4 (Lô trị 1) (4)	34,08 ± 6,85	4,62 ± 1,55	7,38 ± 1,97	53,91 ± 8,04
Lô 5 (Lô trị 2) (5)	35,23 ± 6,99	5,09 ± 1,69	7,15 ± 1,67	52,53 ± 7,70
Giá trị p	p ₂ < 0,01 p _{3,4,5-1} > 0,05 p _{4,5-3} > 0,05 p ₄₋₅ > 0,05	p ₂ < 0,05 p _{3,4,5-1} > 0,05 p _{4,5-3} > 0,05 p ₄₋₅ > 0,05	p ₂ < 0,05 p _{3,4,5-1} > 0,05 p _{4,5-3} > 0,05 p ₄₋₅ > 0,05	p ₂ < 0,05 p _{3,4,5-1} > 0,05 p _{4,5-3} > 0,05 p ₄₋₅ > 0,05

Nhận xét:

- Chuột ở lô 2 có tỷ lệ tinh trùng tiến tới nhanh giảm rõ rệt có ý nghĩa thống kê so với lô 1 ($p < 0,01$), trong khi đó tỉ lệ tinh trùng tiến tới chậm, không tiến tới, không di động ở lô 2 tăng có ý nghĩa thống kê so với lô 1 ($p < 0,05$).

Natri valproate cho uống liều 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần đã gây suy giảm rõ rệt mức độ di động của tinh trùng các chuột nghiên cứu.

- Chuột ở các lô 3, 4, 5 có tỉ lệ tinh trùng tiến tới nhanh tăng cao rõ rệt so với lô 2 (lô mô hình), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 1 (chứng sinh lý) ($p > 0,05$); trong khi đó các tỉ lệ tinh trùng không tiến tới, tiến tới chậm và không di động giảm so với lô 2 (lô mô hình) ($p < 0,05$).

- So sánh giữa các lô 3, 4, 5 tỷ lệ tinh trùng tiến tới nhanh, tiến tới chậm, không tiến tới và không di động không có khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.3.3. Tác dụng của bài thuốc đến tỷ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường

Kết quả tác dụng của bài thuốc đến tỷ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường được trình bày trong bảng 3.7

Bảng 3.7. Tỷ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường

(n = 10 ở mỗi lô, $\bar{X} \pm SD$)

Lô nghiên cứu	Tỷ lệ % tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường	% tăng giảm	P giữa các lô
Lô 1 (chứng sinh lý) (1)	8,55 ± 2,23	-	$p_{1,3,4,5-2} < 0,01$ $p_{3,4,5-1} > 0,05$ $p_{4,5-3} > 0,05$ $p_{4-5} > 0,05$
Lô 2 (mô hình) (2)	15,49 ± 4,84	Tăng 81,24 % so với chứng sinh lý	
Lô 3 (tham chiếu) (3)	10,53 ± 2,43	Giảm 32,01 % so với lô mô hình	
Lô 4 (Lô trị 1) (4)	10,20 ± 3,05	Giảm 34,16 % so với lô mô hình	
Lô 5 (Lô trị 2) (5)	9,61 ± 2,59	Giảm 37,96 % so với lô mô hình	

Nhận xét:

- Tỷ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường ở lô 2 (lô mô hình) tăng rõ rệt so với ở lô 1 (chứng sinh lý), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

Natri valproate cho uống liều 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần đã làm tăng tỷ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường của chuột nghiên cứu.

- Tỷ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường ở các lô 3, 4, 5 giảm có ý nghĩa thống kê so với ở lô 2 (lô mô hình) ($p < 0,01$) và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 1 (chứng sinh lý) ($p > 0,05$).

- So sánh tỷ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường giữa các lô 3, 4, 5, lô 3 có tỷ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường cao hơn so với 2 lô dùng bài thuốc, tuy nhiên chưa thấy có khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.3.4. Tác dụng của bài thuốc lên trọng lượng các cơ quan sinh dục chuột cống trắng đực

Kết quả tác dụng của bài thuốc lên trọng lượng các cơ quan sinh dục chuột cống trắng đực được trình bày ở bảng 3.8

Bảng 3.8. Trọng lượng của các cơ quan sinh dục chuột

($n = 10$ ở mỗi lô, $\bar{X} \pm SD$)

Lô nghiên cứu		Trọng lượng cơ quan sinh dục (g/100g thể trọng)						
		Tinh hoàn	Mào tinh hoàn	Túi tinh	Tuyến tiền liệt	Tuyến cowper	Đầu dương vật	Cơ nâng hậu môn
Lô 1 (1)	$\bar{X} \pm SD$	0,884 $\pm 0,152$	0,265 $\pm 0,035$	0,236 $\pm 0,052$	0,120 $\pm 0,029$	0,030 $\pm 0,014$	0,039 $\pm 0,016$	0,348 $\pm 0,058$
Lô 2 (2)	$\bar{X} \pm SD$	0,675 $\pm 0,159$	0,213 $\pm 0,025$	0,163 $\pm 0,036$	0,102 $\pm 0,012$	0,027 $\pm 0,011$	0,035 $\pm 0,016$	0,281 $\pm 0,038$
	p_{2-1}	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,01
Lô 3 (3)	$\bar{X} \pm SD$	0,855 $\pm 0,168$	0,248 $\pm 0,041$	0,210 $\pm 0,052$	0,106 $\pm 0,019$	0,028 $\pm 0,015$	0,036 $\pm 0,012$	0,325 $\pm 0,046$
	p_{3-1}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	p_{3-2}	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05
Lô 4 (4)	$\bar{X} \pm SD$	0,846 $\pm 0,197$	0,252 $\pm 0,048$	0,209 $\pm 0,037$	0,109 $\pm 0,029$	0,029 $\pm 0,013$	0,037 $\pm 0,015$	0,330 $\pm 0,053$
	p_{4-1}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	p_{4-2}	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05
Lô 5 (5)	$\bar{X} \pm SD$	0,860 $\pm 0,211$	0,257 $\pm 0,042$	0,212 $\pm 0,044$	0,111 $\pm 0,035$	0,028 $\pm 0,014$	0,038 $\pm 0,015$	0,336 $\pm 0,062$
	p_{5-1}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	p_{5-2}	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05

Nhận xét:

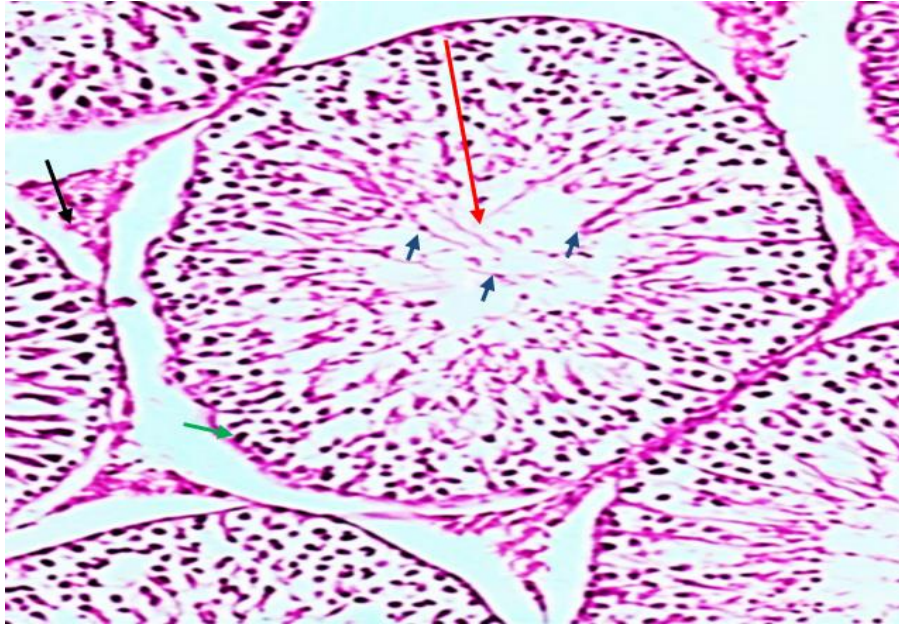
- Trọng lượng tinh hoàn, mào tinh hoàn, túi tinh, cơ nâng hậu môn của chuột ở lô mô hình (lô 2) có giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý (lô 1) ($p < 0,05$). Trọng lượng các cơ quan này ở lô 4 và lô 5 dùng bài thuốc đều tăng so với lô mô hình ($p < 0,05$), tương đương với lô tham chiếu và hồi phục về tương đương với lô chứng sinh lý ($p > 0,05$).

- Trọng lượng dương vật, tuyến tiền liệt, và tuyến cowper ở các lô thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.4. Tác dụng của bài thuốc lên mô học tinh hoàn chuột cống trắng đực

3.2.4.1. Tác dụng của bài thuốc lên hình ảnh mô học tinh hoàn chuột

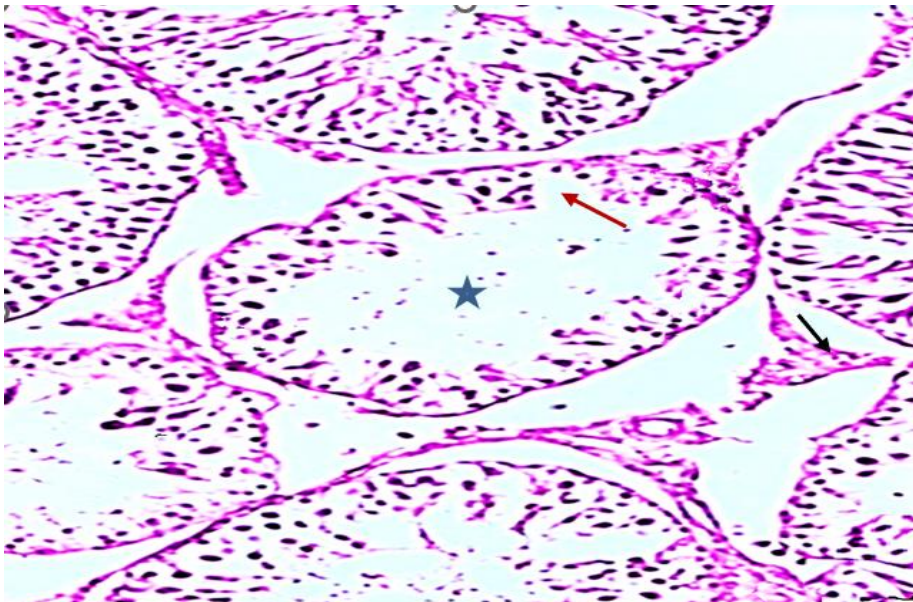
Hình ảnh mô học tinh hoàn chuột ở các lô nghiên cứu được trình bày ở hình dưới đây



Hình 3.1. Hình ảnh mô học tinh hoàn (chuột 08, lô chứng), H.E x 200.

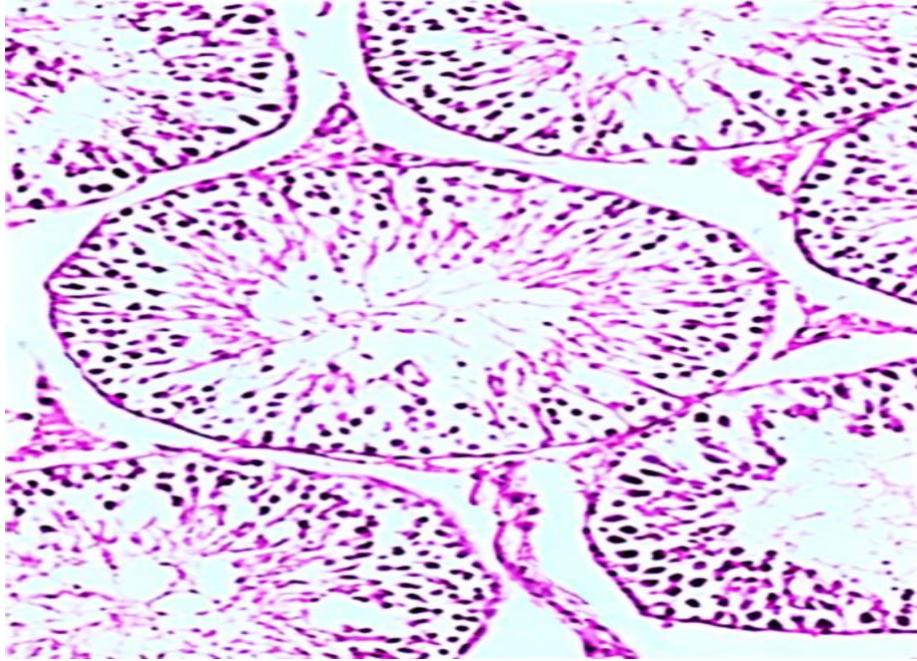
Cấu trúc ống sinh tinh được lót trong bởi các tế bào sinh tinh và được ngăn cách bởi mô kẽ.

1. Mô kẽ với tế bào Leydig (mũi tên đen);
2. Ống sinh tinh (mũi tên màu đỏ);
3. Tinh nguyên bào (mũi tên màu xanh lá cây);
4. Tinh trùng (mũi tên màu xanh nước biển).

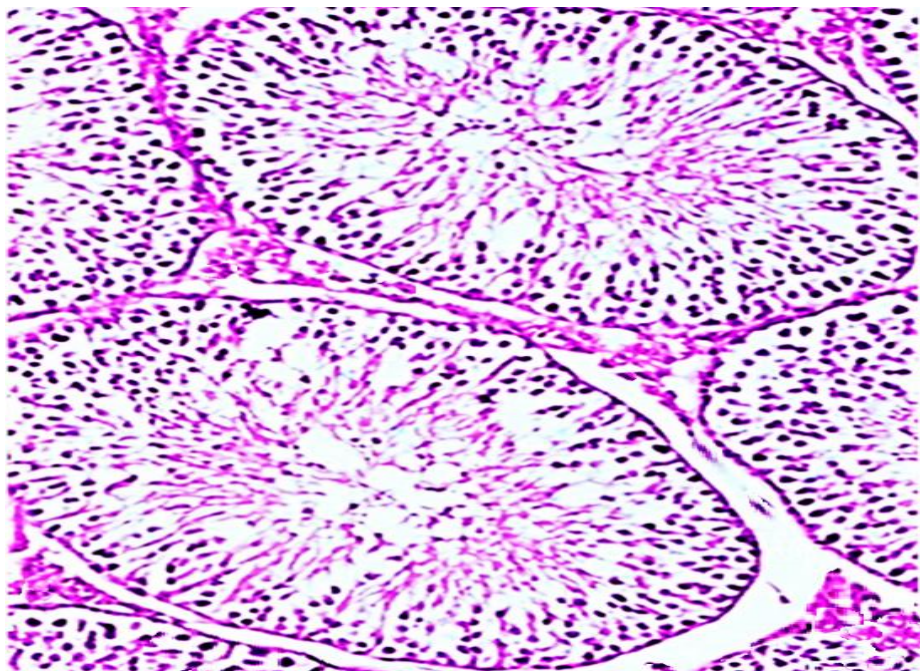


Hình 3.2. Hình ảnh mô học tinh hoàn (chuột 12, lô mô hình), H.E x 200.

