

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

HỌC VIỆN QUÂN Y

VŨ NGỌC THẮNG

**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 ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI- NĂM 2021

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

HỌC VIỆN QUÂN Y

VŨ NGỌC THẮNG

**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**

Chuyên ngành: Dược lý- Độc chất

Mã số: 9720118

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS. TS. Nguyễn Hoàng Ngân
2. PGS. TS. Nguyễn Minh Phương

HÀ NỘI- NĂM 2021

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện luận án này, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, động viên từ các Thầy Cô giáo, các đồng nghiệp, gia đình và bạn bè.

Lời đầu tiên, tôi xin trân trọng gửi lời cảm ơn sâu sắc đến các thầy hướng dẫn: **PGS. TS. Nguyễn Hoàng Ngân**- Phó Chủ nhiệm Bộ môn Dược lý, Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân y và **PGS. TS. Nguyễn Minh Phương**- Phó Chủ nhiệm Khoa Y học Quân binh chủng, Học viện Quân y đã hết lòng hướng dẫn, chỉ bảo, định hướng, giúp đỡ tôi ngay từ những ngày đầu tiên trong quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn **Sở Khoa học Công nghệ Cao Bằng** cùng các **thành viên thực hiện** đề tài “Nghiên cứu bào chế, tính an toàn và tác dụng sinh học của chế phẩm Trường Xuân CB từ bài thuốc với các dược liệu chính trên địa bàn tỉnh Cao Bằng” đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn **Th.S Nguyễn Thái Biêng**- Phụ trách Chủ nhiệm Bộ môn Dược lý, Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân y đã hết lòng giúp đỡ, tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong quá trình học tập, công tác và thực hiện luận án tại Bộ môn Dược lý.

Tôi xin trân trọng cảm ơn **TS. Trần Văn Tính**- Nguyên Phó Giám đốc Trung tâm Huyết học- Truyền máu, Bệnh viện 198, Bộ Công an; **PGS. TS. Thái Danh Tuyên**, Chủ nhiệm Bộ môn- Trung tâm Huyết học- Truyền máu, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y đã chỉ bảo, giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn **BS Phan Ngọc Minh**- nguyên Chỉ huy Trưởng Trung tâm nghiên cứu ứng dụng sản xuất thuốc, Học viện Quân y; Giám đốc Trung tâm Công nghệ sinh học Đông Nam Á đã tận tình giúp đỡ, tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện luận án.

*Tôi xin trân trọng cảm ơn **Th.S BS Nguyễn Thùy Linh**- Bộ môn Giải phẫu Bệnh lý- Pháy y, Bệnh viện Quân y 103 đã tận tình giúp đỡ tôi trong thời gian nghiên cứu tại Bộ môn.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn **KTV Bùi Văn Tám, KTV Nguyễn Thị Hồng Hạnh, KTV Đỗ Kiều Hưng** cùng toàn thể các thầy, cô, anh, chị, em ở **Bộ môn Dược lý, Viện Đào tạo Dược** đã luôn hỗ trợ, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và công tác tại Bộ môn.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn **TS. Tô Minh Hùng** cùng toàn thể đồng nghiệp tại **Viện Kiểm nghiệm nghiên cứu Dược và Trang thiết bị y tế Quân đội- Cục Quân y** đã luôn động viên, giúp đỡ tôi trong quá trình công tác và thực hiện luận án này.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn **Thủ trưởng, lãnh đạo Học viện Quân y; Phòng Sau đại học; Viện Đào tạo Dược- Học viện Quân y** đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận án.*

*Từ đáy lòng mình, xin cảm ơn gia đình, **cảm ơn vợ, các con, bố mẹ hai bên cùng toàn thể gia đình** đã luôn tin tưởng, động viên, chia sẻ, ủng hộ và giúp đỡ trong mọi lúc, mọi nơi. Xin cảm ơn tất cả những **người thân, bạn bè, đồng nghiệp** đã ủng hộ, giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án này.*

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan số liệu trong đề tài luận án là một phần số liệu trong đề tài nghiên cứu có tên: “Nghiên cứu bào chế, tính an toàn và tác dụng sinh học của chế phẩm Trường Xuân CB từ bài thuốc với các dược liệu chính trên địa bàn tỉnh Cao Bằng”. Kết quả đề tài này là thành quả nghiên cứu của tập thể mà tôi là một thành viên chính. Tôi đã được Chủ nhiệm đề tài và toàn bộ các thành viên trong nhóm nghiên cứu đồng ý cho phép sử dụng một phần kết quả của đề tài này vào trong luận án để bảo vệ lấy bằng tiến sĩ. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả

Vũ Ngọc Thắng

MỤC LỤC

Trang

Trang phụ bìa	
Lời cam đoan	
Mục lục	
Danh mục chữ viết tắt trong luận án	
Danh mục các bảng	
Danh mục các hình	
ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Rối loạn chức năng sinh sản, sinh dục nam	3
1.1.1. Suy sinh dục nam giới.....	3
1.1.2. Rối loạn cương dương.....	8
1.1.3. Vô sinh nam	13
1.2. Các mô hình dược lý nghiên cứu trên sinh sản, sinh dục nam	20
1.2.1. Nghiên cứu chất có hoạt tính androgen	20
1.2.2. Nghiên cứu trên hành vi tình dục.....	21
1.2.3. Nghiên cứu trên chức năng cương dương.....	22
1.2.4. Nghiên cứu trên khả năng sinh sản	27
1.3. Tình hình nghiên cứu về tác dụng của các chế phẩm từ dược liệu trên sinh sản, sinh dục nam	29
1.4. Tổng quan về viên nang Trường Xuân CB.....	30
1.4.1. Nguyên tắc điều trị suy giảm sinh sản sinh dục nam theo YHCT	30
1.4.2. Thành phần, công thức bào chế của viên nang Trường Xuân CB	31
1.4.3. Cơ sở lý luận của bài thuốc.....	31
1.4.4. Tác dụng dược lý, công năng của các dược liệu trong công thức	32
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	35
2.1. Đối tượng nghiên cứu	35

2.2. Động vật nghiên cứu	35
2.3. Thuốc, hóa chất, máy móc, thiết bị và dụng cụ phục vụ nghiên cứu ..	36
2.3.1. Thuốc và hóa chất	36
2.3.2. Máy móc, thiết bị và dụng cụ.....	37
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	38
2.4.1. Phương pháp chuẩn bị chế phẩm	38
2.4.2. Đánh giá độc tính của viên nang TXCB	39
2.4.3. Đánh giá tác dụng tăng cường chức năng sinh dục đực của viên nang TXCB	40
2.5. Xử lý số liệu	48
2.6. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	48
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	49
3.1. Kết quả đánh giá độc tính của viên nang TXCB	49
3.1.1. Độc tính cấp và liều LD ₅₀	49
3.1.2. Độc tính bán trường diễn	50
3.2. Kết quả đánh giá tác dụng của viên nang TXCB trên chức năng sinh dục đực	57
3.2.1. Hoạt tính androgen của viên nang TXCB trên chuột cống đực non thiến.....	57
3.2.2. Tác dụng trên chức năng cương dương	61
3.2.3. Tác dụng trên mô hình thỏ gây suy giảm sinh sản bằng fluconazol	71
Chương 4. BÀN LUẬN	93
4.1. Về đánh giá độc tính của viên nang TXCB	93
4.1.1. Độc tính cấp	93
4.1.2. Độc tính bán trường diễn	96
4.2. Về tác dụng của viên nang TXCB trên chức năng sinh dục đực	101
4.2.1. Hoạt tính androgen.....	101

4.2.2. Tác dụng trên khả năng cương dương	104
4.2.3. Nghiên cứu trên khả năng sinh sản	110
KẾT LUẬN	134
KIẾN NGHỊ	136
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN TÀI LIỆU THAM KHẢO PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT TRONG LUẬN ÁN

TT	Phần viết tắt	Phần viết đầy đủ
1	AI	Artificial insemination (thụ tinh nhân tạo)
2	ALT	Alanin aminotransferase
3	AMPv	Adenosin monophosphat vòng
4	ARI	Aromatase inhibitor (thuốc ức chế enzym aromatase)
5	AST	Aspartat transaminase
6	CN	Cavernous nerve (dây thần kinh hang)
7	DHEA	Dehydroepiandrosteron
8	ĐTĐ	Đái tháo đường
9	ED	Erectile dysfunction (rối loạn cương dương)
10	EL	Ejaculation latency (thời gian xuất tinh)
11	eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
12	FLZ	Fluconazol
13	FSH	Follicle stimulating hormone (hormon kích thích tạo nang trứng)
14	FT	Free testosterone (testosteron tự do)
15	GH	Growth hormone (hormon tăng trưởng)
16	GMPv	Guanosin monophosphat vòng
17	GnRH	Gonadotropin-releasing hormone (hormon giải phóng gonadotropin)
18	HBG	Hemoglobin
19	HCT	Hematocrit
20	HE	Nhuộm hematoxylin và eosin
21	HH	Hypogonadotropic hypogonadism (thiếu năng nội tiết hướng sinh dục)
22	ICI	Intracavernosal injection (tiêm vào vật hang)

23	ICP	Intracavernous pressure (áp lực xoang hang)
24	ICPmax	Áp lực xoang hang cực đại
25	ICSI	Intracytoplasmic sperm injection- (tiêm tinh trùng vào bào tương trứng)
26	IF	Intromission frequency (số lần thâm nhập âm đạo)
27	IHH	Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (suy tuyến sinh dục bẩm sinh)
28	IIEF	International Index Erectile Function (chỉ số quốc tế đánh giá chức năng cương dương)
29	IL	Intromission latency (thời gian thâm nhập)
30	IUI	Intrauterine insemination (bơm tinh trùng vào tử cung)
31	LH	Luteinizing hormone (hormon tạo hoàng thể)
32	LHRH	Luteinizing hormone-releasing hormone (hormon kích thích bài tiết LH)
33	MAP	Mean arterial blood pressure (huyết áp động mạch trung bình)
34	MCV	Mean corpuscular volume (thể tích trung bình hồng cầu)
35	MDA	Malondialdehyd
36	MH	Male hypogonadism (suy sinh dục nam)
37	MF	Mouting frequency (số lần tiếp cận)
38	ML	Mouting latency (thời gian tiếp cận)
39	nNOS	Neuronal nitric oxide synthase
40	NO	Nitric oxyd
41	NOS	Nitric oxyd synthase
42	OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (tổ chức hợp tác và phát triển kinh tế)

43	PDE	Phosphodiesterase (enzym phosphodiesterase)
44	PDE5	Phosphodiesterase type 5 (enzym phosphodiesterase typ 5)
45	PEI	Post ejaculation interval (khoảng cách sau xuất tinh)
46	PLT	Platelet count (số lượng tiểu cầu)
47	RBC	Red blood cell (số lượng hồng cầu)
48	SD	Standard deviation (độ lệch chuẩn)
49	SERM	Selective estrogen receptor modulators (các chất điều biến đặc hiệu thụ thể estrogen)
50	SHBG	Sex hormone binding globulin (globulin vận chuyển hormon giới tính)
51	STZ	Streptozotocin
52	TES	Testosteron
53	WBC	White blood cell (số lượng bạch cầu)
54	WHO	World Health Organization (Tổ chức Y tế thế giới)
55	YHCT	Y học cổ truyền