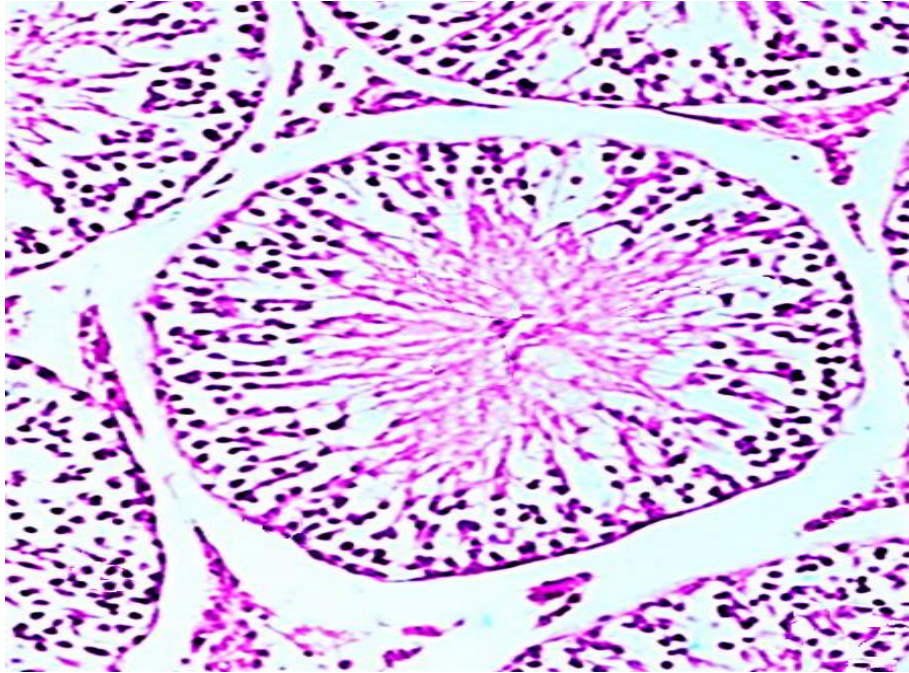
1. Ống sinh tinh teo nhỏ, giảm đáng kể các tế bào sinh tinh (mũi tên nâu);
2. Hầu như không có tinh trùng trong lòng ống sinh tinh (hình sao);
3. Tế bào Leydig bị teo (mũi tên đen).



Hình 3.3. Hình ảnh mô học tinh hoàn (chuột 27, lô tham chiếu), H.E x 200
Cấu trúc ống sinh tinh, các tế bào sinh tinh hồi phục về gần như tương đương so với lô chứng



Hình 3.4. Hình ảnh mô học tinh hoàn (chuột 36, lô trị 1), H.E x 200
Cấu trúc ống sinh tinh, các tế bào sinh tinh hồi phục về gần như tương đương so với lô chứng



Hình 3.5. Hình ảnh mô học tinh hoàn (chuột 45, lô trị 2), H.E x 200

Cấu trúc ống sinh tinh, các tế bào sinh tinh hồi phục về gần như tương đương so với lô chứng

Nhận xét:

Ở lô chứng sinh lý: Các ống sinh tinh có cấu trúc bình thường, được lót trong bởi các tế bào sinh tinh và được ngăn cách bởi mô kẽ có chứa các tế bào Leydig bình thường.

Ở lô mô hình: Các ống sinh tinh kích thước giảm (teo nhỏ), giảm đáng kể các tế bào sinh tinh và hầu như không có tinh trùng trong lòng ống sinh tinh. Tế bào Leydig ở mô kẽ cũng bị teo nhỏ.

Ở các lô dùng bài thuốc (lô 4, lô 5) và lô tham chiếu: Kích thước và hình ảnh các ống sinh tinh gần tương tự như ở lô chứng. Cấu trúc ống sinh tinh, các tế bào sinh tinh hồi phục về gần như tương đương so với lô chứng.

3.2.4.2. Tác dụng của bài thuốc lên đường kính ống sinh tinh

Kết quả tác dụng của bài thuốc lên đường kính ống sinh tinh được trình bày ở bảng 3.9

Bảng 3.9. Đường kính ống sinh tinh của các lô nghiên cứu

Lô nghiên cứu	Đường kính ống sinh tinh (μm)	% tăng giảm	P giữa các lô
Lô 1 (chứng sinh lý) (1)	129,55 \pm 14,47	-	$p_{1,3,4,5-2} < 0,01$ $p_{3,4,5-1} > 0,05$ $p_{4,5-3} > 0,05$ $p_{4-5} > 0,05$
Lô 2 (mô hình) (2)	115,20 \pm 8,51	Giảm 11,07% so với chứng sinh lý	
Lô 3 (tham chiếu) (3)	124,82 \pm 10,30	Tăng 8,35% so với lô mô hình	
Lô 4 (Lô trị 1) (4)	125,45 \pm 11,56	Tăng 8,90% so với lô mô hình	
Lô 5 (Lô trị 2) (5)	126,68 \pm 12,12	Tăng 9,96% so với lô mô hình	

Nhận xét:

- Đường kính ống sinh tinh ở lô mô hình giảm có ý nghĩa thống kê so với ở lô chứng sinh lý ($p < 0,05$). Natri valproate gây độc lên cơ quan sinh sản chuột cống đực, làm giảm đường kính ống sinh tinh đo được trên hình ảnh mô bệnh học tinh hoàn của chuột nghiên cứu.

- So với lô mô hình, các lô dùng bài thuốc (lô trị 1, lô trị 2) có đường kính ống sinh tinh tăng có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Bài thuốc làm tăng đường kính ống sinh tinh có ý nghĩa thống kê so với lô gây bệnh không dùng thuốc.

- So với lô tham chiếu, đường kính ống sinh tinh ở 2 lô dùng bài thuốc (lô 4 và lô 5) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Bài thuốc ở hai mức liều dùng có tác dụng làm hồi phục đường kính ống sinh tinh tương đương với lô tham chiếu.

- So với lô chứng sinh lý, đường kính ống sinh tinh ở 2 lô dùng bài thuốc không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Bài thuốc ở hai mức liều dùng có tác dụng làm hồi phục đường kính ống sinh tinh về tương đương với lô chứng sinh lý ($p > 0,05$).

So sánh giữa 2 lô dùng bài thuốc, lô 5 có đường kính ống sinh tinh cao hơn lô 4, tuy nhiên không có ý nghĩa thống kê.

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Về độc tính cấp

Bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị được Thầy Đoàn Quang Huy sáng tạo và đề xuất với tác dụng cải thiện khả năng sinh tinh ở các trường hợp điều trị suy giảm chức năng tinh hoàn. Xác định độc tính cấp và LD₅₀ để đánh giá mức độ độc của bài thuốc và có cơ sở chọn liều thử tác dụng cho các bước nghiên cứu tiếp theo. Do là bài thuốc đúc kết từ kinh nghiệm cá nhân, không phải bài thuốc cổ phương nên theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới và Bộ Y tế Việt Nam, bài thuốc này cần phải đánh giá độc tính cấp trên động vật thực nghiệm trước khi đưa vào thử nghiệm trên người [55].

Trong nghiên cứu này, chuột nghiên cứu được lựa chọn bao gồm cả chuột đực và chuột cái, vì thế kết quả nghiên cứu sẽ bao hàm cho cả 2 giống. Đường dự kiến sử dụng trên người là đường uống, do đó độc tính cấp của bài thuốc được thiết kế để thử nghiệm theo đường uống. Chuột được cho uống dịch chiết bài thuốc theo phương pháp cho uống cưỡng bức bằng kim cong đầu tù. Với phương pháp cho uống cưỡng bức bằng kim cong đầu tù, thuốc được đưa thẳng vào dạ dày chuột, nhờ đó lượng thuốc chuột uống được xác định chính xác. Tuy nhiên đây là một kỹ thuật đòi hỏi phải thao tác thuần thục để tránh tổn thương cho chuột. Thao tác này có thể gây tổn hại đường thực quản dạ dày gây xuất huyết hoặc thủng dạ dày hoặc có thể đưa nhầm thuốc vào đường hô hấp gây sặc thuốc, suy hô hấp làm chuột chết. Ngoài ra thao tác bắt chuột nếu thực hiện không tốt sẽ gây tổn thương chuột, thậm chí có thể làm chết chuột. Vì vậy, thao tác cho chuột uống thuốc trong nghiên cứu này đã được tiến hành bởi các kỹ thuật viên có kinh nghiệm của Bộ môn Dược lý, Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân y nhằm giảm thiểu tai biến kỹ thuật và cho kết quả có độ tin cậy.

Việc theo dõi đánh giá tình trạng chung của chuột, cũng như số chuột chết ở mỗi lô đòi hỏi phải theo dõi thường xuyên liên tục, tránh việc để sót các dấu hiệu bị

độc. Khi tiến hành công việc theo dõi này, nhóm nghiên cứu luôn phân thành ca với mỗi ca ít nhất có 2 người theo dõi và việc theo dõi được tiến hành liên tục. Việc phẫu tích chuột được chuẩn bị sẵn sàng để nếu có chuột chết cần phải tiến hành phẫu tích ngay nhằm đánh giá nguyên nhân gây chết chuột. Các nguyên nhân gây chết chuột có thể là do độc tính của thuốc như gây kích thích thần kinh làm chuột co giật, suy hô hấp và chết; hoặc gây suy gan, suy thận; nhưng cũng có thể do đi lỏng nhiều gây rối loạn điện giải mà chết; do tắc ruột; do tổn thương gây chảy máu trong... Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của bài thuốc cho thấy chuột ở tất cả các lô nghiên cứu không có chuột nào bị chết nên cũng loại trừ được các nguyên nhân kể trên.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy chuột đã uống đến liều 300 g/kg thể trọng mà không thấy có biểu hiện độc tính. Vì đây là liều tối đa có thể cho chuột uống nên mức liều 300 g/kg thể trọng được xem là liều dung nạp tối đa của bài thuốc trong nghiên cứu độc tính cấp. Chưa xác định được LD50 của bài thuốc, nói cách khác LD50 của bài thuốc lớn hơn nhiều so với liều 300 g/kg thể trọng. So với mức liều dự kiến có tác dụng quy đổi từ liều dùng trên người sang chuột nhắt trắng (25,2 g/kg/ngày), liều dung nạp tối đa gấp trên $300/25,2 = 11,9$ lần. Như vậy, LD50 cũng lớn gấp rất nhiều lần so với liều dự kiến có tác dụng. Với mức liều 300 g/kg thể trọng, cao gấp 11,9 lần liều dự kiến chưa quan sát thấy có độc tính cũng như không có chuột chết chứng tỏ bài thuốc nghiên cứu là an toàn trong thử nghiệm độc tính cấp.

Kết quả nghiên cứu được xem là phù hợp về mặt lý luận tính an toàn của các thành phần dược liệu trong bài thuốc. Bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị gồm có 9 vị thuốc, trong đó lấy nguyên phương là bài Lục vị địa hoàng thang, đây là bài thuốc cổ phương kinh điển đã được sử dụng từ rất lâu đời chứng minh tính an toàn và không gây độc. Ba vị thuốc gia giảm thêm là Nhục thung dung, Hải mã, Thỏ ty tử đều chưa thấy có báo cáo về độc tính trong y văn hay các bài nghiên cứu đánh giá về dược lý hiện đại. Theo y học cổ truyền, xem xét sự cân đối trong bài thuốc về tính hàn nhiệt, ta thấy bài thuốc có các vị thuốc Thục địa, Sơn dược, Sơn thù, Thỏ

ty tử, Nhục thung dung, Hải mã là các vị thuốc tính ôn, Trạch tả và Đan bì là các vị thuốc có tính hàn, còn lại Phục linh có tính bình. Do đó tổng thể bài thuốc này có thiên hướng ôn âm, hoàn toàn phù hợp với tác dụng ôn thận ích tinh, bổ thận tráng dương. Bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị lấy tư bổ can thận làm gốc, tam bổ gồm Thục địa tư bổ thận âm, ích tinh tủy, Sơn thù tư thận, ích can. Sơn dược tư thận ích tỳ, cộng lại ba âm cùng được bổ, cùng hiệu bổ thận trị gốc, tam tả gồm Trạch tả phối ngũ với Thục địa mà tả thận giáng trọc. Đan bì phối ngũ với Sơn thù để tả can hoá, Phục linh phối ngũ với Sơn dược mà thẩm thấp của tỳ. Ba vị tả sẽ ngăn ngừa sự ứ trệ do các vị tư bổ gây nên, lấy ba vị thuốc trên có tác dụng bổ, ba vị thuốc dưới có tác dụng tả nên phương thuốc vừa bổ âm, vừa ngăn ngừa sự ứ trệ do các vị thuốc bổ gây nên. Khi kết hợp cùng 3 vị thuốc bổ dương là Thỏ ty tử, Nhục thung dung, Hải mã sẽ cùng có công dụng bổ thận ích tinh, ôn thận tráng dương. Bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị với các thành phần dược liệu ít độc, được phối kết hợp với nhau hợp lý theo lý luận của y học cổ truyền, tạo nên bài thuốc có tính an toàn về mặt lý luận cũng như thực tiễn nghiên cứu thực nghiệm của chúng tôi.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các nghiên cứu khác đã thực hiện trước đó với các vị thuốc có trong bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị, và trên thực tế lâm sàng các vị thuốc trong bài thuốc cũng đã được sử dụng từ rất lâu đời chứng minh tính an toàn và không gây độc.

4.2. Về tác dụng cải thiện khả năng sinh tinh của bài thuốc lục vị địa hoàng gia vị

4.2.1. Về mô hình nghiên cứu

Mô hình gây bệnh trên động vật thực nghiệm có vai trò quan trọng trong nghiên cứu đánh giá tác dụng của chế phẩm. Các phương pháp được sử dụng để gây suy giảm chức năng tinh hoàn ở động vật thực nghiệm bao gồm: Gây SGCNTH do đột biến gen; gây SGCNTH bằng nhiệt [48]; gây SGCNTH bằng stress [47]; gây SGCNTH bằng tia xạ [49]; gây SGCNTH bằng thuốc/hóa chất, thường dùng là Natri valproate [50],[51],[52]; gây SGCNTH trên chuột già [46]. Mô hình gây suy

giảm chức năng tinh hoàn do đột biến gen có độ chính xác và độ tin cậy cao, tuy nhiên mô hình này chưa thấy được áp dụng và tiến hành trong nghiên cứu ở Việt Nam. Các mô hình gây SGCNTH bằng stress, gây SGCNTH bằng chế độ ăn, gây SGCNTH trên chuột già thường đòi hỏi kỹ thuật phức tạp, thời gian kéo dài, động vật thường có nhiều bệnh lý hoặc rối loạn khác kèm theo. Các mô hình gây SGCNTH bằng nhiệt, bằng hóa chất, bằng tia xạ thường gây ra tình trạng suy giảm chức năng tinh hoàn nặng, thường kèm theo suy giảm miễn dịch, suy chức năng một số cơ quan khác, có thể dẫn đến tử vong. Ngoài mô hình nghiên cứu được thực hiện trên chuột cống trắng đực, có thể tiến hành nghiên cứu trên các động vật khác, như thỏ... Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng mô hình gây suy giảm chức năng tinh hoàn trên chuột cống trắng bằng Natri valproate [51]. Natri valproate là một thuốc chống động kinh được sử dụng rộng rãi trên lâm sàng [56]. Natri valproate có thể gây ảnh hưởng đến chức năng sinh sản với đích tác dụng của thuốc là từ vùng dưới đồi – tuyến yên, gây ra bệnh cảnh suy giảm chức năng tinh hoàn gắn với bệnh lý suy giảm chức năng tinh hoàn của nam giới [56]. Theo Bairy và cs. (2010), Natri valproate liều 200 mg/kg/ngày và 400 mg/kg/ngày cho chuột cống trắng uống liên tục trong 60 ngày đã làm giảm rõ số lượng tinh trùng lấy từ đuôi mào tinh, độ di động của tinh trùng, tăng tỉ lệ tinh trùng có hình thái bất thường và làm thoái hóa nặng các tế bào biểu mô của tinh hoàn [54]. Theo nghiên cứu của Nishimura và cs. (2000), khi dùng Natri valproate liều 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần làm giảm các chỉ số sinh sản, cũng như làm giảm số lượng tinh trùng, giảm tốc độ di động của tinh trùng, thay đổi hình thái và cấu trúc tinh hoàn của chuột cống đực trưởng thành [51]. Trong nghiên cứu này chúng tôi cũng dùng Natri valproate liều 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần để gây suy giảm chức năng tinh hoàn cho chuột thực nghiệm, trên cơ sở đó đánh giá tác dụng sinh tinh của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị trên động vật thực nghiệm.

Nhiều tác giả ở Việt Nam cũng đã đánh giá ảnh hưởng của các chế phẩm nghiên cứu trên chuột cống đực gây suy giảm chức năng tinh hoàn bằng Natri valproate, như nghiên cứu của Đậu Thùy Dương [58], Nguyễn Thanh Hương [59]...

Chính vì thế, trong nghiên cứu này Natri valproate được sử dụng như một tác nhân gây suy giảm chức năng tinh hoàn cho chuột thực nghiệm, trên cơ sở đó đánh giá tác dụng sinh tinh của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị.

Nhóm thuốc tham chiếu chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu là Testosterone undecanoate, chúng tôi sử dụng thuốc tham chiếu này để có cơ sở so sánh với mẫu thử là dịch chiết của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị. Testosterone undecanoate là nhóm thuốc thường được sử dụng trong liệu pháp bổ sung Testosterone, dùng để điều trị cho tình trạng suy tuyến sinh dục nam (male hypogonadism), khi tình trạng suy giảm Testosterone được xác định bằng triệu chứng lâm sàng và xét nghiệm sinh hóa. Mục đích của liệu pháp bổ sung Testosterone là phục hồi nồng độ Testosterone về giới hạn sinh lý bình thường ở bệnh nhân nam có nồng độ Testosterone thấp kèm theo các triệu chứng suy giảm Testosterone; từ đó cải thiện các chỉ số đánh giá chức năng sinh dục như số lượng và chất lượng tinh trùng, sức mạnh cơ và mật độ khoáng của xương [57]. Do đó trong nghiên cứu này chuột sau khi gây mô hình suy giảm chức năng tinh hoàn bằng Natri valproate, chúng tôi sử dụng Testosterone undecanoate là nhóm thuốc tham chiếu với chế phẩm nghiên cứu là hợp lí.

4.2.2. Về tác dụng cải thiện khả năng sinh tinh của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị

* Bàn luận về kết quả ảnh hưởng của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị lên nồng độ Testosterone huyết thanh chuột và trong lưong các cơ quan sinh dục của chuột.

Ở bảng 3.3 khi cho chuột uống Natri valproate liều 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần đã gây suy giảm rõ rệt nồng độ Testosterone huyết thanh trên chuột. Ở lô 2 (lô mô hình) nồng độ Testosterone giảm 50,02 % so với lô 1 (chứng sinh lý) với $p < 0,01$. Do đó Natri valproate là tác nhân gây suy giảm nồng độ Testosterone trong huyết thanh chuột.

Dịch chiết bài thuốc LVĐHGV với liều 14,7 g/kg/ngày và 29,4 g/kg/ngày cho chuột uống 6 tuần làm tăng nồng độ Testosterone trong huyết thanh chuột lên 54,15 % và 87,69 % so với lô mô hình (bảng 3.3). Nồng độ Testosterone huyết thanh chuột ở các lô 3, 4, 5 đều tăng có ý nghĩa thống kê so với ở lô 2 (lô mô hình) ($p_{4,5-2} < 0,05$; $p_{3-2} < 0,01$). Đặc biệt chuột ở lô 3 uống Testosterone undecanoat liều 16 mg/kg/ngày tăng nhiều nhất ($3,15 \pm 1,37$), tiếp theo là lô 5 uống bài thuốc liều 29,4

g/kg/ngày ($2,99 \pm 1,27$) và cuối cùng là lô 4 uống bài thuốc liều $14,7\text{g/kg/ngày}$ ($2,45 \pm 0,89$). Kết quả trên chứng tỏ dịch chiết của bài thuốc cả ở liều tương đương và liều gấp 2 lần đều có tác dụng tăng nồng độ Testosterone của chuột. So sánh giữa hai lô dùng bài thuốc, lô 5 có chỉ số Testosterone tăng cao hơn so với lô 4, chứng tỏ thuốc có xu hướng đáp ứng theo mức liều. Tuy nhiên sự khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Theo một nghiên cứu của Tian Wang, Chen Chen và cs (2015), thành phần hoạt chất có trong Nhục thung dung là Phenylethanoid glycoside được phát hiện bằng phương pháp quang phổ Ultra Violet (UV), chất này làm tăng nồng độ Progesterone và Testosterone trong huyết thanh chuột khi cho chuột uống Nhục thung dung với liều $0,4\text{ g/kg/ngày}$ và $0,8\text{ g/kg/ngày}$ [59]. Một nghiên cứu khác của Mundijo T., Suyatna F.D và cs (2023) cho thấy chiết xuất cá ngựa (*Hippocampus comes* L.) cải thiện chất lượng tinh trùng, nồng độ Testosterone ở chuột cống trắng đực gây suy giảm chức năng tinh hoàn bằng DepoMedroxy Progesterone Acetate, là một loại thuốc tránh thai có thể làm giảm nồng độ Testosterone, như đã xảy ra với chứng suy giảm chức năng tinh hoàn [60],[61]. Tác dụng tăng nồng độ Testosterone của cá ngựa được Young Mee Kim, You Jin Jeon và cs (2016) chứng minh trên thực nghiệm khi thủy phân và mô tả đặc tính của hai peptide hoạt tính sinh học là Alcalase hydrolysate (ALC) và Pepsin hydrolysate (PEP) thu được từ cá ngựa. Các thủy phân có nguồn gốc từ cá ngựa này đã điều chỉnh đáng kể biểu hiện của cyclin D và cyclin E và làm tăng sự phát triển tế bào và mức Testosterone trong dòng tế bào Leydig của chuột [62]. Mặt khác theo y học cổ truyền Nhục thung dung có công dụng tráng dương, tư âm, ích tinh, lại sinh huyết, Hải mã có công dụng bổ thận tráng dương, đây là 2 vị bổ dương chủ đạo làm tăng kích thích của nội tiết tố sinh dục, tuy nhiên người xưa đã nói “thiên bổ dương dã tất vu âm trung cầu dương”, tức là để bổ dương tất phải bổ dương trong âm, do đó các vị bổ dương khi kết hợp với các vị thuốc bổ âm như Thục địa, Hoài sơn, Sơn thù để bổ âm dẫn dương, khi kết hợp lại càng hiệu quả. Do đó bài thuốc Lục địa hoàng gia vị có tác dụng làm tăng nồng độ Testosterone rõ rệt phù hợp về mặt y học cổ truyền.

Để đánh giá chỉ tiêu ảnh hưởng bài thuốc nghiên cứu lên trọng lượng các cơ quan sinh dục (tinh hoàn, mào tinh hoàn, túi tinh, tuyến cowper, đầu dương vật, tuyến tiền liệt, cơ nâng hậu môn), chúng tôi bóc lột các cơ quan sinh dục, bóc tách nhẹ nhàng, cắt ra và đặt ngay lên tờ giấy lọc có tẩm nước muối sinh lý ở trong các đĩa petri để tránh khô. Bóc tách sạch phần tổ chức xung quanh rồi tiến hành cân trọng lượng các cơ quan sinh dục của từng con chuột trên cân có độ chính xác 0,1 mg. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.8 có thể thấy ở lô 5 dùng bài thuốc liều 29,4 g/kg/ngày, trọng lượng tinh hoàn, mào tinh hoàn, túi tinh, cơ nâng hậu môn của chuột tăng cao nhất, song so sánh sự thay đổi trọng lượng các cơ quan này của lô 4 và lô 5 chưa thấy có sự khác biệt rõ ràng khi tăng liều gấp đôi liều tương đương. Trọng lượng các cơ quan này ở hai lô dùng bài thuốc (lô 4 và lô 5) đều tăng so với ở lô mô hình ($p < 0,05$), tương đương với lô tham chiếu và hồi phục về tương đương với lô chứng sinh lý ($p > 0,05$). Đối với trọng lượng dương vật, tuyến tiền liệt và tuyến cowper ở các lô thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Kết quả trên chứng tỏ bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị dùng trên chuột liều 29,4 g/kg/ngày và liều 14,7 g/kg/ngày làm tăng trọng lượng của tinh hoàn, mào tinh hoàn, túi tinh, cơ nâng hậu môn, tuy nhiên lại không tác dụng rõ rệt lên trọng lượng dương vật, tuyến tiền liệt và tuyến cowper của chuột thực nghiệm.

Như đã trình bày ở trên, trong các cơ quan nghiên cứu bao gồm túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn - hành hang, đầu dương vật, các cơ quan này có sự phát triển phụ thuộc nhiều vào hoạt động của androgen. Testosterone ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp protein của các cơ quan sinh dục phụ. Ở đây, Testosterone biến đổi thành Dehydrotestosterone, sau đó Dehydrotestosterone sẽ liên kết với các receptor ở màng tế bào đích, từ đây phức hợp này sẽ kích thích hàng loạt các phản ứng tổng hợp protein trong tế bào đích, làm tăng sinh tế bào đích dẫn đến tăng trọng lượng. Theo hướng dẫn của OECD, khi khối lượng của ít nhất hai trong số năm cơ quan trên tăng lên có ý nghĩa thống kê so với các lô chuột không dùng thuốc thì thuốc được coi là có hoạt tính androgen [63]. Kết quả trên cho thấy dịch chiết bài thuốc LVĐHGV với liều 14,7 g/kg/ngày và liều 29,4 g/kg/ngày làm tăng trọng lượng của tinh hoàn, mào tinh hoàn, túi tinh, cơ nâng hậu môn của chuột.

Vì vậy có thể khẳng định dịch chiết của bài thuốc LVĐHGV liều 14,7 g/kg/ngày và liều 29,4 g/kg/ngày có hoạt tính adrogen trên chuột cống đực.

* Bàn luận về kết quả ảnh hưởng của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị lên nồng độ FSH trong huyết thanh chuột.

Kết quả ở bảng 3.4 cho thấy nồng độ FSH huyết thanh ở lô 2 (lô mô hình) tăng có ý nghĩa thống kê so với ở lô 1 (chứng sinh lý) ($p < 0,05$). Do đó khi cho chuột uống Natri valproate liều 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần đã gây ảnh hưởng làm tăng nồng độ FSH huyết thanh trên chuột.

Kết quả đánh giá về chỉ tiêu ảnh hưởng lên nồng độ FSH, bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị làm giảm khá rõ rệt, cụ thể kết quả ở bảng 3.4 cho thấy khi cho chuột uống thuốc cả ở liều tương đương 14,7 g/kg/ngày và liều 29,4 g/kg/ngày đều có tác dụng giảm nồng độ FSH của chuột, với liều cao 29,4 g/kg/ngày giảm 15,37% so với lô mô hình và liều 14,7 g/kg/ngày giảm 13,67% so với lô mô hình.

Chúng tôi cho rằng dịch chiết bài thuốc LVĐHGV có thể đã tác động gián tiếp vào cơ chế điều hòa ngược âm tính của trục vùng hạ đồi - tuyến yên - tuyến sinh dục thông qua nồng độ Testosterone. Cơ chế điều hòa ngược âm tính là kiểu điều hòa mà khi nồng độ hormone tuyến đích giảm, nó sẽ kích thích tuyến chỉ huy bài tiết nhiều hormone để rồi hormone tuyến chỉ huy lại kích thích tuyến đích nhằm đưa nồng độ tuyến đích tăng trở lại bình thường. Ngược lại khi nồng độ hormone tuyến đích tăng lại có tác dụng ức chế tuyến chỉ huy làm giảm bài tiết. Việc sản xuất hormone GnRH được điều hòa bởi nồng độ Testosterone trong máu. Khi nồng độ Testosterone cao, vùng dưới đồi sẽ cảm nhận tín hiệu và giảm tiết GnRH dẫn đến nồng độ hormone FSH, LH cũng sẽ bị giảm. Ngược lại, khi mức Testosterone giảm xuống sẽ làm gia tăng hoạt động sản xuất FSH và LH. Do đó ở kết quả bảng 3.3 khi nồng độ Testosterone trong huyết thanh chuột tăng sẽ phản hồi lại lên vùng dưới đồi để giảm tiết GnRH, từ đó giảm nồng độ FSH ở chuột và kết quả thể hiện ở bảng 3.4. [7],[10]. Vì vậy đối chiếu hai chỉ tiêu đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị tới nồng độ Testosterone và FSH của chuột tương ứng đã thể hiện qua số liệu trong bảng 3.3 và 3.4 là hoàn toàn đúng và hợp lí.

* Bàn luận về kết quả ảnh hưởng của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị lên số lượng và chất lượng tinh trùng chuột.

Đối với chỉ tiêu nghiên cứu ảnh hưởng của bài thuốc lên số lượng và chất lượng tinh trùng chuột, chúng tôi tiến hành nghiên cứu mật độ tinh trùng, độ di động của tinh trùng (di động nhanh, di động chậm, di động tại chỗ, không di động). Sau khi lấy được tinh dịch của chuột, dùng potanh pha loãng bạch cầu (pha loãng 1/20) hút tinh dịch đến vạch 0,5 sau đó hút tiếp dung dịch NaHCO₃ 5% đến vạch 11. Lắc đều nhỏ lên buồng đếm Neubauer và đếm tại các khu vực như đếm bạch cầu. Tính kết quả như đếm bạch cầu trong máu và kết quả cuối cùng sẽ là số lượng tinh trùng tính trên 1ml tinh dịch.