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
1.1.	Nguyên nhân vô sinh, các yếu tố liên quan và tỷ lệ	15
1.2.	Thành phần, công thức bào chế của TXCB	31
1.3.	Tác dụng dược lý, công năng của các dược liệu	33
2.1.	Động vật nghiên cứu	35
2.1.	Động vật nghiên cứu (tiếp theo)	36
2.2.	Quy trình nhuộm Papanicolaou	46
3.1.	Độc tính cấp theo đường uống của viên nang TXCB	49
3.2.	Trọng lượng cơ thể chuột ở các lô theo thời gian	50
3.3.	Ảnh hưởng của viên nang TXCB tới một số chỉ số hồng cầu	51
3.4.	Ảnh hưởng của viên nang TXCB tới số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu	52
3.5.	Ảnh hưởng của viên nang TXCB lên hoạt độ enzym AST và ALT	53
3.6.	Ảnh hưởng của viên nang TXCB lên nồng độ creatinin máu	53
3.7.	Ảnh hưởng của viên nang TXCB lên nồng độ albumin máu	54
3.8.	Ảnh hưởng của viên nang TXCB lên nồng độ cholesterol máu	54
3.9.	Trọng lượng cơ thể chuột ở các lô nghiên cứu	57
3.10.	Trọng lượng tương đối túi tinh chuột	58
3.11.	Trọng lượng tương đối tuyến tiền liệt chuột	59
3.12.	Trọng lượng tương đối tuyến Cowper chuột	59
3.13.	Trọng lượng tương đối đầu dương vật chuột	60
3.14.	Trọng lượng tương đối cơ nâng hậu môn hành hang chuột	61
3.15.	Trọng lượng cơ thể chuột ở các thời điểm nghiên cứu	62
3.16.	Nồng độ glucose máu chuột nghiên cứu	63
3.17.	Giá trị ICP nền của các lô nghiên cứu	64

3.18.	Giá trị ICP max của các lô nghiên cứu	65
3.19.	Diện tích dưới đường cong của ICP	66
3.20.	Huyết áp động mạch trung bình chuột ở các lô	69
3.21.	Tỉ số ICP max và MAP của chuột ở các lô	70
3.22.	Nồng độ testosterone trong huyết thanh chuột	70
3.23.	Trọng lượng thỏ tại các thời điểm nghiên cứu	71
3.24.	Thời gian tiếp cận của thỏ đực	72
3.25.	Thể tích tinh dịch thỏ tại các thời điểm	73
3.26.	pH tinh dịch thỏ tại các thời điểm nghiên cứu	74
3.27.	Mật độ tinh trùng thỏ tại các thời điểm nghiên cứu	75
3.28.	Tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh	76
3.29.	Tỉ lệ tinh trùng di động tại các thời điểm	78
3.30.	Tỉ lệ tinh trùng di động tiến tới	79
3.31.	Tỉ lệ tinh trùng di động không tiến tới	80
3.32.	Tỉ lệ tinh trùng không di động	81
3.33.	Tỉ lệ tinh trùng chết tại các thời điểm	82
3.34.	Tỉ lệ tinh trùng có hình thái bất thường	84
3.35.	Nồng độ testosterone huyết thanh thỏ	86
3.36.	Nồng độ MDA trong huyết thanh thỏ	87
3.37.	Nồng độ MDA trong tinh dịch thỏ	89
3.38.	Tỉ lệ thụ thai và số con sinh ra	90

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
1.1.	Sản xuất TES và điều hòa sản xuất TES	3
1.2.	Nồng độ TES tổng, SHBG và TES tự do ở nam giới theo tuổi	4
2.1.	Dụng cụ lấy tinh (âm đạo giả)	43
3.1.	Hình ảnh đại thể gan, lách, thận của chuột ở các lô nghiên cứu	55
3.2.	Hình ảnh vi thể gan của chuột ở các lô nghiên cứu	56
3.3.	Hình ảnh vi thể lách của chuột ở các lô nghiên cứu	56
3.4.	Hình ảnh vi thể thận của chuột ở các lô nghiên cứu	57
3.5.	Đồ thị ICP và MAP của lô chứng (chuột số 04)	67
3.6.	Đồ thị ICP và MAP của lô mô hình (chuột số 02)	67
3.7.	Đồ thị ICP và MAP của lô sildenafil (chuột số 06)	68
3.8.	Đồ thị ICP và MAP của lô chế phẩm (chuột số 06)	68
3.9.	Hình ảnh nhuộm đánh giá sự sống- chết của tinh trùng	83
3.10.	Hình ảnh nhuộm đánh giá hình thái tinh trùng	85
3.11.	Hình ảnh mô bệnh học tinh hoàn thỏ	91
4.1.	Sơ đồ sinh tổng hợp TES ở tế bào Leydig	117

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, suy giảm chức năng sinh dục, sinh sản ở nam giới là bệnh lý có tỷ lệ mắc ngày càng tăng. Theo các nghiên cứu thì có khoảng 20- 30% nam giới trưởng thành có ít nhất một rối loạn chức năng sinh sản, sinh dục (khá thường xuyên, thường xuyên, gần như luôn luôn và luôn luôn) [1]. Có nhiều nguyên nhân gây nên tuy nhiên đáng chú ý là tỉ lệ mắc bệnh ngày càng cao ở nam giới do lối sống, sinh hoạt thiếu lành mạnh, chế độ ăn uống thiếu kiểm soát (làm mắc các bệnh rối loạn chuyển hóa: tim mạch, đái tháo đường, rối loạn lipid máu...) [2]. Suy giảm chức năng sinh dục, sinh sản ở nam giới không những ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe của nam giới mà còn ảnh hưởng lớn đến chất lượng cuộc sống tinh thần cũng như hạnh phúc gia đình của họ. Các thuốc điều trị nội khoa hiện nay chủ yếu là sử dụng liệu pháp hormon thay thế [2], chỉ có hiệu quả điều trị trong một số ít trường hợp nhất định hơn nữa có nguy cơ xảy ra tai biến khi sử dụng dài ngày. Do đó, nghiên cứu sản xuất ra các sản phẩm điều trị suy giảm chức năng sinh dục, sinh sản nam, đảm bảo tính an toàn và hiệu quả điều trị là việc làm mang nhiều ý nghĩa.

Nước ta có nhiều vùng khí hậu khác nhau, có hệ động, thực vật phong phú với nhiều loại dùng để làm thuốc, trong đó có nhiều dược liệu quý, nhiều dược liệu đặc hữu. Cho đến nay, dược liệu vẫn đã và đang được sử dụng ngày càng nhiều và đóng vai trò quan trọng trong điều trị nói chung và trong điều trị các bệnh lý liên quan đến sinh sản, sinh dục nam nói riêng. Tuy nhiên, việc sử dụng dược liệu vẫn chủ yếu dựa vào kinh nghiệm, chưa có nhiều bằng chứng khoa học. Hơn nữa, dược dùng nhiều dưới dạng bào chế của y học cổ truyền, chưa thực sự thuận tiện cho bệnh nhân. Viên nang Trường Xuân CB là sản phẩm của đề tài nghiên cứu khoa học cấp tỉnh, được bào chế từ các dược liệu theo bài thuốc của y học cổ truyền với định hướng điều trị một số vấn đề về suy giảm chức năng sinh dục, sinh sản nam.

Một số dược liệu trong công thức bào chế của viên nang Trường Xuân CB đã được chứng minh có tác dụng khả quan trên sinh sản, sinh dục nam giới [3], [4]; tuy nhiên tác dụng khi kết hợp dưới dạng viên nang thì chưa được chứng minh. Hơn nữa, mặc dù chế phẩm được nghiên cứu chuyển dạng bào chế từ bài thuốc y học cổ truyền tuy nhiên trước khi có thể được đưa vào sử dụng trên người, chế phẩm cần phải trải qua giai đoạn đánh giá tính an toàn và tác dụng trên động vật thực nghiệm.

Xuất phát từ những lý do trên, đề tài: **“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”** được thực hiện với 2 mục tiêu sau:

1. Đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của viên nang Trường Xuân CB trên động vật thực nghiệm.
2. Đánh giá tác dụng tăng cường chức năng sinh dục đực của viên nang Trường Xuân CB trên động vật thực nghiệm.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Rối loạn chức năng sinh sản, sinh dục nam

1.1.1. Suy sinh dục nam giới

1.1.1.1. Khái niệm và phân loại

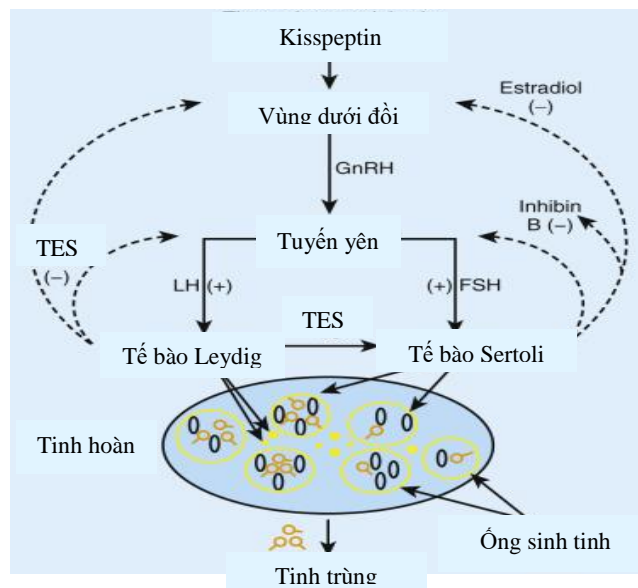
- Suy sinh dục nam (male hypogonadism- MH) là một rối loạn liên quan đến giảm hoạt động chức năng của tinh hoàn, giảm sản xuất nội tiết tố androgen, inhibin B và/hoặc suy giảm sản xuất tinh trùng [5].

- MH có thể có 4 dạng là [6]: MH nguyên phát do suy tinh hoàn; MH thứ phát do rối loạn chức năng dưới đồi- tuyến yên; suy sinh dục nam khởi phát muộn (Late onset hypogonadism), bao gồm: do tuổi, béo phì, do bệnh mắc kèm khác... và MH do mất nhạy cảm với receptor của androgen.

- Theo YHCT đến tuổi 40, thận khí bắt đầu suy; đến gần tuổi 50, dương khí bắt đầu suy làm da khô, nhăn nheo, tóc bạc (TES sụt giảm, xuất hiện các triệu chứng mãn dục nam- Thiên quý suy). Mãn dục nam nặng (Thiên quý kiệt) là khi những triệu chứng của mãn dục nam xuất hiện rõ rệt và nặng [7].

1.1.1.2. Sinh lý quá trình bài tiết testosterone và nguyên nhân suy giảm

Sự sản xuất TES và điều hòa sản xuất TES được thể hiện trong hình 1.1:

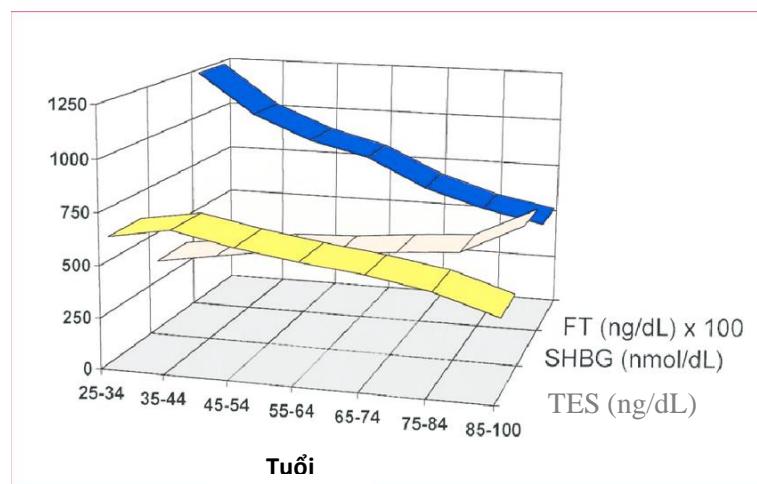


Hình 1.1. Sản xuất TES và điều hòa sản xuất TES

* Nguồn: theo Peter Y. Liu và cs (2019) [8]

Sự sản xuất TES và hormon tăng trưởng đạt đến đỉnh điểm ở tuổi vị thành niên và sau đó bắt đầu giảm. Bình thường nồng độ TES trong máu từ 200- 400 ng/dL [9]. TES trong máu lưu hành ở 3 dạng: TES tự do (chiếm 2- 3%), TES liên kết với albumin (53- 55%) và TES liên kết với SHBG (sex hormone binding globulin) (43- 45%); TES có tác dụng là dạng tự do và gắn với albumin [10].

Đàn ông tuổi càng cao thì hàm lượng androgen ngày càng suy giảm. Sự suy giảm TES bắt đầu xảy ra từ 30 tuổi và hàng năm có sự suy giảm đáng kể về nồng độ TES [11]. Điều này càng rõ ràng hơn khi bước vào độ tuổi từ 45- 50 [12], hàng năm sự sản xuất TES giảm từ 0,8- 1,3% và từ 30- 50% ở độ tuổi 50- 70 [11].