Ở bảng 3.5 kết quả nghiên cứu cho thấy, mật độ tinh trùng ở lô 2 (lô mô hình) giảm rõ rệt so với ở lô 1 (chứng sinh lý), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Natri valproate cho uống liều 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần đã gây giảm rõ rệt mật độ tinh trùng trên chuột. Mật độ tinh trùng ở các lô 3, 4, 5 tăng rõ rệt so với ở lô 2 (lô mô hình) ($p < 0,001$) và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 1 (chứng sinh lý) ($p > 0,05$). So sánh kết quả giữa hai lô trị 4,5 có thể thấy, chuột ở lô 5 có mật độ tinh trùng cao hơn lô 4, mức tăng lần lượt 73,72% và tăng 65,94% so với lô mô hình, tuy nhiên không có sự khác biệt nghĩa thống kê ($p > 0,05$), điều đó chứng minh khi có sự gia tăng về liều thì sẽ có sự cải thiện về mật độ tinh trùng. Như vậy dịch chiết bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị có tác dụng cải thiện mật độ tinh trùng rõ rệt sau khi gây suy giảm chức năng tinh hoàn bằng Natri Valproate, tương đương với thuốc tham chiếu Testosterone undecanoate.

Để xác định mức độ di động của tinh trùng, chúng tôi tiến hành xác định tỉ lệ tinh trùng di động tiến tới, tinh trùng di động không tiến tới và tinh trùng không di động. Tinh trùng di động là tỉ lệ các tinh trùng di động đi theo hướng nhất định trên tiêu bản soi tươi. Tinh trùng di động tiến tới còn được phân ra thành tiến tới nhanh và tiến tới chậm. Những tinh trùng tiến tới nhanh sẽ di chuyển hết một thân tinh trùng trong 1s, chậm hơn 1s là tinh trùng tiến tới chậm. Tinh trùng không tiến tới là tinh trùng đứng lác lư tại chỗ hoặc di động theo vòng tròn.

Đánh giá mức độ di động của tinh trùng cho kết quả thể hiện ở bảng 3.6 cho thấy rằng các lô dùng nước chiết bài thuốc và lô dùng thuốc tham chiếu Testosterone undecanoat có tỉ lệ tinh trùng tiến tới (tiến tới nhanh và chậm) tăng cao rõ rệt ($p < 0,01$), thậm chí hai lô dùng dịch chiết bài thuốc còn có tỷ lệ cao hơn với lô dùng thuốc tham chiếu, chứng tỏ tỉ lệ tinh trùng tiến tới nhanh và tiến tới chậm có xu hướng đáp ứng theo mức liều, trong khi đó các tỉ lệ tinh trùng không tiến tới và không di động ở các lô 3,4,5 giảm có ý nghĩa thống kê so với lô 2 (lô mô hình) ($p < 0,05$). Ở lô 5 dùng liều 29,4 g/kg/ngày có tỷ lệ tinh trùng không di động và không tiến tới thấp hơn lô dùng liều 14,7 g/kg/ngày, do đó tỉ lệ tinh trùng không tiến tới, không di động giảm đi khi tăng liều. Có thể thấy rằng từ kết quả thu được bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị có tác dụng cải thiện mức độ di động của tinh trùng.

Đánh giá chỉ tiêu tỉ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường, chúng tôi tiến hành các bước: Lấy một lượng nhỏ tinh trùng trong môi trường F10 ở trên cho cố định trên lam kính bằng dung dịch methanol 96%, sau đó nhuộm Papanicolaou. Tiêu bản hình thái tinh trùng được quan sát dưới kính hiển vi để xác định hình thái và phát hiện những cấu trúc bất thường ở đầu, cổ hay đuôi tinh trùng.

Kết quả đánh giá tỉ lệ tinh trùng có hình thái bất thường được thể hiện trong bảng 3.7, các lô 3, 4, 5 tỷ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường giảm có ý nghĩa thống kê so với ở lô 2 (lô mô hình) ($p < 0,01$) và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 1 (chứng sinh lý) ($p > 0,05$). So sánh giữa 2 lô dùng dịch chiết bài thuốc nghiên cứu, lô 5 có tỷ lệ tinh trùng bất thường thấp hơn lô 4, có thể thấy mức độ giảm tỷ lệ tinh trùng bất thường đáp ứng theo liều dùng, tuy nhiên sự khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Chỉ số tỷ lệ tinh trùng bất thường càng thấp, càng làm cải thiện chất lượng tinh trùng. Do đó từ kết quả nghiên cứu cho thấy chế phẩm nghiên cứu có tác dụng làm cải thiện chất lượng tinh trùng trên chuột thực nghiệm.

Một số nghiên cứu đã được công bố chứng minh tác dụng của một số vị thuốc có tác dụng làm tăng số lượng và chất lượng tinh trùng. Năm 2019, Nguyễn Thanh Hải, Nguyễn Thị Thùy Linh và cs nghiên cứu khi bổ sung cao Nhục thung dung (chiết xuất sử dụng dung môi ethanol 70%) ở liều lượng 50 mg/ngày/chó vào khẩu phần ăn trong 10 ngày trước khi khai thác làm tăng chất lượng tinh dịch chó đực giống American Bully. Thể tích tinh dịch/lần khai thác tăng hơn so với đối chứng mức tăng 0,62 mL. Tổng số tinh trùng tiến thẳng/lần khai thác tăng hơn so với đối chứng với mức tăng 208,83 triệu tinh trùng [64]. Kết quả nghiên cứu này và kết quả nghiên cứu của chúng tôi là tương đối tương đồng, đều làm tăng số lượng tinh trùng và cải thiện tổng số tinh trùng di động tiến tới.

Nghiên cứu của Long Jiang Wu, Tian Xiang và cs (2018) cho biết Echinacoside là một hợp chất có trong Nhục thung dung [65]. Tác dụng điều trị của Nhục thung dung đối với tình trạng vô sinh chủ yếu là do Echinacoside. Theo GuiFang Zhao, Ying Wang và cs (2021), Echinacoside có thể cải thiện hiệu quả tình trạng rối loạn chức năng sinh tinh, rối loạn chức năng tuyến sinh dục và rối loạn cương dương bằng cách chống oxy hóa, điều hòa hormone sinh dục. Nó cải thiện số lượng tinh trùng tổng thể, giảm tỷ lệ biến dạng tinh trùng và tăng tỷ lệ di động tiến tới của tinh trùng. Số lượng tế bào Leydig bình thường tăng dần theo cách phụ thuộc vào liều lượng Echinacoside, cho thấy Echinacoside thúc đẩy sự phát triển của các tế bào Leydig [66]. Điều này lí giải tác dụng của vị thuốc Nhục thung dung làm tăng số lượng và cải thiện chất lượng tinh trùng trong bài thuốc LVĐHGV.

Một nghiên cứu khác của Chen Xiao Lu, Su Qin Hu và cs (2023) cho thấy hoạt chất Flavonoid có trong Thỏ ty tử điều chỉnh sự tăng sinh và biệt hóa của dòng tế bào Sertoli và tính toàn vẹn của hàng rào máu - tinh hoàn, từ đó làm tăng số lượng tinh trùng của chuột. Kết quả nghiên cứu này chỉ ra rằng vị thuốc Thỏ ty tử có trong bài thuốc nghiên cứu có khả năng cải thiện số lượng tinh trùng, từ đó cho thấy tác dụng cải thiện số lượng tinh trùng của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị là có cơ sở [35].

Nghiên cứu của Go Lain Ding, Ye Liu (2015) cho rằng bệnh tiểu đường loại 1 hoặc bệnh tiểu đường loại 2 đều có thể gây ra những tác động bất lợi đến khả năng sinh sản của nam giới, đặc biệt là chất lượng tinh trùng, khả năng vận động của tinh trùng, tính toàn vẹn của DNA tinh trùng và các thành phần của huyết tương tinh dịch. Chuyển hóa glucose là một sự kiện quan trọng trong quá trình sinh tinh. Hơn nữa, chuyển hóa glucose cũng quan trọng để duy trì hoạt động cơ bản của tế bào, cũng như các chức năng cụ thể, chẳng hạn như khả năng vận động và khả năng thụ tinh ở tinh trùng trưởng thành [67]. Năm 2021 nghiên cứu của Yuping Chen, Jin Chen và cs cho thấy cặp được liệu Thực địa và Sơn thù khi kết hợp sẽ làm giảm tổn thương tinh hoàn do bệnh tiểu đường bằng cách tăng cường quá trình phân giải đường thông qua trục AGEs/RAGE/HIF-1 α [68], qua đó phần nào chứng minh được cơ chế cải thiện chất lượng tinh trùng của Thực địa và Sơn thù thông qua cơ chế này.

Nghiên cứu của Young Mee Kim, You Jin Jeon và cs (2016), khi thủy phân hai peptide có hoạt tính sinh học (ALC và PEP) thu được từ cá ngựa, sau 12 tuần cho chuột uống dung dịch thủy phân này phát hiện thấy khả năng di chuyển của tinh trùng, số lượng tinh trùng tăng lên cũng như mức Testosterone tăng lên ở chuột đực [62]. Điều này chứng minh vị thuốc Hải mã có tham gia vào tác dụng cải thiện số lượng và chất lượng tinh trùng.

Về mặt lý luận YHCT, các vị thuốc bổ dương như Nhục thung dung, Hải mã, Thỏ ty tử có tác dụng ôn thận, bổ tinh huyết, khi uống lâu ngày làm dương khí vững chắc, tinh huyết đầy đủ bền chặt điều trị chứng “tinh lãnh”, “tinh loãng”, khi phối ngũ cùng các vị bổ âm như Thực Địa, Hoài Sơn, Sơn thù đóng vai trò điều hòa bổ dương dẫn âm, bồi bổ thận âm, vật chất cơ bản của tinh. Thận chủ phát dục khi thận tinh đầy đủ sẽ hóa khí, khi đó tinh khí đầy đủ sẽ phát dục. Kết hợp lại làm tăng cả số lượng và chất lượng của tinh trùng.

* Bàn luận về kết quả ảnh hưởng của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị lên hình thái mô học của tinh hoàn chuột và kích thước ống sinh tinh.

Để đánh giá chỉ tiêu ảnh hưởng của bài thuốc lên mô học tinh hoàn chuột cống trắng đực, tinh hoàn sau khi cân xong được cho ngay trong dung dịch Bouin để bảo quản và làm tiêu bản, đúc khối parafin. Cắt lát mỏng có độ dày 5 μm , trải lên lam kính và đem nhuộm Hematoxyline – Eosin (HE). Các tiêu bản sau được đọc trên kính hiển vi quang học, kết quả được thể hiện các ảnh 3.1 đến 3.5 cho thấy kết quả như sau: Ở các lô dùng bài thuốc (lô 4, lô 5) và lô tham chiếu: Kích thước và hình ảnh các ống sinh tinh gần tương tự như ở lô chứng sinh lý. Khoảng kẽ dày hơn không đáng kể so với lô chứng sinh lý. So với lô mô hình (lô 2), ở lô 3, 4, 5 đều có đủ các loại tế bào dòng tinh: Tinh nguyên bào, tinh bào, tiền tinh trùng, tinh trùng. Ở các lô dùng bài thuốc (lô 4, lô 5) và lô tham chiếu: Kích thước và hình ảnh các ống sinh tinh gần tương tự như ở lô chứng sinh lý, khoảng kẽ dày hơn không đáng kể so với lô chứng sinh lý. Kết quả này cho thấy tác dụng thay đổi cấu trúc tinh hoàn chuột của dịch chiết bài thuốc ở liều 14,7 g/kg/ngày và liều 29,4 g/kg/ngày là khá rõ rệt trên hình ảnh mô học. Kết quả hình ảnh mô học lý giải tác dụng cải thiện về số lượng và chất lượng tinh trùng của chuột của dịch chiết bài thuốc nghiên cứu Lục vị địa hoàng gia vị.

Ở bảng 3.9 cho kết quả đánh giá tác dụng của bài thuốc lên kích thước ống sinh tinh, có thể thấy so với lô 2 (lô mô hình) có đường kính ống sinh tinh $115,20 \pm 8,51 \mu\text{m}$, các lô dùng bài thuốc (lô trị 1, lô trị 2) có đường kính ống sinh tinh tăng có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Đặc biệt tăng nhiều nhất là lô 5 tăng 9,96% so với lô mô hình ($126,68 \pm 12,12$), sau đó là lô 4 tăng 8,90% so với lô mô hình ($125,45 \pm 11,56$) và cuối cùng là lô tham chiếu tăng 8,35% so với lô mô hình ($124,82 \pm 10,30$). Bài thuốc giúp làm tăng đường kính ống sinh tinh so với lô gây bệnh không dùng thuốc ($p < 0,05$).

So với lô tham chiếu, đường kính ống sinh tinh ở 2 lô dùng bài thuốc không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Bài thuốc ở hai mức liều dùng có tác dụng làm hồi phục đường kính ống sinh tinh tương đương với lô tham chiếu dùng Testosterone liều 16 mg/kg/ngày.

So sánh giữa 2 lô dùng bài thuốc, lô dùng liều cao 29,4 g/kg/ngày có đường kính ống sinh tinh to hơn lô dùng liều 14,7 g/kg/ngày, điều đó chứng tỏ mức độ tăng kích thước của ống sinh tinh có đáp ứng theo liều, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Từ các kết quả trên chúng tỏ bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị dùng với liều 29,4 g/kg/ngày và 14,7 g/kg/ngày đều làm tăng kích thước đường kính ống sinh tinh của chuột. Khi tăng về liều sẽ có sự gia tăng đáng kể về kích thước ống sinh tinh, làm hồi phục đường kính ống sinh tinh tương đương với lô tham chiếu dùng Testosterone undecanoat liều 16 mg/kg/ngày.

Để giải thích kết quả này, nhóm nghiên cứu của Young Mee Kim và cs (2016) đã tiến hành nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của 2 thủy phân có hoạt tính sinh học là ALC và PEP có trong cá ngựa. Ở mức độ tinh hoàn, stress oxy hóa có khả năng phá vỡ khả năng sản xuất tinh trùng (sinh tinh trùng) của các tế bào Leydig cũng như khả năng của biểu mô mầm phân biệt giữa tinh trùng bình thường và bất thường. Để kiểm tra tác dụng bảo vệ của các thủy phân này chống lại tổn thương tế bào do H_2O_2 gây ra, các tế bào Leydig được xử lý trước bằng thủy phân ALC và PEP (0,05, 0,1, 0,2, 0,5 và 1 mg/mL) trong 2 giờ và sau đó tiếp xúc với H_2O_2 (1 mM) trong 24 giờ nữa. Kết quả cho thấy tế bào Leydig xử lý trước bằng ALC và PEP đã bảo vệ các tế bào này khỏi tổn thương do H_2O_2 gây ra theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Những kết quả này cho thấy khả năng của thủy phân trong cá ngựa duy trì trạng thái khỏe mạnh của các tế bào Leydig chống lại stress oxy hóa [62].

Theo GuiFang Zhao, Ying Wang và cs (2021), nghiên cứu tác dụng cải thiện mô học tinh hoàn chuột bằng Echinacoside có trong Nhục thung dung. Chuột cống đực gây suy giảm chức năng tinh hoàn bằng Chì sau khi điều trị bằng Echinacoside, tình trạng teo ống sinh tinh được cải thiện, số lớp biểu mô sinh tinh tăng lên, sự sắp xếp của biểu mô đều đặn hơn và cấu trúc của ống sinh tinh được cải thiện. Những tác động này đặc biệt rõ ràng ở nhóm liều cao và nhóm đối chứng dương tính, trong đó ống sinh tinh dày đặc, số lượng tế bào biểu mô sinh tinh ở mỗi lớp tăng lên đáng kể,

tế bào biểu mô sinh tinh trở lại trạng thái bình thường và tinh trùng trong ống sinh tinh tăng lên đáng kể [66].

Trong nghiên cứu in vitro của GuiFang Zhao, Ying Wang và cs đã sử dụng H_2O_2 trên các tế bào Leydig để tạo ra một mô hình tổn thương oxy hóa. Theo đó kết quả cho thấy rằng khả năng bảo vệ của Echinacoside chống lại rối loạn chức năng sinh tinh của tinh hoàn là do điều chỉnh phản ứng với stress oxy hóa [66].

Người ta đã phát hiện ra rằng con đường truyền tín hiệu Mitogen - activated protein kinase (MAPK) có liên quan đến phản ứng với stress oxy hóa [69]. Hiện tại, có ba con đường truyền tín hiệu MAPK song song, bao gồm con đường truyền tín hiệu MAPK qua trung gian protein kinase 38 (p38), qua trung gian The c-Jun N-terminal protein kinase (JNK), qua trung gian Extracellular signal-regulated kinase (ERK). ERK chủ yếu tham gia vào quá trình điều hòa sự tăng sinh và biệt hóa tế bào. Nhiều thụ thể yếu tố tăng trưởng và thụ thể yếu tố liên quan đến dinh dưỡng cần được kích hoạt ERK để hoàn tất quá trình truyền tín hiệu. Họ JNK đóng vai trò quan trọng trong quá trình truyền tín hiệu tế bào do nhiều tác nhân gây stress khác nhau gây ra và có liên quan đến phản ứng stress oxy hóa. P38 là một protein kinase được kích hoạt bởi stress có bản chất tương tự như JNK. Chất hoạt hóa của con đường p38 - MAPK tương tự như chất hoạt hóa của con đường JNK. Trong nghiên cứu của GuiFang Zhao, Ying Wang và cs chủ yếu đánh giá về những thay đổi của phản ứng stress oxy hóa gây ra bởi ngộ độc Chì, vì vậy nghiên cứu chủ yếu được thực hiện từ hai con đường: JNK MAPK và p38 MAPK. Họ đã sử dụng phương pháp Western blotting để phát hiện biểu hiện của p38, p - p38, JNK và p - JNK trong các tế bào Leydig. Kết quả cho thấy biểu hiện tương đối của protein p - p38 và p - JNK cao hơn ở mô hình so với nhóm bình thường. Kết quả cho thấy biểu hiện tương đối của protein - p38 và protein - JNK đã được chứng minh là giảm sau khi điều trị bằng Echinacoside, cho thấy Echinacoside có thể điều chỉnh con đường truyền tín hiệu MAPK thông qua quá trình phosphoryl hóa protein p38 và JNK để làm giảm rối loạn chức năng sinh tinh ở chuột [66].

Vì vậy Echinacoside có trong Nhục thung dung thúc đẩy sự phát triển của các tế bào Leydig. Ngoài ra, điều trị bằng Echinacoside đã đảo ngược một phần biểu hiện tăng lên của p38 và JNK trong các tế bào Leydig. Echinacoside còn có tác dụng bảo vệ chống lại tổn thương do stress oxy hóa bằng cách kích hoạt các enzyme chống oxy hóa và các yếu tố liên quan đến tín hiệu MAPK (p38 và JNK) [66].

Do đó có thể thấy từ các kết quả trên trong bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị, vị thuốc Hải mã và Nhục thung dung đóng vai trò giúp phục hồi mô học tinh hoàn chuột, đồng thời gia tăng kích thước ống tinh tinh ở chuột cống đực trắng sau khi bị gây suy giảm chức năng tinh hoàn bằng Natri valproate, kết quả của chúng tôi phù hợp với các nghiên cứu đã nêu ở trên. Mặt khác theo y học cổ truyền Nhục thung dung vị đắng, cay, tính hàn nhẹ. Quy vào các kinh can, tâm, thận, có công dụng bổ thận ích, chấn tinh ích tủy điều trị chứng di tinh, khó thụ thai kết hợp với Hải mã có vị ngọt, mặn, tính ấm quy kinh can, thận công dụng ôn thận tráng dương chữa liệt dương, di tinh ở đàn ông do dương khí suy, một vị tính hơi hàn một vị ôn ấm càng làm bổ sung chức năng bổ thận dương lên, hoàn toàn phù hợp với vai trò phục hồi mô học tinh hoàn chuột.

* Bàn luận về sự phối ngũ của các vị thuốc theo y học cổ truyền.

Theo Y học cổ truyền tác dụng sinh tinh có thể hiểu ở đây là chức năng thận tàng tinh. Tinh của tiên thiên và tinh của hậu thiên đều được tàng trữ ở thận gọi là thận tinh. Thận tinh chủ về sinh dục và quyết định sự phát dục của cơ thể. Các nguyên nhân thất tinh, lục dâm, sang chấn, hoặc do nội thương lâu ngày sẽ ảnh hưởng tới các cơ quan tạng phủ, gây rối loạn sinh lý các cơ quan tạng phủ, qua đó dẫn đến thiếu tinh, bất dục [25],[26].

Bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị dựa trên cơ sở của bài thuốc Lục vị địa hoàng thang kết hợp với các vị thuốc bổ dương như Nhục thung dung, Hải mã, Thỏ ty tử mà tạo thành. Bài thuốc có tác dụng kiêm cả bổ lẫn công, đầy đủ cả âm và dương, bởi thận âm và thận dương luôn có quan hệ hỗ căn với nhau. Sự phối ngũ của bài thuốc Lục vị thiên về bổ thận âm với các vị thuốc bổ thận dương dựa trên học thuyết âm dương và thủy hỏa [25].

Người xưa nói “ Thiên bổ dương dã tất vu âm trung cầu dương”, tức là muốn bổ dương tất phải bổ dương trong âm. Với nguyên tắc đó, bài thuốc Lục vị địa hoàng thang lấy bổ can thận làm gốc, các vị có tác dụng bổ luôn song hành các vị có tác dụng tả. Có vị bổ hoả trong thủy thì cũng có Đan bì để tả hỏa trong âm. Sơn thù vào được can mà cố sáp thì Đan bì cũng vào can có tác dụng tuyên thông. Trợ giúp Đan bì để tả hoả trong âm, còn có Trạch tả trừ được hoả tà, nước đọng ở long lồi. Trạch tả vị mặn đưa được phần âm trong dương xuống, cũng có Bạch linh đạm tiết lại đưa được dương trong âm xuống. Bạch linh còn có thể vào tỳ, thấm được thấp nhiệt ở tỳ mà thông với thận, giao với tâm, đỡ cho vị Hoài sơn có tính nê trệ. Hoài sơn vị ngọt cùng Bạch linh vào tỳ mà bổ tỳ, yên được kẻ thù của thủy, nó còn thanh hư nhiệt ở phế, cố được tinh ở thận. Đây là bài Lục vị có công năng tư âm bổ can thận, là vật chất cơ bản để tạo nên tinh. Kết hợp gia vị 3 vị thuốc là các vị thuốc bổ dương như Hải mã: Ôn thận tráng dương, điều khí hoạt huyết; Nhục thung dung: Bổ thận ích tinh, chấn tinh ích tủy, bồi đắp củng cố thận tinh; bồi đắp xong phải củng cố thận tinh này nên có Thỏ ty tử: Ôn thận cố tinh, sáp niệu sẽ cố sáp tinh ở thận lại, không làm hao tổn thận tinh.

Tổng thể là bài thuốc vừa tư bổ can thận làm gốc, là vật chất cơ bản kết hợp để cùng các vị thuốc Hải mã, Nhục thung dung, Thỏ ty tử bổ thận ích tinh, ôn thận tráng dương. Với các tác dụng như trên, bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị có phối ngũ phù hợp về lý luận mặt y học cổ truyền, vừa có tác dụng sinh tinh phù hợp theo dược lý y học hiện đại.

Một số tác giả khác cũng đã dùng phương pháp gây suy giảm chức năng tinh hoàn bằng Natri valproate để nghiên cứu tác dụng sinh tinh của các thảo dược khác và đạt được một số kết quả nhất định:

Đậu Thùy Dương (2018): Nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng cải thiện khả năng sinh sản của chế phẩm OS35 với thành phần chính là quả Sa sàng, OS35 liều 150 mg/kg/ngày uống trong 7 tuần liên tục có tác dụng làm tăng mật độ tinh trùng, cụ thể tăng từ $110,78 \pm 18,94$ lên $187,09 \pm 11,28$ ($10^6/\text{mL}$) tức tăng 68,88% so với lô mô hình ($p < 0,05$), nồng độ Testosterone tăng $8,89 \pm 1,70$ lên $14,16 \pm 1,71$ nmol/l

tức tăng 59,28% so với lô mô hình ($p < 0,05$), ở nghiên cứu của chúng tôi chuột ở lô 4 sau khi gây suy giảm chức năng tinh hoàn bằng Natri valproate cho uống dịch chiết bài thuốc LVĐHGV với liều 14,7 g/kg/ngày làm tăng mật độ tinh trùng rõ rệt so với lô mô hình, cụ thể tăng 65,94% so với lô mô hình với ($p < 0,001$), nồng độ Testosterone tăng 54,15% so với lô mô hình ($p < 0,05$). Hai nghiên cứu đều làm cải thiện nồng độ Testosterone và mật độ tinh trùng ở chuột sau khi gây mô hình bằng Natri valproate, tuy nhiên trong nghiên cứu của Đậu Thùy Dương có mức độ cải thiện về nồng độ Testosterone và mật độ tinh trùng tăng cao hơn so với chế phẩm nghiên cứu của chúng tôi là bài thuốc LVĐHGV, có thể giải thích được điều này do chế phẩm OS35 chỉ có độc vị là quả Sa sàng, đây là vị thuốc có nhiều nghiên cứu chứng minh có ảnh hưởng lên chức năng sinh dục và sinh sản, còn bài thuốc LVĐHGV ngoài các vị thuốc bổ dương gia thêm như Nhục thung dung, Hải mã, Thỏ ty tử đã được chứng minh có tác dụng cải thiện chức năng tinh hoàn thì còn lại là các vị thuốc kết hợp thiên về bổ âm bổ trợ cho tác dụng cải thiện chức năng sinh tinh của bài thuốc, do đó sự khác nhau về kết quả của hai nghiên cứu của chúng tôi và Đậu Thùy Dương là có thể lý giải được [58].

Lê Minh Hoàng (2019): Nghiên cứu tính an toàn và tác dụng cải thiện khả năng sinh tinh của viên nang Y10 với thành phần chính là Lộc nhung và Đông trùng hạ thảo, nghiên cứu trên chuột cống trắng đực gây suy giảm chức năng tinh hoàn bằng Natri valproate, viên nang Y10 liều 224 mg cao được liều/kg/ngày làm cải thiện chỉ số nồng độ Testosterone làm tăng từ $1,55 \pm 0,68$ ng/ml lên $2,77 \pm 1,27$ ng/ml, tăng 78,71% so với lô mô hình ($p < 0,01$), mật độ tinh trùng tăng từ $39,14 \pm 11,90 \times 10^6/\text{mL}$ lên $79,09 \pm 15,44 \times 10^6/\text{mL}$, tăng 102,09% so với lô mô hình ($p < 0,01$), trong khi đó nghiên cứu của chúng tôi sau khi chuột gây suy giảm chức năng tinh hoàn bằng Natri valproate rồi cho uống dịch chiết bài thuốc LVĐHGV với liều 14,7 g/kg/ngày đã làm tăng mật độ tinh trùng rõ rệt so với lô mô hình, cụ thể tăng 65,94% so với lô mô hình với ($p < 0,001$), nồng độ Testosterone tăng 54,15% so với lô mô hình ($p < 0,05$). Cả hai nghiên cứu đều làm cải thiện các chỉ số đánh giá tác dụng sinh tinh: Nồng độ Testosterone, mật độ tinh trùng trên chuột thực nghiệm, có thể thấy nghiên cứu của Lê Minh Hoàng cải thiện tốt hơn về chỉ số tăng nồng độ

Testosterone huyết thanh chuột và mật độ tinh trùng chuột trên thực nghiệm, tuy nhiên cần có những nghiên cứu sâu hơn để so sánh về mức độ cải thiện chức năng tinh hoàn của hai chế phẩm là viên nang Y10 và bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị trên thực nghiệm [70].

KẾT LUẬN

1. Về độc tính cấp của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị trên thực nghiệm.

Chưa tìm thấy LD50 của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống là 300 g/kg thể trọng mà không gây chết chuột nào, không có biểu hiện nào của độc tính cấp, chứng tỏ bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị có khoảng an toàn điều trị rộng.

2. Về tác dụng sinh tinh bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị trên thực nghiệm.

Trên chuột cống trắng đực gây suy giảm chức năng tinh hoàn bằng Natri valproate, bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị liều 14,7 g/kg/ngày và 29,4 g/kg/ngày có tác dụng cải thiện rõ rệt các chỉ số đánh giá tác dụng lên khả năng sinh tinh: Tăng nồng độ Testosterone huyết thanh chuột lên 54,15% và 87,69% so với lô mô hình ($p < 0,05$), nồng độ FSH giảm lần lượt 13,67% và 15,37% so với lô mô hình ($p < 0,05$), mật độ tinh trùng tăng lần lượt 65,94% và 73,72% so với lô mô hình ($p < 0,05$), tỷ lệ tinh trùng có hình thái bất thường giảm lần lượt 34,16% và 37,96% so với lô mô hình ($p < 0,01$), đường kính ống sinh tinh tăng lần lượt 8,90% và 9,96% so với lô mô hình ($p < 0,01$), trọng lượng của tinh hoàn; mào tinh hoàn; túi tinh; cơ nâng hậu môn của chuột tăng so với lô mô hình ($p < 0,05$), tăng tỷ lệ tinh trùng tiến tới nhanh, giảm tỷ lệ tinh trùng tiến tới chậm; không tiến tới; không di động so với lô mô hình ($p < 0,05$).

KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn và các độc tính chuyên sâu khác như độc tính trên sinh sản, độc tính trên nhiễm sắc thể.