Hình 1.2. Nồng độ TES tổng, SHBG và TES tự do (FT) ở nam giới theo tuổi

* Nguồn: theo Comhaire F. H. (2000) [12]

Ít nhất một phần ba nam giới trên 50 tuổi có sự suy giảm đáng kể nồng độ TES trong máu vào sáng sớm xuống dưới 375 ng/dL [12]. Khoảng 30% nam giới 60- 70 tuổi và 70% nam giới 70- 80 tuổi có nồng độ TES hoạt động hoặc nồng độ TES tự do thấp [13]. Có sự suy giảm sớm hơn và mạnh hơn nồng độ của TES tự do so với tổng TES, đó là do kết quả của việc tăng khả năng liên kết của TES trong huyết thanh. Sự tăng nồng độ của SHBG có liên quan đến sự thay đổi của tỷ lệ estrogen/androgen [12].

Có thể tổng hợp nguyên nhân gây suy giảm TES như sau:

- Tuổi tác: TES được sinh sản từ tinh hoàn (> 95%) và tuyến thượng thận (khoảng 4%). Tuổi càng cao, các tổ chức trong cơ thể đều bị suy thoái trong đó có tinh hoàn và tuyến thượng thận [11].

- Nguyên nhân ở tinh hoàn như: giảm số lượng và chức năng của tế bào Leydig; tăng xơ hóa và các thay đổi thoái hóa khác ở tinh hoàn; giảm tưới máu tinh hoàn gây thiếu oxy ở các mô; thay đổi trong tổng hợp steroid do tình trạng thiếu oxy ở các mô gây giảm tổng hợp DHEA [11].

- Do mất sự cân bằng điều chỉnh nội tiết tố: Ở người cao tuổi, có sự suy thoái, giảm số lượng tế bào Leydig cho nên dù LH có tăng hơn bình thường để kích thích sản xuất TES nhưng lượng TES vẫn suy giảm. Một số nguyên nhân khác: Do di truyền; do chế độ ăn uống sinh hoạt; do thuốc, hóa chất: Dùng quá nhiều các loại corticoid hoặc các thuốc đối kháng với nội tiết tố nam [14].

1.1.1.3. Triệu chứng của suy sinh dục nam

Sự suy giảm nồng độ androgen là ngấm ngấm và từ từ, hơn nữa không phải nam giới cao tuổi nào cũng suy giảm nồng độ hormon đến mức biểu hiện thành các triệu chứng lâm sàng. Hình ảnh lâm sàng của MH được đặc trưng bởi sự giảm ham muốn tình dục và khả năng cương dương, giảm hoạt động trí tuệ, mệt mỏi, trầm cảm, thay đổi da, giảm lông trên cơ thể, giảm mật độ xương dẫn đến hội chứng loãng xương, tăng mỡ nội tạng và béo phì.

Có thể được chia 3 nhóm triệu chứng: triệu chứng tâm lý, triệu chứng về thực thể và sự thỏa mãn về tình dục [12].

- Các triệu chứng tâm lý bao gồm: tâm trạng chán nản, hay cáu gắt, lo lắng và căng thẳng thần kinh [11].

- Các triệu chứng về thực thể bao gồm đổ mồ hôi (có thể xảy ra theo đợt), có thể cùng với bốc hỏa; tăng nhu cầu ngủ, rối loạn giấc ngủ; suy nhược cơ thể và suy giảm sức khỏe. Suy giảm trí nhớ và khả năng tập trung... [12]. Giảm khối lượng cơ, giảm trương lực cơ; giảm mật độ khoáng trong xương; biến dạng

da, lông, tóc, móng; suy giảm hệ thống tạo máu [11]. Tăng khối lượng mỡ (nhất là béo bụng), mỡ cơ thể và mỡ nội tạng tăng lên, gây nguy cơ mắc bệnh tim mạch; khả năng kháng insulin cao hơn; mất dần khối lượng xương dẫn đến loãng xương và tăng nguy cơ gãy xương. Sau đó thường làm nguyên nhân gây tử vong ở nam nhiều hơn nữ [12].

- Các triệu chứng tình dục bao gồm rối loạn cương dương do giảm sự cương cứng, giảm cảm giác cực khoái, giảm số lượng và chất lượng tinh trùng và giảm ham muốn tình dục. Ngoài ra, sự cương cứng về đêm và sáng sớm xảy ra ít hơn và dương vật ít cương cứng hơn [12].

Một số bệnh chuyển hóa, chẳng hạn như đái tháo đường (ĐTĐ), có thể dẫn đến các triệu chứng gần giống với MH. Do đó, bệnh nhân ĐTĐ nên được điều trị thích hợp, vì việc theo dõi và điều trị ĐTĐ đúng cách có thể dễ dàng đảo ngược một số triệu chứng được cho là do MH [15].

1.1.1.4. Chẩn đoán

Dựa vào các triệu chứng lâm sàng: Cần có 1 triệu chứng về sinh dục sinh sản và 2 triệu chứng toàn thân là đủ để định hướng chẩn đoán về MH [11].

Có thể dựa vào bệnh sử, đánh giá theo thang điểm dựa theo các bộ câu hỏi [16]. Tuy nhiên cần phải loại trừ các bệnh toàn thân khác thường xảy ra ở người cao tuổi như ĐTĐ...

Cận lâm sàng: Định lượng các hormon trong máu: LH, FSH, prolactin, estradiol và TES. Trong đó định lượng TES vào buổi sáng là quan trọng nhất [11]. Một số loại TES có thể được đánh giá là tổng hàm lượng TES, hàm lượng TES tự do. Ngoài ra một số xét nghiệm khác cũng có thể hữu ích như: SHBG, đo mật độ xương, các chỉ số lipid máu...[12].

Nồng độ TES tự do < 70 ng/L được chẩn đoán là MH [17].

Với những triệu chứng của y học hiện đại nêu trên, nhiều bệnh lý của YHCT sau đều thuộc về hội chứng mãn dục nam: Thận âm hư; thận dương hư;

thận âm dương lưỡng hư; tâm hỏa động; tâm thận bất giao; can hỏa vượng; can khí uất kết; tỳ dương hư; tỳ thận dương hư; tỳ hư thấp trệ... [7].

1.1.1.5. Điều trị

Nguyên tắc cơ bản của điều trị là bổ sung, phục hồi hàm lượng TES trong máu. Tuy nhiên việc dùng TES cần thận trọng trên những bệnh nhân MH kèm theo đang có bệnh tăng sinh lành tính tuyến tiền liệt, ung thư tuyến tiền liệt [11].

Việc sử dụng TES dùng đường uống điều trị MH ít được lựa chọn bởi nó bị chuyển hóa gần như hoàn toàn qua gan lần đầu và có sự chênh lệch đáng kể giữa nồng độ TES đạt được và nồng độ dihydrotestosteron trong huyết tương. Hơn thế nữa, để dùng đường uống cần dùng liều khá cao là 40- 80 mg/lần x 2- 3 lần/ngày [18].

Phổ biến, tiêm bắp TES liều 200 mg 2- 3 tuần/lần, có thể sử dụng dihydrotestosteron với đường dùng qua da. Miếng dán da bìu có thể duy trì nồng độ TES ở mức bình thường trong 4- 8 giờ, sau đó sẽ giảm dần [18].

Ngoài ra, để có hiệu quả điều trị cao cần kết hợp điều trị các triệu chứng về tâm lý, thực thể và tình dục. Về rối loạn chức năng tình dục, điều trị bằng thuốc ức chế phosphodiesterase (PDE). Tuy các thuốc này thường cải thiện chất lượng cương cứng, nhưng thường không đảo ngược được sự suy giảm vì ham muốn không được phục hồi và các yếu tố tâm lý vẫn còn tồn tại.

Theo YHCT, phương pháp điều trị không dùng thuốc là: Thay đổi lối sống; tâm lý trị liệu theo YHCT; thực dưỡng trị liệu; châm cứu; xoa bóp, bấm huyệt; tập luyện (dưỡng sinh, yoga, khí công...) [7]. Phương pháp dùng thuốc là: sử dụng một số dược liệu: lộc nhung, tắc kè, hải mã, tinh hoàn của động vật, sâm dương hoắc, ba kích thiên, đỗ trọng, nhục thung dung, cầu tích, bá bệnh, phá cô chi... [7].

1.1.2. Rối loạn cương dương

1.1.2.1. Khái niệm

Rối loạn cương dương (erectile dysfunction- ED) là một rối loạn chức năng tình dục ở nam giới được định nghĩa là dương vật không có khả năng cương cứng hoặc duy trì sự cương cứng đủ để quan hệ tình dục [19].

ED là bệnh lý mang tính xã hội; tuy bệnh không gây tử vong, không cần cấp cứu nhưng đã dần dần ảnh hưởng đến cuộc sống của người bệnh, có thể là nguồn gốc sinh ra nhiều bệnh khác về tâm thần kinh... [20].

1.1.2.2. Dịch tễ

Đây là một rối loạn phổ biến và tỷ lệ mắc tăng theo tuổi, đặc biệt là ở nam giới từ 50 tuổi trở lên [1]. Tỷ lệ hiện mắc ước tính ở nam giới trên 40 tuổi là khoảng 50% [21]. Ở Mỹ, dữ liệu cho thấy ED ảnh hưởng đến hơn 70% nam giới trên 70 tuổi, trong khi các nghiên cứu khác cho thấy tần suất mắc ED ở nam giới trên 20 tuổi là 18,4%, tức khoảng 18 triệu nam giới [22]. ED có liên quan đến một số bệnh lý mãn tính ngày càng phổ biến ở những người đàn ông lớn tuổi, chẳng hạn như ĐTĐ và bệnh tim mạch hoặc thần kinh và điều này ít nhất có thể giải thích phần nào sự gia tăng tỷ lệ mắc bệnh ở những người đàn ông lớn tuổi.

Ngoài ra, ED là một bệnh đi kèm phổ biến ở những người đàn ông béo phì, đặc biệt là sự hiện diện của các yếu tố nguy cơ tim mạch khác như ĐTĐ, rối loạn lipid máu hoặc tăng huyết áp [23]. Tuy nhiên, ED không chỉ là vấn đề ảnh hưởng đến đàn ông lớn tuổi: khoảng 25% trường hợp xảy ra ở nam giới dưới 40 tuổi [24], và tỷ lệ mắc đang gia tăng ở nhóm tuổi này [25].

1.1.2.3. Sinh lý sự cương dương

Hệ thống cương dương vật bao gồm 2 ống thể hang, tạo thành khoang cương cứng chính và 1 ống thể xốp. Các khoang này được cung cấp máu bởi động mạch thẹn trong thông qua các động mạch: động mạch lưng nằm trên lưng dương vật; động mạch thể hang và động mạch thể xốp. Động mạch thể hang

chia thành nhiều tiểu động mạch xoắn, đổ vào các xoang hang. Máu trở lại từ thể hang thông qua các tĩnh mạch liên lạc, chạy xiên giữa lớp bên trong và bên ngoài của lớp vỏ trắng; cấu trúc giải phẫu này rất cần thiết cho sự chèn ép của các tĩnh mạch và chức năng cương dương [26]. Cương dương là kết quả của sự giãn của các cơ trơn vật hang, làm máu đến các xoang rỗng của vật hang, do đó làm cho các tĩnh mạch bị chèn ép và máu không thoát về được [19].

Quá trình co thắt và giãn nở của cơ mạch máu dương vật làm cho dương vật lúc mềm xìu lúc cương cứng được điều khiển do 2 cơ chế chính là cơ chế thần kinh và hóa sinh [20]. Trong đó, đóng vai trò “chìa khóa” là cơ chế hóa sinh thông qua nitric oxyd (NO). Sau các kích thích về tình dục, NO được tổng hợp từ L- arginin được sản sinh vào các cơ trơn, tế bào nội mạc mạch máu và các tế bào cơ trơn vật hang. Sau khi khuếch tán qua các tế bào cơ trơn vật hang, NO kích thích enzym guanyl cyclase sản xuất ra các chất dẫn truyền thứ phát là guanosin monophosphat vòng (GMPv). GMPv giữ vai trò chính trong việc làm giãn các cơ trơn của vật hang và làm cho dương vật cương cứng lên. GMPv bị thủy phân và mất tác dụng bởi enzym PDE, làm cho dương vật mềm xìu trở lại. PDE có trong nhiều tổ chức khác nhau, đặc biệt ở vật hang và chiếm ưu thế là PDE type 5 (PDE5). Các thuốc ức chế PDE5 ngăn chặn quá trình thủy phân của GMPv làm giãn cơ trơn vật hang và làm cho dương vật giữ được độ cương cứng [20].

1.1.2.4. Nguyên nhân và yếu tố nguy cơ của rối loạn cương dương

Có nhiều nguyên nhân gây lên ED, các nguyên nhân chính bao gồm:

- Nguyên nhân do nội tiết: Thiếu hụt androgen làm giảm sự cương cứng về đêm và ham muốn tình dục [27]. Tuy nhiên, chức năng cương dương đáp ứng với kích thích tình dục bằng thị giác vẫn được bảo tồn ở nam giới bị suy sinh dục, do đó androgen có vai trò không lớn với sự cương dương. Tuy nhiên, TES rất quan trọng với vai trò của NO synthase (NOS) và PDE5 bên trong dương vật [27].

- ED do thần kinh như: Nhiễm độc thần kinh do nghiện rượu, hút thuốc lá, sử dụng các chất ma túy; ĐTD gây rối loạn hệ thần kinh ngoại vi; chấn thương như chấn thương cột sống...

+ Sau các phẫu thuật: phẫu thuật vùng bàng quang, vùng bẹn bìu, các phẫu thuật bàng quang niệu đạo. Các phẫu thuật trên ảnh hưởng đến hệ thần kinh sinh dục như thần kinh thẹn trong, các thần kinh cương dương vật.

+ Một số bệnh ở vùng não: động kinh, liệt toàn thân do giang mai, nhũn não, bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer... [20].

- ED do tâm thần: do stress; do bị các chấn động tâm thần đột ngột hoặc mắc một số bệnh tâm thần: tâm thần phân liệt...

- ED do vận mạch: do sự tưới máu vào dương vật không đầy đủ như bệnh huyết áp thấp...; do hiện tượng chít tắc cơ giới một số động mạch có chức năng tưới máu dương vật: bệnh chít hẹp động mạch chủ ở chỗ phân nhánh động mạch chậu (Hội chứng Leriche). Xơ vữa động mạch vùng chậu. Chít hẹp động mạch dương vật.

- ED do các biến dạng

+ Một số bệnh bẩm sinh: dương vật teo nhỏ, dương vật quá ngắn, dương vật chẻ đôi...

+ Một số bệnh bị xơ cứng vật hang: như bệnh La Peyrorie hoặc xơ cứng vật hang hậu quả của một số bệnh như vỡ vật hang, cương đau dương vật không được điều trị tốt.

- **Yếu tố nguy cơ của ED:** Những yếu tố nguy cơ của ED gồm có: tuổi tác, tuổi càng cao nguy cơ ED càng lớn; hút thuốc lá; béo phì; các bệnh lý tim mạch và rối loạn chuyển hóa như tăng huyết áp, rối loạn chuyển hóa lipid, ĐTD [19]. Ngoài ra, sự gia tăng của những bệnh nhân nam bị phẫu thuật vùng chậu, xạ trị vùng chậu làm tăng thêm nguy cơ ED.

Những bệnh nhân bị mắc bệnh mạch máu có nguy cơ cao hơn bị ED và những yếu tố nguy cơ của xơ vữa động mạch cũng là những yếu tố nguy cơ của

ED. Các gốc tự do, các chất oxi hóa làm tăng nguy cơ xơ vữa động mạch do đó cũng là yếu tố nguy cơ của ED [28].

Ở những bệnh nhân chạy thận nhân tạo, tỷ lệ mắc ED cũng khá cao như theo nghiên cứu của Arslan và cộng sự (2002), tỷ lệ này là 80,7%, trong đó ở bệnh nhân trên 50 tuổi là 86,6% [29].

1.1.2.5. Chẩn đoán rối loạn cương dương

- Việc chẩn đoán ED cần tiến hành đầy đủ và nghiêm túc. Phải có sự cộng tác chặt chẽ giữa thầy thuốc và bệnh nhân. Việc chẩn đoán dựa vào lý do đến khám bệnh của bệnh nhân [20] và dựa vào bản chỉ số quốc tế về chức năng cương dương vật (IIEF- International Index Erectile Function).

Thang điểm IIEF đã được sử dụng tại nhiều quốc gia, là phương pháp đơn giản, đáng tin cậy, đa chiều để đánh giá tình trạng ED. Ngoài ra còn được sử dụng để đánh giá hiệu quả của quá trình điều trị, là tiêu chuẩn để bệnh nhân có thể tự theo dõi điều trị. Hiện nay có 2 loại thang điểm IIEF là thang điểm IIEF- 5 và IIEF- 15.

+ Thang điểm IIEF- 15 có 15 câu hỏi đánh giá 5 lĩnh vực trong đời sống tình dục nam giới. Điền vào bộ câu hỏi IIEF, mỗi câu từ 1- 5 điểm; điểm 0 giành cho những trường hợp không có khả năng hoạt động tình dục, không giao hợp được hoặc không có ý muốn giao hợp trong 4 tuần lễ. Thang điểm IIEF- 15 được một số tác giả sử dụng trong nghiên cứu [29].

+ Thang điểm IIEF- 5 gồm 5 câu hỏi, mỗi câu hỏi có điểm từ 1- 5. Tổng điểm từ 5- 25; nếu điểm từ 22- 25: chức năng cương dương bình thường; từ 17- 21: mức độ nhẹ; từ 12- 16: mức độ nhẹ đến trung bình; từ 8- 11: mức độ trung bình; từ 5- 7: mức độ nặng. Thang điểm IIEF- 5 cũng được một số tác giả sử dụng trong chẩn đoán, đánh giá tình trạng ED [30].

- Ngoài ra, cần dựa vào bệnh sử nội khoa (tiền sử các bệnh tim mạch; ĐTĐ; viêm đường tiết niệu; các tập quán: nghiện rượu, thuốc lá, ma túy...); bệnh sử ngoại khoa (các chấn thương vùng chậu- sinh dục; các phẫu thuật đã

trải qua ở vùng tiểu khung, vùng sinh dục) và trạng thái tâm lý- xã hội khi bắt đầu bị ED.

1.1.2.6. Điều trị

ED là một bệnh lý do nhiều nguyên nhân khác nhau, muốn điều trị có kết quả cần tìm được chính xác nguyên nhân chủ yếu gây nên. Hiện nay, có 3 nhóm phương pháp điều trị ED được xếp lần lượt theo thứ tự ưu tiên là:

Nhóm 1: Sử dụng các thuốc điều trị đường uống.

Nhóm 2: Đặt alprostadil vào niệu đạo, bôi ngoài alprostadil; tiêm vào vật hang (ICI); bơm hút chân không.

Nhóm 3: Phẫu thuật đặt thể hang hỗ trợ; phẫu thuật chỉnh sửa mạch máu [20], [27].

- Các chất ức chế PDE5 như sildenafil, được giới thiệu vào những năm 1990 và là lựa chọn đầu tay điều trị ED. Thuốc ức chế PDE5 không xâm lấn, thường dung nạp tốt và hiệu quả ở một tỷ lệ lớn nam giới. Tuy là thuốc lựa chọn đầu tay nhưng vẫn có khoảng 25- 50% bệnh nhân không đáp ứng hoặc bị chống chỉ định. Các phương pháp điều trị thay thế như ICI, đặt vào niệu đạo các chế phẩm của alprostadil; dùng thiết bị hút chân không (vacuum devices); phẫu thuật đặt thể hang giả (penile prosthesis) có thể được xem xét [31].

- ICI đã được chứng minh hiệu quả lâm sàng ở 54- 100% bệnh nhân, tỷ lệ ngừng thuốc sớm $\leq 38\%$ và các tác dụng phụ $\leq 26\%$. Thuốc được sử dụng cho liệu pháp thường là alprostadil, hiện nay có thể sử dụng dạng phối hợp giữa aviptadil và phentolamin [31].

+ Trong trường hợp đơn trị liệu thất bại, có thể sử dụng liệu pháp phối hợp [31], ví dụ chế phẩm Trimix chứa alprostadil, papaverin và phentolamin hoặc chế phẩm Bimix có chứa 2 hoạt chất. Hơn nữa, atropin có thể được thêm vào chế phẩm phối hợp của phentolamin, papaverin và alprostadil thành dạng Quadmix [32].

+ Alprostadil là một dạng tổng hợp của prostaglandin E1. Cơ chế hoạt động của nó là bằng cách liên kết với các thụ thể prostaglandin E1 dẫn đến hoạt hóa các thụ cảm thể của prostaglandin trên cơ trơn thể hang, làm thư giãn cơ trơn và lưu thông máu qua các xoang hang để lấp đầy các xoang hang. Tác dụng phụ có liên quan đến vị trí tiêm bao gồm cương đau dương vật (priapism) và xơ hóa dương vật khi sử dụng lâu dài [32].

+ Papaverin là một chất ức chế PDE5 không chọn lọc dẫn đến tăng AMPv nội bào (ức chế sự giáng hóa AMPv bằng cách ức chế PDE), giảm nồng độ calci nội bào và giãn cơ trơn sau đó. Tác dụng phụ đáng chú ý là xơ hóa dương vật và cương đau dương vật. Papaverin là thuốc tiêm vào vật hang đầu tiên được sử dụng, lần đầu được báo cáo bởi Virag và cộng sự vào năm 1984 với tỷ lệ hiệu quả là 66% sau 12 tháng [31].

+ Phentolamin là một chất đối kháng alpha- adrenergic không chọn lọc, ức chế sự co cơ trơn với tác dụng giãn trực tiếp lên cơ trơn và mạch máu của thể hang. Phentolamin có hiệu quả yếu như một tác nhân đơn lẻ và không còn được sử dụng như đơn trị liệu; tuy nhiên, nó có thể được sử dụng trong liệu pháp kết hợp [31].

Thuốc YHCT: Bài thuốc bát vị hoàn (gồm thực địa, hoài sơn, sơn thù, kỷ tử, thỏ ty tử, đỗ trọng, đương quy...) kết quả điều trị trên bệnh nhân ED có 60,3% có kết quả tốt; 28,5% có kết quả trung bình [33].

1.1.3. Vô sinh nam

1.1.3.1. Khái niệm vô sinh

Theo định nghĩa của WHO: Một cặp vợ chồng mới cưới, có sức khỏe bình thường, sau 12 tháng chung sống trong sinh hoạt tình dục không sử dụng bất kỳ biện pháp tránh thai nào mà không có con, hoặc người vợ có thai nhưng lần nào cũng bị sảy thai được xếp vào nhóm bị mắc bệnh vô sinh. Vô sinh được chia thành 2 loại: vô sinh nguyên phát và vô sinh thứ phát. Vô sinh nguyên phát

là trường hợp một cặp vợ chồng chưa từng có thai. Vô sinh thứ phát là trường hợp cặp vợ chồng đã có thai ít nhất một lần [34].

1.1.3.2. Dịch tễ

Vô sinh đã được WHO đánh giá là một vấn đề sức khỏe cộng đồng [35]. Tuy nhiên, về tỉ lệ mắc có nhiều nghiên cứu đưa ra những số liệu khác nhau.

Năm 2006, ước tính có khoảng 72,4 triệu cặp vợ chồng trên toàn cầu bị vô sinh [35]. Tuy nhiên, một nghiên cứu khác đã báo cáo có khoảng 48,5 triệu cặp vợ chồng vô sinh trong năm 2010 [36]. Nhìn chung, tỷ lệ mắc vô sinh trung bình của các cặp vợ chồng được ước tính là 9%, với tỷ lệ 3,5%- 16,7% ở các nước phát triển và 6,9- 9,3% ở các nước kém phát triển [35].