Nghiên cứu sâu hơn về tác dụng trên sinh sản, sinh dục của bài thuốc. Từ đó tiến hành thử nghiệm lâm sàng đánh giá tác dụng sinh tinh của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN

1. Nguyễn Quốc Nghĩa, Đoàn Quang Huy, Nguyễn Hoàng Ngân (2024). Đánh giá tác dụng sinh tinh của bài thuốc “Lục vị địa hoàng gia vị” trên thực nghiệm, *Tạp chí nghiên cứu Y dược học cổ truyền Việt Nam*, số 80 - 2024, 28-41.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Sĩ Toàn (2014). *Hiếm muộn, vô sinh – Những điều cần biết*, Nhà xuất bản phụ nữ.
2. E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding, N. E. Skakkebaek (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *BMJ*, 305, 609-613.
3. World Health Organization (2021). *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 6th ed.
4. Hội Nội tiết sinh sản và vô sinh thành phố Hồ Chí Minh (2022). Cập nhật kết quả áp dụng hướng dẫn xét nghiệm và xử lý tinh dịch đồ người theo WHO 2021, *báo cáo hội nghị 05/03/2022*.
5. Dương Thanh Hải (2021). Đánh giá tác dụng của viên nang hải mã nhân sâm trên người bệnh suy giảm tinh trùng, *luận văn Thạc sĩ y học*, học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam.
6. Nguyễn Tuấn Lượng, Trịnh Hoài Nam, Trịnh Thị Hạnh và cs (2023). Đánh giá tác dụng cải thiện khả năng sinh tinh của viên hoàn mềm tinh kỳ trên chuột cống trắng gây suy giảm tinh trùng bằng Natri Valproarte, *Tạp chí y học quân sự*, số 1-2023.
7. Nguyễn Thành Như (2013). *Nam khoa lâm sàng*, Nhà xuất bản tổng hợp thành phố Hồ Chí Minh, 24-43, 125-153.
8. Hoàng Văn Cúc, Nguyễn Văn Huy (2006). Cấu tạo bộ phận sinh dục nam, *Giải phẫu người tập 2*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 336-389.
9. Phạm Thị Minh Đức (2016). *Sinh lý học*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 296, 303, 340-350.
10. Trần Quán Anh, Nguyễn Bửu Triều (2002). *Bệnh học giới tính Nam*, Nhà xuất bản Y học, 124-187.
11. Stanworth R.D, Jones T.H (2008). “Testosterone for the aging male; current evidence and recommended practice”, *Clinical interventions in aging*, 3(1): p. 25.

12. 熊承良、吴明章、刘续红、黄子峰 (2002)。人类精子学。湖北科学技术出版社。
Hùng Thừa Lương, Ngô Minh Chương, Lưu Tục Hồng, Hoàng Tử Phong (2002), *Nhân loại tinh trùng học*, Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật Hồ Bắc, Trung Quốc.
13. Molitch M.E. (2017). “Diagnosis and Treatment of Pituitary Adenomas: A review”. *JAMA*. 317(5):516-524.
14. Fode M., Fusco F., Lipshultz L. et al (2016). Sexually transmitted disease and male infertility: a systematic review, *European Urology Focus*, 2(4), 383-393.
15. Punab M., Poolamets O., Paju P. et al (2017). Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts, *Human Reproduction*, 32(1), 18-31.
16. Galil K.A, Setchell B.P (2010). “Effects of local heating of the testis on testicular blood flow and testosterone secretion in the rat”. *International Journal of Andrology*, 11(1), 73-85.
17. Rajab B., Alsayes M., Othman M. et al (2023). Efficacy of varicocelelectomy in improving semen parameters in patients with clinical varicocele, *Libya Journal of Medical Research*, 17-2, 118-132.
18. Nguyễn Hoài Bắc, Trần Văn Kiên, Hoàng Long (2021). Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và di truyền của những bệnh nhân vô sinh không có tinh trùng do tắc, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 498(1), 111-115.
19. Harlev A., Agarwal A., Gunes S.O, Shetty A. et al (2015). Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review, *World J Mens Health*, 33(3), 143-160.
20. Meri Z.B, Irshid I.B, Migdadi M. et al (2013). Does cigarette smoking affect seminal fluid parameters? A comparative study, *Oman Med J*, 28(1), 12-5.
21. Finelli R., Mottola F., Agarwal A. (2021). Impact of Alcohol Consumption on Male Fertility Potential: A Narrative Review. *International Journal of Environmental Research Public Health*, 29;19(1):328, 1-17.

22. Kahraman S., Hassa H., Karatas A. et al (2012). The effect of blood and seminal plasma heavy metal and trace element levels on sperm quality, *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 32(6):1560-8.
23. Nguyễn Hoài Bắc, Trần Văn Kiên (2022). Nghiên cứu đặc điểm nồng độ Kẽm và Fructose trong tinh dịch của những bệnh nhân vô sinh nam không có tinh trùng. *Tạp chí y học Việt Nam*, 514(1), 333-338.
24. 徐福松 (2008) , 实用中医男科学, 中国中医出版社, 406-413.
Tù Phúc Tùng (2008), *Thực dụng Trung y nam khoa học*, Nhà xuất bản Trung y Trung Quốc, 406-413.
25. Bành Khừu, Đặng Quốc Khánh (2002). *Những học thuyết cơ bản của Y học cổ truyền*, Nhà xuất bản Y học, 103-150.
26. Trần Thúy, Phạm Duy Nhạc, Hoàng Bảo Châu (2012), *Bài giảng Y học cổ truyền tập 1*, Nhà xuất bản y học, 45-57.
27. Hải Thượng Lãn Ông (2001), *Hải Thượng Lãn Ông Y tông tâm lĩnh*, Tái bản nguyên bản, Nhà xuất bản Y học, tập 1-2, tr.265-75, 423-24, 432-41, 550-71.
28. 陈志强、王树、等 (2013) 。男科专病中医临床诊治。人民卫生出版社
Trần Chí Cường, Vương Thụ Thanh và cộng sự (2013). *Trung y lâm sàng chẩn đoán và điều trị bệnh nam khoa*, Nhà xuất bản Y tế nhân nhân.
29. 毛俊同, 阵涤平 (2008), 不孕不育中西医结合诊治, 人民卫生出版社.
Mao Quân Đồng (2008). *Chẩn đoán và điều trị vô sinh bằng y học cổ truyền Trung Quốc và Tây y tích hợp*.
30. Yong S., Yang Y., Li F. et al (2020). Wuzi Yanzong Pill for the treatment of male infertility: A protocol for systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Medicine (Baltimore)*. 14;99(33).
31. He-Liang, L., Chang-Sheng, C., Wen-Yong et al (2009). Intervention effect of jinkuishenqiwan on the kidney-yang deficiency in rats. *Journal of the Fourth Military Medical University*, 2(3), 189-192.

32. 金锐 (2023). 关于六味地黄丸, 你可能不知道的 10 件事, 别再自行服用了, 人民卫生出版.
Kim Duệ (2023). 10 điều có thể bạn chưa biết về bài thuốc Lục vị địa hoàng, hãy ngừng tự ý dùng chúng, Nhà xuất bản y học nhân dân.
33. Trần Thúy, Vũ Nam (2001). *Kim quĩ yếu lược*, Nhà xuất bản y học, 388.
34. Đâu Xuân Cảnh (2007). Nghiên cứu tác dụng của Hải mã và sâm Việt Nam lên hình thái – chức năng của tinh hoàn chuột cống trắng trưởng thành, *Luận án Tiến sỹ y học*, Trường Đại học Y Hà Nội
35. Liu C.X, Hu S.Q, Liu D.L (2023). The effect of semen cuscutae flavonoid on Sertoli cells and blood-testis barrier in male infertility: integrating network pharmacology and experimental verification, *Pharm Biol*, 61(1), 986-999.
36. Trần Thanh Tùng và cs (2008). Nghiên cứu tác dụng của thung dung (*Cistanche deserticola* Y.C.Ma) trên chức năng sinh sản chuột cống đực non, *Tạp chí Dược Học*, số 8/2008, 18-21.
37. Vũ Thị Bích Loan, Nguyễn Việt Tiên, Vũ Văn Tâm (2015). Kết quả bước đầu phương pháp tiêm tinh trùng trữ lạnh từ mào tinh vào bào tương noãn trong điều trị vô sinh nam, *Tạp chí nghiên cứu y học*, 93(1), 1-7.
38. Đoàn Minh Thụy (2011). Nghiên cứu tính an toàn và hiệu quả của viên nang “Hồi xuân hoàn” trong điều trị bệnh nhân bị suy giảm tinh trùng thể thận dương hư, *Luận án Tiến sỹ Y học*, Trường Đại học Y Hà Nội.
39. Vũ Ngọc Thắng (2021). Nghiên cứu độc tính và tác dụng tăng cường chức năng sinh dục đực của viên nang Trường Xuân CB trên động vật thực nghiệm, *Luận văn tiến sỹ y học*, Học viện quân y.
40. Quách Thị Yên (2021). Nghiên cứu sự biến đổi hình thái cấu trúc, siêu cấu trúc ống sinh tinh, tinh trùng sau uống Khang bảo tử trên bệnh nhân vô tinh, *Luận án tiến sỹ y học*, Học viện quân y.
41. Nguyễn Tuấn Lượng, Trịnh Hoài Nam, Trịnh Thị Hạnh, Nguyễn Văn Cường (2023). Đánh giá tác dụng cải thiện khả năng sinh tinh của viên hoàn mềm Tinh kỳ trên chuột cống trắng gây suy giảm tinh trùng bằng Natri valproat, *Tạp chí Y dược học cổ truyền Quân sự*, số 1 – 2023, 88-98.

42. Mai Phuong Thanh, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Trọng Thông và cs (2020). Tác dụng phục hồi của TD0014 trên chuột cống trắng bị gây suy giảm sinh sản bằng Natri Valproat, *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 126(2), 23-33.
43. 宋辉 (2015). 生精胶囊治疗男性不孕症 220 例临床分析[J], *中国伤残医*, 2015(7), 113-114.
Song Hui (2015). Phân tích lâm sàng điều trị vô sinh nam bằng Viên nang Shengjing trên 220 bệnh nhân vô sinh nam nhập viện từ tháng 4 năm 2012 đến tháng 4 năm 2014, *Tạp chí Y học Chấn thương và Khuyết tật Trung Quốc*, 2015(7), 113-114.
44. 王志勇,王缓缓 (2018). 针刺治疗男性不孕症的临床疗效分析, *世界最新医学信息文摘* (连续型电子期刊) ,18(84), 160.
Wang Zhiyong, Wang Yuanyuan (2018) : Phân tích hiệu quả lâm sàng của châm cứu trong điều trị vô sinh nam trên 140 bệnh nhân vô sinh nam điều trị tại từ tháng 5 năm 2015 đến tháng 5 năm 2018. *Tạp chí điện tử Y học* 18(84), 160.
45. 攸毅 (2020). 150 例男性不孕不育症患者的性压力状况调查, *黑龙江医学*, 44(4), 549-551.
You Yi (2020). Nghiên cứu tình trạng căng thẳng tình dục của 150 bệnh nhân vô sinh nam tại Viện Khoa học Y tế Khai Phong vào tháng 12 năm 2018. *Tạp chí y học Hắc Long Giang*, 44(4), 549-551.
46. Sumanta Kumar Goswami, Mohammed Naseeruddin Inamdar, Rohitash Jamwal, Shekhar Dethe (2013). Efficacy of Cinnamomum cassia Blume in age-induced sexual dysfunction of rats. *J Young Pharm*, 5(4), 148-153.
47. Thawatchai P., Jintanaporn W., Sitthichai I. et al (2012). Moringa Oleifera Leaves Extract Attenuates Male Sexual Dysfunction, *American Journal of Neuroscience*, 3(1),17-24.
48. Wang X., Liu F., Gao X. et al (2016). Comparative proteomic analysis of heat stress proteins associated with rat sperm maturation. *Molecular Medicine Reports*, 13, 3547-3552.

49. Jiang Z., Xu B., Yang M. et al (2013). Protection by hydrogen against gamma ray-induced testicular damage in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 112(3), 186-191.
50. Rekha M., Shilpa B. (2023). Effect of anti-estrogen and anti-progesterone on spermatogenesis, testosterone production and expression of steroidogenic enzyme genes in adult male rats. *Reproductive biology*, 23, 100749
51. Nishimura T., Sakai M., Yonezawa H. (2000). “Effects of Natri valproat acid on fertility and reproductive organs in male rats”, *The Journal of Toxicological Sciences*, 25(2), 85-93.
52. Mariane M.Z., Vanusa M., Daniela S.B et.al (2015). Green tea infusion improves cyclophosphamideinduced damage on male mice reproductive system, *Toxicology Reports*, 2, 252-260.
53. Viện Dược liệu (2006). *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ thảo dược*, Nhà xuất bản khoa học và Kỹ thuật, 356.
54. Bairy L, Paul V, Rao Y (2010). Reproductive toxicity of sodium valproate in male rats. *Indian J Pharmacol*. Apr;42(2):90-94.
55. WHO (2001). General guidelines for methodologies on research and evaluational of tradition medicine, World Health Organization.
56. National Insitute for Health and Care Exellent (2012). The epilepsies: The diagnosis and management of the epilepsies in adults and children in primary and secondary care: *Pharmacological update of clinical guideline 20*,137, 23-40.
57. G.R.Dohle, S.Arver, C.Bettocchi, T.H.Jones, S.Kliesch, M.Punab (2015). Guidelines on Male Hypogonadism, *European Association of Urology*.
58. Đậu Thùy Dương (2018). Nghiên cứu độc tính và tác dụng trên chức năng sinh sản của OS35 trong thực nghiệm , *Luận văn Tiến sĩ Y học*, Trường Đại học Y Hà Nội.

59. Tian Wang, Chen Chen, Man yang et al (2015). Cistanche tubulosa ethanol extract mediates rat sex hormone levels by induction of testicular steroidogenic enzymes, *Pharmaceutical biology*, 54(3), 481-487.
60. Mundijo T., Suyatna F.D, Wibowo A.E et al (2023). The seahorse (*Hippocampus comes* L.) extract ameliorates sperm qualities, testosterone level, and serum biochemistry in rats induced by depo medroxyprogesterone acetate. *JAdv Vet Anim Res*. 2023 Mar 31;10(1), 126-131.
61. Mngqibisa R., Kendall M.A, Dooly et al (2020). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Depot Medroxyprogesterone Acetate in African Women Receiving Treatment for Human Immunodeficiency Virus and Tuberculosis: Potential Concern for Standard Dosing Frequency. *Clin Infect Dis*, 71(3), 517-524.
62. Kim Y.M., Jeon Y.J., Huh J.S. et al (2016). Effects of enzymatic hydrolysate from seahorse *Hippocampus abdominalis* on testosterone secretion from TM3 Leydig cells and in male mice. *Appl Biol Chem*, 59(6), 869–879.
63. OECD (2009). Test No. 441: Hershberger Bioassay in Rats: A Short-term Screening Assay for (Anti) Androgenic Properties, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, *OECD Publishing*, Section 4.
64. Nguyễn Thanh Hải, Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Đức Trường và cs (2019). Sử dụng dược liệu sâm cau và nhục thung dung nâng cao chất lượng của tinh dịch, tinh trùng chó đực giống American Bully, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 17(6), 502-508.
65. Wu L., Xiang T., Chen C. et al (2023). Studies on Cistanches Herba: A Bibliometric Analysis. *Plants (Basel)*, 12(5), 1098.
66. Zhao G., Wang Y., Lai Z. et al (2022). Echinacoside Protects Against Dysfunction of Spermatogenesis Through the MAPK Signaling Pathway. *Reprod. Sci.* **29**, 1586–1596.