1.1.3.3. Nguyên nhân vô sinh nam

- Có nhiều nguyên nhân dẫn đến vô sinh, trong đó nguyên nhân do nữ chiếm khoảng 30- 40%, vô sinh nam khoảng 40%, khoảng 20% do cả hai vợ chồng và 10- 15% cặp vợ chồng không tìm thấy nguyên nhân [34].

- Có 30- 40% số trường hợp vô sinh nam mà không tìm thấy yếu tố liên quan đến vô sinh nam (vô sinh nam vô căn). Những người đàn ông này không có tiền sử bệnh ảnh hưởng đến khả năng sinh sản trước đó và có kết quả bình thường khi kiểm tra thể chất và xét nghiệm nội tiết, di truyền và sinh hóa. Tuy nhiên, phân tích tinh dịch có thể tiết lộ những bệnh lý trong ống sinh tinh [37].

- Vô sinh nam vô căn được cho là do một số yếu tố, bao gồm sự gián đoạn nội tiết do ô nhiễm môi trường, các loại gốc tự do, hoặc bất thường di truyền và bất thường di truyền biểu sinh (di truyền ngoài gen) [37].

Bảng sau tóm tắt các yếu tố chính liên quan đến vô sinh nam.

Bảng 1.1. Nguyên nhân vô sinh, các yếu tố liên quan và tỷ lệ

Chẩn đoán	Tổng số bệnh nhân (n = 12945)	Vô sinh không có tinh trùng (Azoospermia) (n = 1446)
Tổng số	100%	11,2%
Vô sinh biết nguyên nhân (có thể biết nguyên nhân)	42,6%	42,6%
Tinh hoàn lạc chỗ (Mal descended testes)	8,4	17,2
Giãn tĩnh mạch thừng tinh (Varicocele)	14,8	10,9
Tự kháng thể kháng tinh trùng	3,9	-
Ung thư tinh hoàn	1,2	2,8
Nguyên nhân khác	5,0	1,2
Vô sinh tự phát (Idiopathic infertility)	30,0	13,3
Suy giảm sinh dục nam (Hypogonadism)	10,1	16,4
Hội chứng Klinefelter (47, XXY)	2,6	13,7
Suy giảm sinh dục nam nguyên phát không rõ nguyên nhân	2,3	0,8
Suy giảm sinh dục nam thứ phát	1,6	1,9
Hội chứng Kallmann	0,3	0,5
Suy giảm sinh dục nam do tuổi	2,2	-
Nguyên nhân khác	1,1	0,8
Bệnh lý toàn thân khác	2,2	0,5
Do các bệnh lý ác tính	7,8	12,5
Rối loạn cương dương/xuất tinh	2,4	-
Tắc nghẽn đường sinh sản	2,2	10,3

* Nguồn: theo A. Jungwirth và cs (2010) [37]

- Vô sinh nam có thể được phân loại gồm: nguyên nhân trước tinh hoàn, tại tinh hoàn và sau tinh hoàn [38].

+ Nguyên nhân trước tinh hoàn:

Suy giảm chức năng tuyến sinh dục và dưới đồi tạm dịch là thiếu năng sinh dục do thiếu năng nội tiết hướng sinh dục (Hypogonadotropic hypogonadism- HH) ảnh hưởng đến trục dưới đồi- tuyến yên- tuyến sinh dục

là nguyên nhân chính trước tinh hoàn của vô sinh nam. Bệnh lý phổ biến nhất là suy giảm chức năng vùng dưới đồi và tuyến sinh dục bả sinh (IHH) và bệnh lý tuyến yên. Nguyên nhân bả sinh/di truyền là IHH và hội chứng Kallmann [38].

Bệnh lý tuyến yên dẫn đến tăng nồng độ prolactin trong máu, làm cản trở sự bài tiết ra GnRH cần thiết cho sự phóng thích LH và FSH. Nồng độ cao của prolactin có thể là nguyên nhân dẫn đến suy giảm ham muốn, ED và khả năng sinh sản thấp hơn. Tăng prolactin trong máu có thể do u tuyến yên tiết prolactin (prolactinoma) [38].

+ Nguyên nhân tại tinh hoàn:

Phổ biến là suy tinh hoàn nguyên phát. Ngoài ra, nhiều tình trạng có thể gây ra rối loạn chức năng tinh hoàn và được coi là nguyên nhân tinh hoàn gây vô sinh, bao gồm một số bất thường về nhiễm sắc thể/di truyền, tác dụng phụ do thuốc, hóa trị, xạ trị, ung thư, nhiễm trùng, chấn thương, tinh hoàn lạc chỗ và giãn tĩnh mạch thừng tinh, ung thư tinh hoàn. Một nguyên nhân khác tại tinh hoàn của vô sinh nam là không có tinh trùng trong tinh dịch khi đường dẫn tinh không bị cản trở (nonobstructive azoospermia- NOA), điều này được cho rằng liên quan đến thể tích của tinh hoàn [38].

+ Nguyên nhân sau tinh hoàn:

Nguyên nhân thường gặp là tắc ống dẫn tinh 1 bên hoặc 2 bên bả sinh (congenital unilateral or bilateral absence of the vas deferens- CBAVD); tắc mào tinh hoàn; tắc ống phóng tinh [38]; rối loạn xuất tinh [39]. CBAVD có bản chất di truyền và có liên quan đến đột biến gen CFTR (CFTR- Transmembrane conductance regulator; là gen nằm trên nhiễm sắc thể thường 7q. Các nguyên nhân gây tắc nghẽn khác có thể là nhiễm trùng, chấn thương hoặc phẫu thuật như thắt ống dẫn tinh [38].

Ngoài ra, có sự liên hệ giữa vô sinh nam và những rối loạn chức năng sinh dục khác [39].

1.1.3.4. Chẩn đoán vô sinh nam

- Ngoài việc dựa vào các triệu chứng lâm sàng, chẩn đoán hình ảnh và các xét nghiệm cận lâm sàng, phương pháp chính để chẩn đoán vô sinh nam thường dựa trên kết quả của tinh dịch đồ [34].

- Việc phân tích tinh dịch đồ cần được thực hiện bởi phòng thí nghiệm đã được chuẩn hóa và theo hướng dẫn của WHO 2010 [40].

- Tinh trùng ít hoặc ít tinh dịch có thể do nguyên nhân tổn thương tinh hoàn hoặc do tác động của các hormon kích thích sự sinh tinh. Định lượng TES, FSH, LH, prolactin và estradiol có thể giúp ích cho việc chẩn đoán và xác định liệu pháp điều trị vô sinh.

1.1.3.5. Điều trị vô sinh nam

- Nguyên tắc điều trị: Điều trị cả hai vợ chồng và điều trị toàn diện. Điều trị vô sinh phải bắt đầu từ dễ đến khó, từ đơn giản đến phức tạp, từ biến chứng nhẹ đến biến chứng nặng, từ chi phí thấp đến chi phí cao. Do vậy, điều trị nội khoa luôn là lựa chọn hàng đầu mặc dù vai trò của điều trị nội khoa trong vô sinh nam còn nhiều hạn chế, ngoại trừ những trường hợp bệnh lý chuyên biệt.

- Việc điều trị vô sinh nam có nhiều khó khăn vì phải xác định đúng nguyên nhân thì điều trị mới có hiệu quả. Có 3 phương pháp là nội khoa, phẫu thuật và hỗ trợ sinh sản.

+ Điều trị nội khoa:

Trong những trường hợp vô sinh do thiếu hụt hoặc rối loạn quá trình điều hòa hormon thì có thể sử dụng liệu pháp hormon để thay thế.

* Sử dụng GnRH

Sử dụng GnRH dạng xung là phương pháp điều trị hiệu quả để thay thế sự thiếu hụt GnRH ở những bệnh nhân vô sinh với HH do giảm bài tiết từ vùng dưới đồi (như hội chứng Kallmann, HH vô căn) [41].

Liều hiệu quả nhất cho GnRH dạng xung là liều từ 5- 20 μ g cứ sau 1- 2 giờ, được bơm bằng bơm dưới da hoặc kim tiêm. GnRH rất hiệu quả trong việc

tạo ra sự sinh tinh, sớm nhất là 4 tháng sau khi bắt đầu trị liệu. Liệu pháp GnRH dạng xung gây ra sự sinh tinh ở khoảng 85% bệnh nhân và trung bình 60% các cặp vợ chồng sẽ có thai sau 9 tháng điều trị [42].

** Sử dụng Gonadotropin*

Trong trường hợp vô sinh ở nam giới bị suy tuyến yên (ví dụ, u tuyến yên, các bệnh hệ thống như thừa sắt và u hạt) thì có thể sử dụng gonadotropin, sẽ làm cải thiện sự sinh tinh và sản xuất TES. Trong trường hợp này, dùng GnRH sẽ không có hiệu quả [41].

** Chất chủ vận dopamin*

Nồng độ prolactin tăng cao trong u tuyến yên sẽ ức chế sự bài tiết của GnRH, nam giới sẽ bị suy sinh dục và vô sinh, và cũng có thể bị đau đầu hoặc thay đổi trường thị giác thứ phát do bị khối u chèn ép. Trong trường hợp này, thuốc chủ vận dopamin có thể được chỉ định [41].

Trước đây, cả hai thuốc bromocriptin và cabergolin đều được sử dụng trong trị liệu. Tuy nhiên hiện nay cabergolin được ưu tiên lựa chọn hơn do hiệu quả cao hơn [41].

** Thuốc ức chế enzym aromatase (ARI)*

Thuốc ARI được sử dụng trong điều trị vô sinh nam do tinh trùng ít, yếu, dị dạng hoặc không có tinh trùng trong tinh dịch là chỉ định khác của các thuốc này. Các ARI (anastrozol 1 mg/ngày hoặc letrozol 2,5 mg/ngày) làm tăng TES, giảm nồng độ estrogen và ức chế chuyển hóa của TES ngoại vi [41]. Mục đích là giảm tác dụng của estrogen lên sự sinh tinh trùng. Nồng độ estrogen cao kết hợp với nồng độ TES thấp đã được chứng minh làm giảm khả năng sinh tinh [43].

** Các chất điều biến đặc hiệu thụ thể estrogen (selective estrogen receptor modulator- SERM)*

SERM là một nhóm các chất mà tác động lên receptor của estrogen theo kiểu chủ vận hoặc đối kháng. Trước khi có kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào

tương xứng, SERM được dùng như là một trong số ít phương pháp để điều trị vô sinh vô căn. Các SERM, chẳng hạn như clomiphen citrat, tamoxifen và toremifen đã được sử dụng rộng rãi ở phụ nữ để điều trị ung thư vú và loãng xương, việc sử dụng chúng trong điều trị suy sinh dục nam và vô sinh là những tác dụng ngoài nhãn [41].

Clomiphen citrat cũng như các SERM khác ức chế trung tâm điều hòa ngược estrogen và điều chỉnh quá trình sản xuất LH và FSH, dẫn đến sự sinh tinh trùng. Vì clomiphen citrat bao gồm cả hai đặc tính estrogen và kháng estrogen nội tại mạnh mẽ, nên có mối lo ngại rằng tác dụng estrogen của clomiphen có thể có tác động xấu đến sự sinh tinh. Tuy nhiên, các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, ở nam giới suy tuyến sinh dục, clomiphen có tác dụng tích cực đáng kể đối với nồng độ TES huyết thanh và có thể làm tăng tỷ lệ mang thai [44].

+ Phẫu thuật: Điều trị ngoại khoa trong điều trị vô sinh ở nam để khắc phục những khuyết tật cơ thể cản trở sự sản xuất và phát triển của tinh trùng hoặc sự xuất tinh. Phẫu thuật để loại bỏ căng giãn tĩnh mạch trong giãn tĩnh mạch thừng tinh [45]. Phẫu thuật sửa chữa tắc nghẽn ống dẫn tinh...

+ Điều trị nhiễm khuẩn đường sinh dục: Dùng kháng sinh có thể điều trị khỏi hẳn các bệnh nhiễm trùng đường sinh dục, tuy nhiên không phải lúc nào cũng có thể phục hồi khả năng sinh sản.