67. Ding G.L, Liu Y., Liu M.E et al (2015). The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian Journal of Andrology*, 17(6), 948-53.
68. Chen Y., Chen J., Shu A. et al (2021). Combination of the Herbs Radix Rehmanniae and Cornus Officinalis Mitigated Testicular Damage From Diabetes Mellitus by Enhancing Glycolysis via the AGEs/RAGE/HIF-1 α Axis. *Front Pharmacol*, 2021 Jun 28;12:678300.
69. Lawrence, M., Jivan, A., Shao, C. et al (2008). The roles of MAPKs in disease. *Cell Res*, 18, 436–442.
70. Lê Minh Hoàng (2019). Nghiên cứu tính an toàn và tác dụng cải thiện khả năng sinh tinh của Viên nang Y10. *Luận văn Tiến sĩ Y học*, Viện Y học cổ truyền Quân đội.
71. Đỗ Tất Lợi (2019). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 309, 837, 848, 850, 863, 862, 878, 911, 937-45.
72. Bộ Y tế (2018). *Dược điển Việt Nam V*, tập 1 và tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 32, 67, 187, 225, 233, 262, 287, 291, 303.
73. Xu L., Guo X.K, Xue S.J et al (2023). Analysis of Differences in the Chemical Composition of Glycosides and Sugars between Four Forms of Fresh Rehmanniae Radix. *Molecules*, 28(24):7995.
74. Wang Z., Zhao S.N, Tao S. et al (2023). “Dioscorea spp.: Bioactive Compounds and Potential for the Treatment of Inflammatory and Metabolic Diseases”. *Molecules*, 28, 2878.
75. Dong Y., Feng Z.L, Chen H.B et al (2018). Corni Fructus: a review of chemical constituents and pharmacological activities. *Chin Med* 13(34).
76. Ríos J.L (2011). Chemical constituents and pharmacological properties of Poria cocos. *Planta Med*, 77(7), 681-691.
77. Gao X., Sun C.P, Yu Z.L et al (2017). “Correlation analysis between the chemical contents and bioactivity for the quality control of Alismatis Rhizoma”, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Volum 8, Issue 2, 242-251.

78. Tan Y.Q, Chen H.W, Li J. et al (2020). Efficacy, Chemical Constituents, and Pharmacological Actions of *Radix Paeoniae Rubra* and *Radix Paeoniae Alba*, *Front Pharmaco*, 2020 Jul 10;11:1054.
79. Zhang Y., Xiong H., Xu X.F et al (2018). “Compounds Identification in Semen Cuscutae by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UPLCs) Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry”, *Molecules*, 17;23(5):1199.
80. Zhou S.Q, Feng D., Zhou Y. et al (2023). “Analysis of the active ingredients and health applications of cistanche”. *Front. Nutr*, Volume 10 – 2023.
81. Hoàng Tùng, Trịnh Thị Trúc Ly, Bùi Thị Hồng Hạnh (2013). Thành phần sinh hóa của cá ngựa đen (*Hippocampus kuda*) và tác dụng kích thích sinh tinh ở chuột bạch, *Bộ môn Khoa học Thủy sản*, Trường Đại học Quốc tế – ĐHQG TPHCM.

PHỤ LỤC I
HÌNH ẢNH CÁC VỊ THUỐC TRONG BÀI THUỐC “LỤC VỊ
ĐỊA HOÀNG GIA VỊ”

Thục địa



Hoài sơn



Bạch linh



Son thù



Trạch tả



Đan bì



Nhục thung dung



Hải mã



Thỏ ty tử



PHỤ LỤC II
ĐẶC ĐIỂM CÁC VỊ THUỐC TRONG THÀNH PHẦN BÀI THUỐC
“LỤC VỊ ĐỊA HOÀNG GIA VỊ”

1. Thục địa:

- Tên khoa học: *Radix Rehmanniae glutinosae praeparata*
- Bộ phận dùng: Rễ củ đã chế biến của cây Địa hoàng [*Rehmannia Glutinosa* (Gaertn) Libosch.], họ Hoa mồm chó (Scrophulariaceae).
- Thành phần hóa học: Các thành phần chính của Thục địa bao gồm iridoid glycosides, phenylethanoid glycosides, anthraquinones, đường, axit amin, tinh dầu dễ bay hơi và các chất vô cơ.
- Tác dụng dược lí: Glycoside iridoid và các hợp chất đường có nhiều tác dụng khác nhau, bao gồm các hoạt động hạ đường huyết, chống viêm, bảo vệ thần kinh, tăng cường miễn dịch và thúc đẩy tạo máu tủy xương.
- Tính vị quy kinh: Vị ngọt, tính hơi ôn, qui vào kinh thận, can.
- Công dụng: Tư âm, bổ huyết, ích tinh tủy.
- Chủ trị: Can thận âm hư, thất lưng đầu gối mỏi yếu, cốt chung triệu nhiệt, mồ hôi trộm, di tinh, âm hư ho suyễn. Huyết hư, đánh trống ngực hồi hộp, kinh nguyệt không đều, rong huyết.
- Kiêng kỵ: Kỵ sắt, tỳ vị hư hàn không nên dùng [71],[72],[73].

2. Hoài sơn

- Tên khoa học: *Dioscorea persimilis Prain et Burkill*
- Bộ phận dùng: Rễ củ đã chế biến khô của cây Củ mài (*Tuber Dioscorea persimilis*).
- Thành phần hóa học: tinh bột, protein, axit amin và nhiều khoáng chất như Fe, Zn, Cu... đồng thời chứa chứa polysaccharides, sanguinarines, allantoin, saponin.
- Tác dụng dược lý: Các hợp chất thực vật của họ *Dioscorae*, chẳng hạn như saponin steroid, polyphenol, allantoin và đặc biệt là polysaccharides và diosgenin. Các hợp chất hoạt tính sinh học này có hoạt tính chống viêm và có tác dụng bảo vệ chống lại nhiều bệnh, chẳng hạn như viêm ruột, viêm khớp, viêm da, viêm tụy cấp và viêm thần kinh. Ngoài ra, chúng đóng vai trò quan trọng trong việc phòng ngừa

và điều trị các bệnh chuyển hóa, bao gồm béo phì, rối loạn lipid máu, tiểu đường và bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu.

- Tính vị quy kinh: Vị ngọt, tính bình. Quy vào kinh thận, tỳ, vị và phế.

- Công dụng: Chỉ khát, bổ thận, sinh tân, ích phế, dưỡng vị và bổ tỳ.

- Chủ trị: Bồi bổ sức khỏe, viêm ruột mãn tính, ăn uống kém, hen do phế hư, tiêu chảy lâu ngày, bạch đới, di tinh, di niệu, tiểu đường [71],[72],[74].

3. Sơn thù

- Tên khoa học: *Fructus Corni officinalis*

- Tên gọi khác: Sơn thù du, Sơn du nhục, Táo bì.

- Bộ phận dùng: Quả chín đã phơi hay sấy khô, bỏ hạt của cây sơn thù du (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.), họ Thù Du (Cornaceae).

- Thành phần hóa học: Khoảng 90 hợp chất đã được phân lập và xác định từ *Fructus Corni*, bao gồm terpenoid, flavonoid, tannin, polysaccharide, phenylpropanoid, sterol, axit cacboxylic, furan và các chất khoáng. Trong số đó, iridoid, tannin và flavonoid là các thành phần chính.

- Tác dụng dược lý: Cao quả Sơn thù du có tác dụng kháng khuẩn đối với các trực khuẩn thương hàn và lỵ. Cao Sơn thù du có tác dụng chống loạn nhịp tim. Ngoài ra, Sơn thù có tác dụng lợi tiểu và hạ huyết áp. Các nghiên cứu thực nghiệm in vivo và in vitro chỉ ra rằng Sơn thù thể hiện các hoạt động dược lý rộng rãi bao gồm các hoạt động hạ đường huyết, chống oxy hóa, chống viêm, chống ung thư, bảo vệ thần kinh, bảo vệ gan và bảo vệ thận. Tuy nhiên, chỉ có khoảng 18% thành phần hóa học trong Sơn thù được thử nghiệm.

- Tính vị quy kinh: Vị chua, sáp, tính ấm. Quy vào kinh can và thận.

- Công dụng: Bổ can thận, cố tinh sáp niệu.

- Chủ trị: Trị lưng gối đau mỏi, liệt dương, ù tai, đàn ông di tinh, điều trị bệnh tiểu gắt, tiểu tiện nhiều lần trong ngày, tiểu đêm nhiều lần. Bổ can thận, làm tinh khí bền; cầm không ra mồ hôi nhiều ở người bệnh lâu ngày, suy nhược [71],[72],[75].

4. Phục linh

- Tên khác: Bạch phục linh, bạch linh.

- Tên khoa học: *Poria*
- Bộ phận dùng: Thể quả nấm đã phơi hay sấy khô của nấm Phục linh [*Poria cocos* (Schw.) Wolf], họ nấm lỗ (Polyporaceae), mọc ký sinh trên rễ một số loài thông. Phục linh bì: Lớp vỏ ngoài cùng của nấm, vỏ ngoài thường có màu nâu trắng/nâu nhạt và một mặt có màu nâu đen; Phục linh khối: Phần còn lại của nấm Phục linh sau khi tách vỏ ngoài. Phục thân: Phần nấm ôm lấy đoạn rễ của cây thông.
- Thành phần hóa học: Polysaccharides, Triterpenoid khoáng, Beta – Pachyman, Protein, Histamine gum, Adenine, Beta – pachymanase, Lipase...
- Tác dụng dược lý: Polysaccharides và triterpenoids có trong Bạch linh được nghiên cứu có nhiều tác dụng dược lí. Triterpenoids được biết là có ảnh hưởng quan trọng đến một số bệnh như viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, viêm màng bồ đào tự miễn, sốt nhiễm trùng và có thể là hen phế quản, trong khi polysaccharides có thể tăng cường phản ứng miễn dịch. Khi xem xét các tài liệu, chúng tôi thấy rằng polysaccharides từ *Poria cocos* tăng cường tiết các chất kích thích miễn dịch và ức chế tiết các chất ức chế miễn dịch, do đó tăng cường phản ứng miễn dịch. Ngoài ra, chúng cho thấy hoạt động chống khối u đối với các dòng tế bào ung thư khác nhau. Hoạt động này có liên quan đến khả năng ức chế sự hình thành mạch máu mới bằng cách giảm điều hòa cả NF- κB và sự cảm ứng chuyển vị NF- κB/Rel.
- Tính vị quy kinh: Vị ngọt, nhạt, tính bình và quy vào can tâm, tỳ, phế và thận.
- Công dụng: Lợi thủy thẩm thấp, kiện tỳ hòa trung, ninh tâm an thần.
- Chủ trị: Thủy thũng kèm tiểu sén, đánh trống ngực, mất ngủ, kém ăn, phân lỏng, tiết tả [71],[72],[76].

5. Trạch tả

- Tên khác: Mã đề nước
- Tên khoa học: *Rhizoma Alismatis*
- Bộ phận dùng: Thận rễ khô đã cạo sạch vỏ ngoài của cây Trạch tả [*Alisma orientalis* (Sam) Juzep.].
- Thành phần hóa học: Trạch tả đã báo cáo có các hoạt chất được xác định là polysaccharides, triterpene, diterpene, sesquiterpene, alkaloid và axit phenolic. Terpene và axit phenolic được coi là chất chuyển hóa thứ cấp chính từ cây thuốc này.

- Tác dụng dược lý: Dược chất triterpen loại protostane, chẳng hạn như alisol A, F và H có hoạt tính hạ lipid liên quan đến việc ức chế lipase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase. Ngoài ra Triterpen của Trạch tả có tác dụng có lợi đối với sỏi tiết niệu canxi oxalate do ethylene glycol và alfalcidol gây ra. Chiết xuất triterpenoid toàn phần cải thiện lượng nước tiểu thải ra và bài tiết chất điện giải làm tăng lượng nước tiểu. Chiết xuất triterpenoid góp phần cải thiện lượng nước tiểu thải ra và bài tiết chất điện giải. Hỗn hợp alisol B 23-acetate, alisol B, alisol A 24-acetate, alisol A, alisol C 23-acetate cũng làm tăng lượng nước tiểu. Những phát hiện này cho thấy rằng triterpenoids có thể được coi là thuốc lợi tiểu. Các hoạt chất 16-oxo-alisol A, alisol E 23-acetate, alisol F 24-acetate và 11-anhydroalisol F từ Trạch tả có tác dụng chống viêm, ức chế quá trình chết theo chu trình.

- Tính vị quy kinh: Vị ngọt nhạt hơi mặn, tính hàn. Quy kinh thận và bàng quang.

- Công dụng: Lợi thủy thẩm thấp, thanh thấp nhiệt

- Chủ trị: Chữa chứng nhiệt lâm tiểu tiện ít, bí, buốt rất. Chữa ỉa chảy, phù thũng do tỳ hư. Thanh thấp nhiệt ở can, dùng trong các bệnh đau đầu, nặng đầu, vàng đầu hoa mắt [71],[72],[77].

6. Mẫu đơn bì

- Tên khác: Mẫu đơn còn có tên là hoa vương, thiên hương quốc sắc, phú quý hoa.

- Tên khoa học: *Cortex Radicis Paeoniae suffruticosae*

- Bộ phận dùng: Vỏ rễ phơi hay sấy khô của cây Mẫu đơn (*Paeoniae suffruticosa* Andr.), họ Mẫu đơn (Paeoniaceae).

- Thành phần hóa học: Rễ mẫu đơn chứa alkaloid, saponin và một số chất thuộc nhóm anthocyanin có tên là peonin, paeonol, paenosid, paeoniflorin – paeonosid. Ngoài ra, còn có oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, d-catechin sacharose, albiflorin, sterol và một lượng tinh dầu từ 0,15 - 0,4% Trong vỏ rễ mẫu đơn, có các chất acetophenon như 2,5 dihydro - 4 methyl acetophenon và 1, 2, 3, 4, 6 penta galolglucose.

- Tác dụng dược lý: Thành phần hóa học trong Mẫu đơn bì có tác dụng chống viêm chủ yếu là paeoniflorin và paeonol, một số dược chất khác có tác dụng chống khối u như paeoniflorin, paeonol, axit gallic và methyl gallate. Ngoài ra dược chất

paeoniflorin có tác dụng chống tập kết tiểu cầu. Dược chất Albiflorin có tác dụng bảo vệ thần kinh, chống trầm cảm, an thần, giảm đau và chống co giật.