+ Điều trị liên quan đến các vấn đề về quan hệ tình dục: Điều trị rối loạn cương dương hoặc xuất tinh sớm có thể cải thiện được khả năng sinh sản.

+ Các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản, có thể bao gồm: Bơm tinh trùng vào tử cung (IUI); thụ tinh trong ống nghiệm (IVF); phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI); phương pháp trưởng thành noãn trong ống nghiệm (IVM).

1.2. Các mô hình dược lý nghiên cứu trên sinh sản, sinh dục nam

1.2.1. Nghiên cứu chất có hoạt tính androgen

1.2.1.1. Phương pháp mào gà

- Đây là phương pháp kinh điển dựa trên sự đáp ứng của mào gà trống non thiếu đối với chất thử. Phương pháp này đã được nhiều tác giả sử dụng để đánh giá hoạt tính androgen và là phương pháp hữu ích trong việc phân lập và làm sáng tỏ cấu trúc của androgen tự nhiên [46].

- Chỉ tiêu đánh giá: Dựa vào diện tích bề mặt mào. Các gà trống non thiếu được tiêm bắp dung dịch chất thử nghiệm trong 5 ngày liên tục; lô chứng dương là TES. Sau 24 giờ sau lần tiêm cuối cùng, các mào được đo lại và xác định sự tăng của mào [46].

- Có một số tác giả đã có một số sửa đổi trong phương pháp này, theo đó phương pháp có thể được tiến hành ở mào gà con 2- 3 ngày tuổi. Sau 7 ngày dùng thuốc, lấy mào gà con, thấm khô máu và cân xác định khối lượng [46].

1.2.1.2. Khối lượng của các cơ quan phụ thuộc androgen trên chuột cống

Phương pháp này dựa trên sự thay đổi trọng lượng của 5 mô- cơ quan phụ thuộc androgen ở chuột cống đực non thiếu là tuyến tiền liệt, túi tinh, cơ nâng hậu môn dương vật, tuyến Cowper và đầu dương vật. Các chất có hoạt tính androgen làm kích thích, tăng trọng lượng của các mô- cơ quan này [47].

Khi chuột đạt 42 ngày tuổi, thiến chuột. Có thể thiến chuột trước thời điểm 42 ngày. Sau đó tiến hành chia lô, thường có 3 lô: Lô chứng sinh lý; lô dùng thuốc nghiên cứu và lô chứng dương được tiêm TES propionat liều 0,2- 0,4 mg/kg/ngày.

Bắt đầu dùng thuốc nghiên cứu ở thời điểm 12 ngày sau khi thiến chuột. Thời gian dùng thuốc nghiên cứu là 10 ngày [48]. Ở ngày thứ 11, giết chuột, bóc tách các mô, cơ quan phụ thuộc hoạt tính androgen.

Các chỉ tiêu được đánh giá gồm: trọng lượng cơ thể, và 5 mô- cơ quan sinh dục phụ. Ngoài ra có thể đánh giá: nồng độ TES huyết thanh và/hoặc LH, khối lượng thận, gan và khối lượng tuyến thượng thận [47], [48].

Đây là phương pháp nhảy, có giá trị, đáng tin cậy và được cho là một mô hình tốt để sàng lọc các thuốc có hoạt tính androgen. Ở Việt Nam đã có những công trình nghiên cứu sử dụng mô hình này để đánh giá tác dụng của thuốc trên chức năng sinh sản nam [49]. Ngoài ra cũng có tác giả sử dụng mô hình trên chuột cống đực trưởng thành [49].

1.2.2. Nghiên cứu trên hành vi tình dục

Hành vi tình dục ở chuột cống đực gồm chuỗi các hoạt động diễn ra một cách có trật tự khi chuột đực trưởng thành gặp chuột cái đồng dục. Hành vi tình dục của chuột đực được đặc trưng bởi các hoạt động như mounting (nhảy, leo, trèo); intromission (thâm nhập âm đạo); ejaculation (xuất tinh) [50].

- Các chỉ số theo dõi trên hành vi tình dục gồm [50]:

+ Số lần tiếp cận (mounting frequency- MF): số lần con đực nhảy lên lưng con cái trong một loạt giao cấu.

+ Thời gian tiếp cận (mounting latency- ML): thời gian từ khi con đực gặp con cái đến lần tiếp cận đầu tiên.

+ Số lần thâm nhập âm đạo (intromission frequency- IF): số lần con đực thâm nhập âm đạo con cái trong một loạt giao cấu.

+ Thời gian thâm nhập (intromission latency- IL): thời gian từ khi con đực gặp con cái đến lần xâm nhập đầu tiên.

+ Thời gian xuất tinh (ejaculation latency- EL): thời gian từ lần tiếp cận hoặc thâm nhập âm đạo đầu tiên đến lần xuất tinh đầu tiên.

+ Khoảng cách sau xuất tinh (post ejaculatory interval- PEI): thời gian từ khi xuất tinh lần đầu tiên đến lần tiếp cận hoặc thâm nhập tiếp theo.

- Nghiên cứu được tiến hành ở pha tối của chu kỳ sáng tối, để đảm bảo quan sát khách quan, cần có hệ thống camera quan sát, ghi lại hành vi của chuột.

Để đánh giá hành vi của chuột đực, cần có chuột cái đã cắt bỏ buồng trứng và gây động dục nhân tạo trước khi cho tiếp xúc với chuột đực [50].

- Trước khi tiến hành phân lô nghiên cứu, các chuột đực cần được test bằng các test sàng lọc [50]. Sự phân lô nghiên cứu có thể được tiến hành dựa trên các nhóm chuột đã qua test sàng lọc hoặc loại bỏ những nhóm chuột theo yêu cầu riêng của từng nghiên cứu cụ thể.

1.2.3. Nghiên cứu trên chức năng cương dương

Để đánh giá khả năng cương dương trên động vật thực nghiệm, phương pháp đáng tin cậy và thường được sử dụng là đo áp lực xoang hang (ICP) bằng kích thích điện dây thần kinh hang. Có thể có nhiều mô hình khác nhau để nghiên cứu tác dụng trên khả năng cương dương tuy nhiên đo ICP là con đường chung cuối cùng, là phương pháp đánh giá để đưa ra kết quả của những mô hình đó.

- Cương dương là kết quả của sự tăng dòng máu trong thể hang. Do vậy, những tác nhân dược lý có khả năng làm tăng dòng máu trong thể hang đều có thể làm tăng sự cương dương. ICP là chỉ số đánh giá hoạt động cương có thể được đo bằng kích thích điện dây thần kinh hang. Thuốc có tác dụng tăng cường sự cương dương khi làm tăng giá trị ICP cực đại ở lô thử so với lô chứng.

- Để kích thích điện dây thần kinh hang, cần một điện cực lưỡng cực [51]. Sau đó, phẫu thuật bộc lộ dây thần kinh hang để kích thích điện, đặt catheter vào trong thể hang để đo ICP và đặt catheter vào động mạch cảnh để ghi huyết áp động mạch trung bình (MAP).

- Các chỉ số đánh giá: Biên độ cực đại của ICP trong quá trình cương (ICP max); tỉ lệ ICP/MAP.

- Thuốc nghiên cứu có thể được đưa trực tiếp vào thể hang bằng catheter [51] hoặc cho động vật dùng thuốc trong một khoảng thời gian trước khi phẫu thuật đo ICP.

Mô hình đánh giá khả năng cương dương qua ICP là mô hình đáng tin cậy trong nghiên cứu tác dụng của thuốc trên khả năng cương dương. Nhiều công trình đã công bố sử dụng kỹ thuật này; các nghiên cứu thường được tiến hành trên chuột không tiểu, tuy nhiên cũng có nghiên cứu tiến hành đánh giá trên chuột đực tiểu (cắt bỏ 2 tinh hoàn) [52].

1.2.3.1. Mô hình tổn thương tuyến tiền liệt

Trong phẫu thuật cắt bỏ tuyến tiền liệt để điều trị ung thư tuyến tiền liệt, dây thần kinh hang (CN), là dây thần kinh ngoại biên chi phối hoạt động của dương vật sẽ bị tổn thương hoặc bị cắt bỏ. Mô hình động vật cố gắng bắt chước tình trạng tổn thương này của con người bằng cách làm tổn thương, dập nát, cắt bỏ, phục hồi hoặc phong bế CN [53].

Chuột cống chủng Sprague Dawley và chuột nhắt chủng C57BL/6J thường được sử dụng. Người ta cho rằng việc làm dập nát CN sẽ gần giống phẫu thuật cắt bỏ tuyến tiền liệt gây ra ED hơn là cắt bỏ. Có thể làm dập nát CN bằng cách dùng kẹp, kẹp CN trong 30 giây; kẹp lặp lại trong 15 giây hoặc dùng kẹp động mạch kẹp trong 2 phút [54].

Chuột sau khi gây tổn thương CN được phân lô và trị liệu theo yêu cầu thiết kế của từng nghiên cứu cụ thể. Sau thời gian dùng thuốc, phẫu thuật và đo ICP. Một số tác giả đã sử dụng mô hình này trong nghiên cứu [54].

1.2.3.2. Mô hình gây đái tháo đường

ED thường gặp ở bệnh nhân ĐTD, ở những người này có nguy cơ mắc ED cao hơn gấp 3 lần so với những người không mắc ĐTD. Nam giới mắc ĐTD có thể mắc ED ở độ tuổi sớm hơn và tỉ lệ mắc có thể lên đến 75% [55]. Liệu pháp điều trị ED bằng thuốc ức chế PDE5 chỉ hiệu quả đối với một số ít trường hợp ĐTD phụ thuộc insulin [56]. Do đó, mô hình động vật gây ĐTD typ 1 và 2 gây ra sự thay đổi về mạch máu và thần kinh đã được phát triển.

- Mô hình gây ĐTĐ thường được sử dụng nhất là gây ĐTĐ trên chuột cống hoặc chuột nhắt bằng streptozotocin (STZ). Đây là mô hình gây ĐTĐ không phụ thuộc insulin và có biểu hiện cả bệnh lý mạch máu và thần kinh [53].

Mức liều thấp nhất có thể gây ĐTĐ là 25 mg/kg cân nặng, liều thường dùng là 60 mg/kg [57] tuy nhiên cũng có tác giả sử dụng liều 100 mg/kg. Chuột sẽ bị ĐTĐ sau 2- 4 ngày, do đó thường kiểm tra glucose máu sau 3 ngày tiêm STZ.

- Mô hình sử dụng chuột cống BB/WOR là mô hình xuất hiện tự nhiên của ĐTĐ typ 1 do đó mô phỏng gần giống với các đặc điểm của bệnh ĐTĐ ở người. Có thể đến 92% số chuột BB/WOR bị ĐTĐ có sự suy giảm nghiêm trọng chức năng cương dương [58]. Sự khởi phát của ĐTĐ xảy ra trong khoảng từ 60 đến 120 ngày tuổi [58]. Ưu điểm của mô hình này là nó cho phép đánh giá được những ảnh hưởng của ĐTĐ tới thần kinh mà không kèm theo các bệnh lý mạch máu như trong các mô hình gây ĐTĐ khác. Xơ vữa động mạch và các bệnh lý mao mạch, đặc điểm chính của bệnh lý mạch máu, không có ở chuột BB/WOR. Tuy nhiên chi phí của mô hình này khá cao nên việc sử dụng trong nghiên cứu cũng khá hạn chế.

- Sử dụng chủng chuột C57BL/KsJ-db/db (db/db), đây là một chủng chuột gây biến đổi gen bị ĐTĐ với biểu hiện là tăng glucose máu và tăng lượng insulin. Đây là mô hình chuột mắc ĐTĐ typ 2 trong đó mật độ của các tế bào β giảm, làm cấu trúc đảo tụy không đều và có những thay đổi thoái hóa, phì đại trong từng tế bào β . Bệnh lý tim mạch thể hiện rõ trong mô hình này bao gồm tổn thương tiến triển đối với các tế bào cơ tâm thất và trong thành các động mạch nhỏ; các bệnh lý thần kinh cũng được xuất hiện trong mô hình này [59]. Mô hình này cũng không được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu.

- Gây ĐTĐ bằng alloxan trên chuột cống hoặc thỏ. Sau khi tiêm alloxan có thể gây ra ĐTĐ do các tế bào β của đảo tụy bị phá hủy. Mô hình này ít được sử dụng thường xuyên là do cần dùng liều cao để gây ĐTĐ, ở thỏ là 100 mg/kg

còn ở chuột cống là 140 mg/kg. Ở liều cao hơn alloxan có thể làm tổn thương các cơ quan khác ngoài tuyến tụy (như thận) và có thể dẫn đến tử vong trong vòng vài giờ do ảnh hưởng đến tuần hoàn. Một số nghiên cứu được công bố cũng đã sử dụng mô hình này [60].

1.2.3.3. Mô hình tuổi tác

Tuổi tác là yếu tố nguy cơ lớn đối với ED và tỷ lệ mắc ED tăng theo tuổi. Tuổi tác có thể được coi là biến số có tác động mạnh mẽ nhất đối với ED. Vì ED có ảnh hưởng lớn đến sức khỏe của nam giới nên cần có mô hình nghiên cứu trên động vật để tìm hiểu về cách ED tăng theo tuổi. Tuy nhiên, dường như chưa có mô hình nào thực sự lý tưởng.

- Mô hình dùng chuột cống chủng Sprague- Dawley là mô hình thường dùng. Với mô hình này, 23% số chuột có biểu hiện bệnh lý thần kinh và bệnh lý cơ tim liên quan đến tuổi. Tuy nhiên, khi so sánh chuột Sprague- Dawley các độ tuổi 6, 12, 18, 24 và 28 tháng có sự suy giảm dần của ICP [61]; biểu hiện và hoạt tính của NOS cũng giảm dần, đó là biểu hiện của ED.

- Mô hình dùng chuột Fischer 344 cũng có thể được sử dụng. Tuy nhiên, nghiên cứu ban đầu của Gurenewald chỉ ra rằng mô hình này có thể không phản ánh đúng tình trạng suy giảm sinh sản do tuổi ở người vì chuột Fischer 344 tiết ra progesteron và estradiol quá mức làm ức chế bài tiết gonadotropin [62]. Ở mô hình này thấy, không có sự tăng sinh tế bào Leydig hoặc tạo khối u ở 100% chuột già [62].

- Ngoài ra một số mô hình khác như: mô hình sử dụng chuột Brown-Norway; mô hình chuột Wistar già gây bệnh thần kinh và cơ tim [53].

1.2.3.4. Mô hình hội chứng chuyển hóa

Các hội chứng chuyển hóa bao gồm sự kết hợp của các yếu tố nguy cơ mà gây ra các bệnh lý tim mạch và gây ra ED, các hội chứng chuyển hóa thường gặp là béo phì, tăng huyết áp và ĐTĐ. Cơ chế để sự kết hợp của các yếu tố này góp phần gây ra ED còn chưa được rõ ràng. Do đó, các mô hình động vật là cần

thiết cho những nghiên cứu về phân tử, sinh lý và mô học của ED. Hầu hết các nghiên cứu đã được thực hiện theo mô hình động vật mắc hội chứng chuyển hóa là cho thỏ hoặc chuột ăn chế độ giàu chất béo; chuột gây béo phì và/hoặc chuột gây ĐTĐ.

- Mô hình thỏ ăn chế độ giàu chất béo:

Thỏ trắng đực New Zealand được cho ăn với chế độ giàu chất béo gồm có 0,5% cholesterol và 4% dầu dừa trong 12 tuần. Hàm lượng cholesterol, triglycerid, glucose máu, huyết áp trung bình và mức độ mỡ nội tạng tăng [63]. Nồng độ TES huyết thanh giảm, tuy nhiên không có sự thay đổi về hình ảnh mô học của tinh hoàn và mào tinh hoàn [63].

- Mô hình chuột Zucker béo phì và ĐTĐ: Có khoảng 30% chuột ở mô hình này bị suy giảm khả năng cương dương. Ngoài ra có thể sử dụng mô hình chuột Zucker béo phì (không có ĐTĐ); mô hình chuột nhắt C57BL/6 được nuôi với chế độ ăn giàu chất béo [53].

1.2.3.5. Một số mô hình khác nghiên cứu trên khả năng cương dương

- Mô hình tăng huyết áp: Tăng huyết áp là yếu tố nguy cơ của ED và các bệnh lý tim mạch. Đàn ông bị tăng huyết áp có tỷ lệ mắc ED cao hơn và tỷ lệ mắc ED có liên quan đến thời gian và mức độ nghiêm trọng của tăng huyết áp. Có khoảng 8% đến 10% bệnh nhân tăng huyết áp không được điều trị có ED tại thời điểm chẩn đoán là tăng huyết áp.

Có một số mô hình động vật được sử dụng trong nghiên cứu, mô hình được sử dụng thường xuyên nhất là mô hình chuột công tăng huyết áp tự phát.

- Mô hình tăng cholesterol: Tăng lipid máu thường gặp ở bệnh nhân ED. Tỷ lệ tăng cholesterol máu là 70,6% ở bệnh nhân ED so với 52% ở bệnh nhân không mắc ED [64]. Với mỗi mmol/L tăng của cholesterol toàn phần, thì có nguy cơ gây ra ED cao hơn 1,32 lần. Các mô hình động vật được sử dụng phổ biến nhất để nghiên cứu ảnh hưởng của cholesterol cao đối với chức năng cương dương là cho thỏ và chuột công ăn chế độ ăn nhiều chất béo. Thông thường,

1%- 2% cholesterol được thêm vào chế độ ăn tiêu chuẩn và động vật được cho ăn chế độ ăn đã sửa đổi trong 3- 6 tháng, điều này dẫn đến cholesterol tăng và giảm ICP/MAP.

Thỏ New Zealand được cho ăn chế độ chứa 1% cholesterol đã cho thấy có sự thay đổi những dấu ấn phân tử ở thể hang như giảm NO synthase nội mô (endothelial nitric oxide synthase- eNOS) và nNOS (neuronal nitric oxide synthase) [65]. Chuột ăn chế độ giàu chất béo trong 5 tháng làm giảm ICP/MAP và nNOS [66].

- Một số mô hình khác cũng có thể được sử dụng như: mô hình gây ED bằng bức xạ; mô hình giảm oxi máu; mô hình gây ED bằng thuốc; mô hình ED do hút thuốc lá [53].

1.2.4. Nghiên cứu trên khả năng sinh sản

1.2.4.1. Gây suy giảm sinh sản trên chuột

Chuột cống đực có thể được gây suy giảm sinh sản bằng các tác nhân khác nhau, sau một thời gian điều trị bằng thuốc nghiên cứu, giết chuột, lấy tinh ở mào tinh hoàn để phân tích các đặc điểm của tinh trùng. Ngoài ra còn có thể đánh giá trên hình thái tinh hoàn. Một số tác nhân được sử dụng là:

- Thuốc, hóa chất:

+ Natri valproat: Một số nghiên cứu trong và ngoài nước đã sử dụng natri valproat là tác nhân gây suy giảm sinh sản. Liều thường dùng trên chuột cống để gây suy giảm sinh sản là uống 500 mg/kg trong 7 ngày [67].

+ Cyclophosphamid liều 200 mg/kg cân nặng [68].

+ Tách lấy tinh hoàn và gây độc bằng H₂O₂ [69].

- Gây suy giảm bằng nhiệt [69].

- Tuổi (chuột già): Dùng chuột già như chủng Wistar là 26- 28 tháng tuổi [70].

1.2.4.2. Gây suy giảm sinh sản trên thỏ

Thỏ là con vật nhỏ nhất có thể lấy tinh dịch bằng âm đạo giả. Do đó, nghiên cứu khả năng sinh sản trên thỏ sẽ thuận tiện cho việc lấy tinh và phân tích tinh dịch. Hơn nữa, trình tự gen của thỏ giống với trình tự gen của con người hơn so với của các loài gặm nhấm khác (chuột cống, chuột nhắt...) [71]. Nên có nhiều ưu điểm khi sử dụng thỏ là đối tượng nghiên cứu trên sinh sản. Trên thế giới, đã nhiều công trình được công bố đánh giá tác dụng trên sinh sản của thuốc (hóa chất...) trên tinh dịch thỏ. Tuy nhiên ở Việt Nam, hiện nay chưa có nghiên cứu nào sử dụng thỏ, dùng âm đạo giả trong nghiên cứu tác dụng của thuốc trên khả năng sinh sản.

Khi đánh giá tác dụng của thuốc, hóa chất cũng như với chuột có thể thực hiện trên thỏ bình thường khỏe mạnh hoặc thỏ đã gây suy giảm sinh sản [72]. Tuy nhiên khi nghiên cứu trên mô hình suy giảm sinh sản thì có thể nhận thấy tác dụng của thuốc, hóa chất rõ ràng hơn. Mô hình nghiên cứu tác dụng của thuốc trên sinh sản ở thỏ đã được sử dụng trên thế giới. Các tác nhân đã được sử dụng để gây suy giảm sinh sản như: gây stress bằng nhiệt [72]; gây rối loạn chuyển hóa, béo phì [73]; hay gây suy giảm sinh sản bằng kim loại nặng: cadmium (Cd), nickel clorid (NiCl_2).

- Các chỉ số đánh giá về tinh dịch:

Tinh trùng là marker quan trọng trong việc đánh giá tác dụng của thuốc trên sinh sản. Thuốc thể hiện tác dụng làm cải thiện khả năng sinh sản cũng sẽ được biểu hiện qua tinh dịch đờ. Các đánh giá về tinh dịch phải cung cấp thông tin về khả năng thụ tinh của tinh trùng. Các thông số quan trọng nhất liên quan đến khả năng sinh sản là số lượng tinh trùng và khả năng vận động của chúng. Ngoài ra, những thông số khác về tinh trùng cũng có thể được đánh giá là: màu sắc, thể tích, pH, độ nhớt, tỷ lệ chết, tỷ lệ hình thái bất thường ... [72]. Hiện nay, với thiết bị hiện đại có thể đánh giá được sâu hơn về chất lượng tinh trùng

với các thông số như: sự toàn vẹn của ADN màng tinh trùng, động học của tinh trùng thông qua phần mềm CASA (Computer assisted sperm analysis).

Những đặc điểm của tinh dịch bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố (giống, thức ăn, tình trạng sức khỏe, điều kiện nuôi, mùa thu và tần số...) do vậy trong nghiên cứu cần chuẩn hóa những điều kiện trên hoặc tiến hành song song với lô chứng sinh lý và phân tích tinh dịch cần tuân theo một quy chuẩn nhất định.

- Thụ tinh cho thỏ cái:

Có 2 phương pháp thụ tinh cho thỏ cái và đều được áp dụng rộng rãi là thụ tinh (phối giống) tự nhiên và thụ tinh nhân tạo (Artificial insemination- AI). Thụ tinh nhân tạo đã được sử dụng trong công nghiệp nuôi thỏ thịt ở các nước Châu Âu từ những năm 80 của thế kỷ XX và được áp dụng nhiều trong nghiên cứu ở nước ngoài. Nhưng tại Việt Nam, việc sử dụng AI còn rất hạn chế, hầu như chưa được áp dụng. Tại Trung tâm dê thỏ Ba Vì (Viện Chăn nuôi), hiện nay cũng chưa áp dụng kỹ thuật này.

1.3. Tình hình nghiên cứu về tác dụng của các chế phẩm từ dược liệu trên sinh sản, sinh dục nam

Đã có một số nghiên cứu được công bố trong nước về tác dụng của các chế phẩm từ dược liệu trên chức năng sinh sản, sinh dục nam như:

Tác giả Dương Thị Ly Hương (2012) đã nghiên cứu tác dụng lên chức năng sinh sản nam của rễ bá bệnh (*Euricoma longifolia* J.) thu hái tại Việt Nam trên động vật thực nghiệm [74]. Tác giả Nguyễn Thanh Hương (2017) đã nghiên cứu tác dụng của dịch chiết nước tảo dương (*Balanophora laxiflora*) lên một số chỉ tiêu sinh sản ở chuột đực [75]. Tác giả Đậu Thùy Dương (2018): nghiên cứu tác dụng trên chức năng sinh sản của OS35 (cao chiết cùi của quả Xà sàng) trong thực nghiệm [76]. Tác giả Mai Phương Thanh (2019) nghiên cứu tác dụng điều trị suy giảm sinh dục đực của viên hoàn cứng TD0014 (chế phẩm được bào chế từ 33 vị dược liệu) trên thực nghiệm [77]. Gần đây, tác giả

Nguyễn Thị Phương Thảo (2021) đã nghiên cứu tác dụng tăng cường khả năng sinh tinh của cao đặc Testin CT3 trên động vật thực nghiệm [78].