- Tính vị quy kinh: Vị đắng, cay, tính hàn nhẹ. Quy vào các kinh can, tâm, thận.
- Công dụng: Thanh nhiệt lương huyết, hoạt huyết hóa ứ.
- Chủ trị: Phát ban, khái huyết, nọc huyết, sốt hư lao, cốt chưng, vô kinh, bế kinh, nhọt độc sưng đau, sang chấn [71],[72],[78].

7. Thỏ ty tử

- Tên khác: cây tơ hồng, miễn tử, đậu ký sinh.
- Tên khoa học: *Semen Cuscutae*
- Bộ phận dùng: Hạt lấy ở quả chín đã phơi hay sấy khô của dây tơ hồng (*Cucusta australis* R. Br. hoặc *Cucusta chinensis* Lam), Họ Tơ hồng (Cucustaceae).
- Thành phần hóa học: Trong hạt Thỏ ty tử người ta mới thấy có chứa Alkaloid (cuscutamin), Lignan (cuscutosid A, cuscutosid B, arbutin, acid clorogenic, acid cafeic, flavonoid (quercetin, astragalin, hyperin,...), acid p. coumaric, dầu béo chứa 9 acid béo.
- Tác dụng dược lý: Dược chất Flavonoid có trong Thỏ ty tử có tác dụng cải thiện rối loạn chức năng sinh tinh. Ngoài ra, Thỏ ty tử tăng trương lực cơ bóp tim, hạ huyết áp. Tăng cường chức năng miễn dịch của cơ thể, ức chế sự phát triển tế bào ung thư.
- Tính vị quy kinh: Vị ngọt, cay, tính hơi ôn. Quy kinh can, thận, tỳ.
- Tác dụng: Bổ thận ích tinh, dưỡng can minh mục, kiện tỳ chỉ tả.
- Chủ trị: Trị liệt dương, di tinh đái không cầm được, mắt mờ, mắt hoa, ỉa lỏng [35],[71],[72],[79].

8. Nhục thung dung

- Tên khác: Nhục thung dung, địa tinh, đại vân.
- Tên khoa học: *Herba Cistanches*
- Bộ phận dùng: Thân thảo, nạc, có chất thịt, có vảy, đã phơi khô của cây Nhục thung dung (*Cistanche deserticola* Y.C.Ma, hoặc *Cistanche tubulosa* (Schrenk) Wight), họ Lệ dương (Orobanchaceae).

- Thành phần hóa học: Các thành phần hóa học của cây Cistanche chủ yếu bao gồm các loại dầu dễ bay hơi và glycoside phenylethanoid không bay hơi (PhGs), iridoid, lignan, alditol, oligosaccharide và polysaccharide.

- Tác dụng dược lý: Các nghiên cứu dược lý cho thấy PhG là thành phần hoạt tính chính để chữa chứng thận yếu, chống oxy hóa và bảo vệ thần kinh; galactitol và oligosaccharide là đại diện cho việc điều trị chứng táo bón ở người già, trong khi polysaccharide có tác dụng cải thiện khả năng miễn dịch của cơ thể. Tác dụng của Nhung thung dung đối với tình trạng vô sinh chủ yếu là do Echinacoside. Echinacoside có thể cải thiện hiệu quả tình trạng rối loạn chức năng sinh tinh, rối loạn chức năng tuyến sinh dục và rối loạn cương dương bằng cách chống oxy hóa, điều hòa hormone sinh dục và chống thiếu oxy. Nó cải thiện số lượng tinh trùng tổng thể, giảm tỷ lệ biến dạng tinh trùng và tăng tỷ lệ di chuyển về phía trước của tinh trùng. Số lượng tế bào Leydig bình thường tăng dần theo cách phụ thuộc vào liều lượng Echinacoside, cho thấy Echinacoside thúc đẩy sự phát triển của các tế bào Leydig.

- Tính vị quy kinh: Vị đắng, cay, tính hàn nhẹ. Quy vào các kinh can, tâm, thận.

- Công dụng: Bổ thận tráng dương, ích tinh huyết, nhuận tràng thông tiện.

- Chủ trị: Chữa liệt dương di tinh, khó thụ thai, lưng gối đau mỏi, gân xương vô lực. Chữa khát nước, táo bón, đái rắt do âm hư. [66],[71],[72],[80].

9. Hải mã

- Tên khác: Cá ngựa

- Tên khoa học: *Hippocampus*

- Bộ phận dùng: Cả con cá ngựa đã phơi hay sấy khô của một số loài Cá ngựa (*Hippocampus spp.*), họ Cá chìa vôi (Syngnathidae).

- Thành phần hóa học: Cá ngựa là vị thuốc giàu protein, đặc biệt là chứa nhiều acid amin như glycin, alanin, acid glutamic, acid aspartic và Arginin. Ngoài ra, cá ngựa còn chứa các hợp chất khác như axit béo, peptit, sterit, dẫn xuất của acid phthalate và một số hợp chất khác.

- Tác dụng dược lý: Khi thủy phân và mô tả đặc tính của hai peptide hoạt tính sinh học (ALC và PEP) thu được từ cá ngựa giúp điều chỉnh đáng kể biểu hiện của

cyclin D và cyclin E và làm tăng sự phát triển tế bào và mức testosterone trong dòng tế bào Leydig của chuột. Dịch chiết qua rượu của hải mã có tác dụng kích thích cơ quan sinh dục chuột đực như túi tinh, tuyến tiền liệt phát triển và phát dục sớm hơn bình thường, ngoài ra còn có tác dụng làm tăng số lượng tinh trùng và tăng hoạt động tinh trùng của chuột.

- Tính vị quy kinh: Hải mã có vị ngọt, mặn, tính ấm. Quy kinh can, thận.

- Tác dụng: ôn thận tráng dương, tán kết tiêu thũng.

- Chủ trị: Chứng liệt dương, di tinh ở đàn ông, phụ nữ chậm có con do dương khí suy. Ngoài ra còn dùng trong chữa hen suyễn, thở khò khè, tiểu són,...[62],[71],[72],[81].

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ DỊCH CHIẾT LỤC VỊ ĐỊA HOÀNG GIA VỊ

1. **Nguồn gốc:** Dịch chiết "Lục vị địa hoàng gia vị" là sản phẩm được bào chế từ bài thuốc "Lục vị địa hoàng gia vị". Dịch chiết được bào chế theo phương pháp chiết xuất dược liệu với nước cất, chiết nóng (100⁰C, 2 lần), dịch chiết được loại tạp, cô dưới áp suất thấp thành dịch chiết 1:1.

Công thức bài thuốc:

STT	Tên vị thuốc	Tên khoa học	Hàm lượng
1	Thực địa	<i>Radix Rehmanniae glutinosae praeparata</i>	16g
2	Hoài sơn	<i>Dioscoreae persimilis Prain et Burkill</i>	8g
3	Sơn thù	<i>Fructus Corni officinalis</i>	8g
4	Trạch tả	<i>Rhizoma Alismatis</i>	6g
5	Phục linh	<i>Poria</i>	6g
6	Đan bì	<i>Cortex Radicis Paeoniae suffruticosae</i>	6g
7	Thỏ ty tử	<i>Semen Cuscutae</i>	15g
8	Nhục thung dung	<i>Herba Cistanches</i>	20g
9	Hải mã	<i>Hippocampus</i>	20g
Tổng bài thuốc			105g



2. Yêu cầu chất lượng

2.1. **Tính chất:** Dịch lỏng, màu nâu nhạt, không có nấm mốc, mùi thơm dược liệu, vị ngọt hơi đắng.

2.2. **Định tính:** Phải có phép thử định tính của các dược liệu thành phần (Thực địa, Hoài sơn, Sơn thù, Trạch tả, Phục linh, Đan bì, Thỏ ty tử, Nhục thung dung, Hải mã).

2.3. **Độ nhiễm khuẩn:** Tổng số vi sinh vật hiếu khí không quá 10⁴ CFU/g; tổng số nấm không quá 10² CFU/g; Không quá 10² CFU vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong 1 g. Không có *Salmonella* trong 10 g. Không có *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* trong 1 g. Phụ lục 13.6, "Thử giới hạn nhiễm khuẩn"- ĐDVN V.

3. Phương pháp thử

3.1. Tính chất

Thử bằng cảm quan, chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.

3.2. Định tính

Theo phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4- DDVN V)

3.3. Độ nhiễm khuẩn

Tiến hành thử theo phương pháp đĩa thạch, Phụ lục 13.6, “Thử giới hạn nhiễm khuẩn”- DDVN V.

4. Đóng gói, ghi nhãn, bảo quản

Đóng trong chai nhựa kín.

Nhãn rõ ràng, đúng quy chế.

Bảo quản nơi khô ráo, thoáng mát, tránh ánh sáng.

Hà Nội, ngày 22 tháng 02 năm 2024

CÔNG TY CP DƯỢC PHẨM PHÚ TÍN



GIÁM ĐỐC
T.S. B.S. *Đinh Minh Miền*

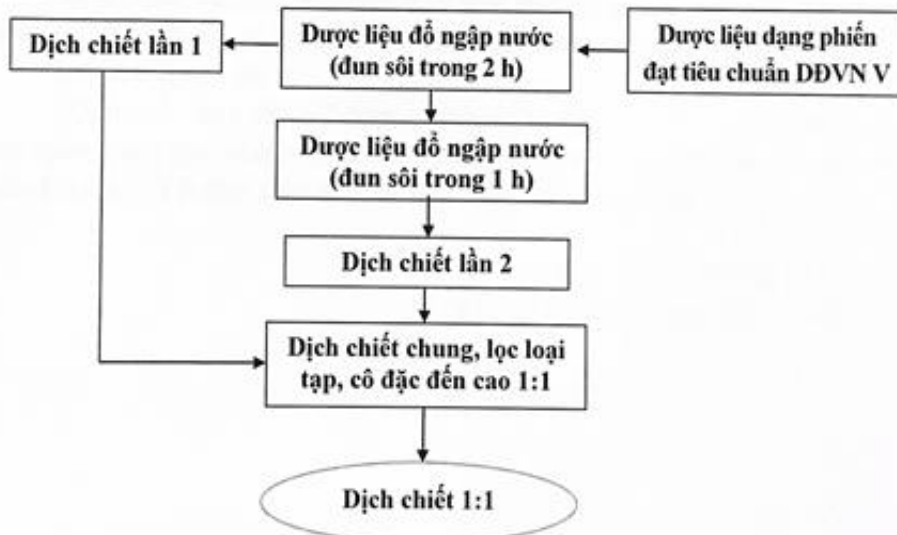


QUY TRÌNH BẢO CHẾ DỊCH CHIẾT BÀI THUỐC
“LỤC VỊ ĐỊA HOÀNG GIA VỊ”
(bào chế tại công ty cổ phần dược phẩm Phú Tín)

1. Thành phần bài thuốc “Lục vị địa hoàng gia vị”

STT	Tên vị thuốc	Tên khoa học	Hàm lượng
1	Thục địa	<i>Radix Rehmanniae glutinosae praeparata</i>	16g
2	Hoài sơn	<i>Dioscoreae persimilis Prain et Burkill</i>	8g
3	Sơn thù	<i>Fructus Corni officinalis</i>	8g
4	Trạch tả	<i>Rhizoma Alismatis</i>	6g
5	Phục linh	<i>Poria</i>	6g
6	Đan bì	<i>Cortex Radicis Paeoniae suffruticosae</i>	6g
7	Thỏ ty tử	<i>Semen Cuscutae</i>	15g
8	Nhục thung dung	<i>Herba Cistanches</i>	20g
9	Hải mã	<i>Hippocampus</i>	20g
Tổng bài thuốc			105g

2. Sơ đồ quy trình bào chế dịch chiết



Hình 1. Quy trình bào chế dịch chiết 1:1



3. Thuyết minh chi tiết quy trình:

3.1. Giai đoạn chuẩn bị:

- Kiểm tra vệ sinh và khả năng vận hành các máy móc và thiết bị liên quan,
- Kiểm tra và cân dược liệu,
- Chuẩn bị bao bì,
- Kiểm tra hồ sơ lô sản xuất kèm theo.

3.2. Giai đoạn chiết xuất:

- Dược liệu dạng phiến đạt tiêu chuẩn DDVN V, sau khi được cân theo tỷ lệ của bài thuốc được chuyển vào hệ thống chiết.

- Cho nước cất vào bình chiết, ngập trên dược liệu, đậy nắp kín, cài đặt các thông số và tiến hành chiết xuất theo điều kiện sau:

+ Lượng nước cất dùng chiết (lít): gấp 10 lần khối lượng dược liệu (kg).

+ Nhiệt độ chiết: 100°C.

+ Thời gian và số lần chiết: lần 1 đun sôi trong 120 phút, lần 2 đun sôi trong 60 phút.

Trong quá trình chiết xuất cần kiểm tra và kiểm soát tốt các thông số về nhiệt độ, thời gian và hoạt động của hệ thống chiết.

- Thu và xử lý dịch chiết:

Sau lần chiết đầu tiên, bơm dịch chiết sang bình trung gian qua hệ thống lọc dịch chiết. Sau đó cấp dung môi (nước cất) cho lần chiết thứ 2 và tiếp tục chiết xuất.

3.3. Quá trình cô đặc

+ Dịch chiết lần 1 và lần 2 được gộp chung và được chuyển từ bình chiết sang bình đựng trung gian nhờ bơm áp suất giảm và được lọc qua bộ lọc. Cô đặc dịch chiết đến cao 1: 1 ở điều kiện nhiệt độ 60°C, áp suất chân không 50 bar.

Ngày 22 tháng 02 năm 2024

CÔNG TY CP DƯỢC PHẨM PHÚ TÍN



GIÁM ĐỐC
T.S.BS. Đinh Minh Mão



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

GIẤY XÁC NHẬN

Bộ môn Dược lý, Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân y xác nhận học viên Nguyễn Quốc Nghĩa thực hiện nội dung nghiên cứu thực nghiệm của đề tài luận văn “Nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng sinh tinh của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị trên động vật thực nghiệm” tại Bộ môn từ 01/2024 đến 09/2024.

Các nội dung nghiên cứu:

- Đánh giá độc tính cấp của bài thuốc Lục vị địa hoàng gia vị nhục thung dung, hải mã, thỏ ty tử.
- Đánh giá tác dụng sinh tinh của bài thuốc “Lục vị địa hoàng” gia vị nhục thung dung, hải mã, thỏ ty tử trên mô hình chuột cống gây suy giảm sinh tinh bằng Natri Valproate.

Học viện Quân y xác nhận chữ ký của
Đại tá PGS.TS Nguyễn Hoàng Ngân,
Chủ nhiệm Bộ môn Dược lý là đúng



Đại tá
Vũ Đình Phú

Hà Nội, ngày 06 tháng 12 năm 2024
Chủ nhiệm Bộ môn

Đại tá PGS. TS. Nguyễn Hoàng Ngân