Qua các nghiên cứu trên, thấy rằng:

Về chế phẩm nghiên cứu:

Chế phẩm được sử dụng là dịch chiết, hoặc cao chiết đơn dược liệu như trong nghiên cứu của Dương Thị Ly Hương, Nguyễn Thanh Hương và Đậu Thùy Dương. Một số tác giả sử dụng chế phẩm nghiên cứu được cấu thành bởi nhiều vị thuốc, được xây dựng trên cơ sở lý luận của YHCT như: cao đặc Testin CT3 với 8 vị thuốc (bá bệnh, xà sàng tử, dâm dương hoắc, đương quy, bạch tật lê, hoàng kỳ, câu kỷ tử, ba kích); viên hoàn cứng TD0014 gồm 33 vị dược liệu.

Về phương pháp nghiên cứu:

- Các nghiên cứu đều đánh giá hoạt tính androgen, là thử nghiệm được coi là sàng lọc ban đầu đối với những chất, chế phẩm tác dụng trên sinh sản, sinh dục nam. Mô hình được sử dụng phổ biến là trên chuột cống đực non thiếu.

- Trên chức năng cương dương: Các nghiên cứu đều sử dụng chuột cống đực trưởng thành khỏe mạnh (không gây suy giảm cương dương) và chế phẩm nghiên cứu được uống liều duy nhất [76], [77].

- Trên khả năng sinh sản: Hầu hết các công trình đều sử dụng mô hình gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat để nghiên cứu tác dụng trên khả năng sinh sản [74], [75], [76], [77]. Ngoài ra, có tác giả sử dụng mô hình suy giảm sinh sản bằng stress nhiệt và stress giam giữ [78]. Các nghiên cứu này đều dùng chuột là động vật nghiên cứu, lấy tinh dịch từ mào tinh nên chỉ đánh giá, so sánh được ở duy nhất 1 thời điểm cuối cùng của thí nghiệm, không đánh giá, so sánh được sự thay đổi trong quá trình thí nghiệm.

1.4. Tổng quan về viên nang Trường Xuân CB

1.4.1. Nguyên tắc điều trị suy giảm sinh sản sinh dục nam theo YHCT

Nguyên tắc điều trị suy giảm sinh sản, sinh dục nam của YHCT là tác động vào nguyên nhân gây ra, tác động vào gốc của chứng bệnh nhằm tăng

cường chức năng của các tạng phủ, trong đó tập trung vào thận, can, tỳ và tâm, giúp cân bằng âm dương trong cơ thể, kích thích sản xuất TES nội sinh, bổ sung nguyên khí, giúp lưu thông khí huyết, đồng thời hỗ trợ giảm tình trạng căng thẳng, stress, mang đến tinh thần thoải mái, thư thái, từ đó có thể tác động tích cực đến chức năng sinh sản, sinh dục của nam giới.

1.4.2. Thành phần, công thức bào chế của viên nang Trường Xuân CB

Viên nang Trường Xuân CB (TXCB) được nghiên cứu bào chế từ bài thuốc YHCT bằng cách áp dụng các kỹ thuật bào chế hiện đại. Bài thuốc (nghiệm phương) được xây dựng dựa trên lý luận của YHCT và những hiểu biết về y học hiện đại. Công thức bào chế (cho 1 viên nang) như sau:

Bảng 1.2. Thành phần, công thức bào chế của TXCB

TT	Tên nguyên liệu	Khối lượng (mg)
1	Bột cao khô tảo dương	75
2	Bột cao khô hỗn hợp 6 dược liệu: ba kích, dâm dương hoắc, câu kỷ tử, sâm cau, ngư đại lực, thạch học tía	310
3	Bột cao khô lộc nhung	15
4	Tá dược (tinh bột ngô, natri starch glycolat, magnesi stearat, aerosil)	vừa đủ 1 viên

Chế phẩm sử dụng cho nghiên cứu là sản phẩm đã đạt tiêu chuẩn cơ sở, có quy trình sản xuất được thẩm định đầy đủ (phụ lục 1).

- Dự kiến chỉ định của viên nang TXCB: Dùng cho người suy giảm chức năng sinh tinh, thiếu năng số lượng và chất lượng tinh trùng. Các trường hợp mãn dục nam.

- Liều dùng dự kiến: Ngày uống từ 6- 8 viên, sau khi ăn.

1.4.3. Cơ sở lý luận của bài thuốc

Cơ sở lý luận phối hợp của bài thuốc theo YHCT như sau:

- Công dụng: Bổ ích can thận, tăng cường chức năng sinh lý.

- Tác dụng: làm tăng lượng testosterone, tăng cường chức năng sinh lý, cải thiện chất lượng tinh trùng, tăng cường sức khỏe cho cơ thể.

- Cơ sở phối hợp của bài thuốc:

Bài thuốc được kết hợp các vị thuốc bổ dương và dưỡng âm của YHCT kết hợp để cấu thành bài thuốc. Sự kết hợp 2 nhóm thuốc như trên giúp cho bài thuốc đảm bảo được điều hòa về âm dương, đảm bảo điều trị không bị thiên lệch dẫn đến rối loạn cân bằng âm dương trong cơ thể người bệnh. Các vị thuốc trong bài thuốc chủ yếu được quy kinh can thận, vì vậy tác dụng hiệp đồng chủ yếu tập trung vào 2 tạng can và thận. Theo YHCT đây là những tạng liên quan chủ yếu đến chức năng sinh lý của con người. Tác dụng tăng cường chức năng sinh lý trên nam giới của bài thuốc là do các vị chủ dược (quân dược) như: lộc nhung, ba kích, tảo dương. Đây là những vị thuốc có tác dụng bổ dương có tác dụng vừa bổ thận sinh tinh vừa làm tăng sản sinh ra hormon sinh dục nam testosterone làm tăng cường chức năng sinh lý. Các vị sâm cau, dâm dương hoắc có tác dụng phối làm tăng cường tác dụng bổ thận tráng dương của các vị thuốc chủ dược, các vị này đóng vai trò là thân dược trong công thức. Thạch斛 tía, ngư đại lực, kỷ tử (vai trò là tá và sứ dược) là những vị thuốc dưỡng âm, tác dụng chính vào can, thận, giúp dưỡng can, thận âm, ích tủy sinh tinh, giúp cho bài thuốc vừa có tác dụng tăng cường chức năng sinh lý vừa được tư dưỡng. Chính vì vậy ưu điểm của bài thuốc là có thể điều trị kéo dài mà không bị ảnh hưởng tới chức năng của can thận.

1.4.4. Tác dụng dược lý, công năng của các dược liệu trong công thức

Sơ lược về tác dụng dược lý và công năng (theo YHCT) của các dược liệu có trong viên nang TXCB được trình bày trong bảng sau:

Bảng 1.3. Tác dụng dược lý, công năng của các dược liệu

TT	Tên dược liệu	Tác dụng dược lý	Công năng
1	Tỏa dương (<i>Balanophora laxiflora</i> Hemsl., họ Dó đất Balanophoraceae)	- Dịch chiết nước tỏa dương có tác dụng làm tăng ham muốn tình dục, tăng hiệu quả giao cấu trên chuột cống trắng [3]. - Tác dụng chống oxy hóa [79].	Bổ thận tráng dương, ích tinh huyết, mạnh tình dục.
2	Thạch斛 tía (<i>Dendrobium officinale</i> Kimura et Migo, họ Lan Orchidaceae)	- Các hợp chất phenol có tác dụng chống oxy hóa [80]; polysaccharid làm giảm nồng độ MDA, tăng nồng độ GSH và hoạt động của enzym chống oxy hóa trên chuột gây stress oxy hóa bằng alloxan [60]. - Tác dụng làm hạ đường huyết lúc đói trên chuột nhất gây ĐTĐ bằng alloxan, làm tăng nồng độ insulin trong huyết tương [60]; làm giảm rõ rệt các biến chứng sớm của ĐTĐ [81].	Tư âm thanh nhiệt, ích vị sinh tân [82].
3	Lộc nhung (<i>Cervus nippon Temminck</i>)	- Điều hòa miễn dịch, kháng tế bào ung thư, chống oxy hóa, chống mệt mỏi, chống viêm [83].	Bổ thận dương, ích tinh huyết [82].
4	Ngưu đại lực (<i>Radix Millettiae speciosae</i>)	- Tác dụng tăng lực, chống mệt mỏi [84]. - Tác dụng chống oxy hóa, tăng cường miễn dịch, bảo vệ gan, chống viêm [85].	Sinh tân dịch, chỉ khát [82].
5	Sâm cau (<i>Rhizoma Curculiginis</i>)	- Cải thiện khả năng cương dương [86], [4]. Tăng số lượng tinh trùng [4]. Có hoạt tính androgen, tăng ham muốn tình dục [86]; tăng nồng độ TES huyết tương trên mô hình gây ĐTĐ bằng STZ [4]. - Tác dụng chống oxy hóa, chống tế bào ung thư [87].	Bổ thận tráng dương, cường gân cốt, khử hàn trừ thấp [82].

6	Dâm dương hoắc <i>(Herba Epimedii)</i>	<p>- Làm tăng nồng độ TES huyết tương; tăng NO; tăng khối lượng tương đối của túi tinh, tuyến tiền liệt [88]. Cải thiện hình thái tinh hoàn, làm giảm tổn thương DNA do oxi hóa ở tinh hoàn của chuột già, có thể phục hồi được các rối loạn chức năng tinh hoàn do lão hóa [89].</p> <p>- Icariin từ <i>Epimedium</i> làm tăng ICP, tăng trọng lượng tương đối cơ nâng hậu môn và tăng nNOS và iNOS khi nghiên cứu trên chuột cống thiếu [90].</p> <p>- Tác dụng chống oxi hóa [91].</p>	Bổ thận dương, cường gân cốt, trừ phong thấp [82].
7	Ba kích <i>(Radix Morindae officinalis)</i>	<p>- Cải thiện đáng kể khả năng tình dục, làm tăng nồng độ TES trong huyết thanh; làm tăng tế bào sinh tinh, số lượng tinh trùng ở tinh hoàn và mào tinh hoàn trên chuột gây tổn thương bằng vi sóng [92]. Polysaccharid của ba kích làm cải thiện số lượng, chất lượng tinh trùng và cấu trúc biểu mô sinh tinh; tăng nồng độ TES huyết thanh; kích thích tổng hợp và giải phóng GnRH ở vùng dưới đồi [93].</p> <p>- Có tác dụng chống oxi hóa, bảo vệ tế bào TM3 (tế bào Leydig chuột) [94].</p>	Bổ thận dương, mạnh gân xương [82].
8	Câu kỷ tử <i>(Fructus Lycii)</i>	<p>- Tác dụng hạ glucose máu trên chuột nhắt gây tăng glucose máu bằng STZ [95]. Giảm glucose máu, cholesterol toàn phần huyết thanh, triglycerid và làm tăng HDL trên mô hình gây ĐTD bằng alloxan [96].</p> <p>- Tác dụng chống oxi hóa [97].</p>	Tư bổ can thận, ích tinh, sáng mắt [82].

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Viên nang TXCB do Trung tâm nghiên cứu ứng dụng sản xuất thuốc- Học viện Quân y sản xuất và cung cấp, đạt tiêu chuẩn cơ sở. Quy trình sản xuất và tiêu chuẩn cơ sở của chế phẩm được trình bày trong phần phụ lục.

2.2. Động vật nghiên cứu

Tất cả các động vật được cung cấp bởi Ban chăn nuôi động vật thí nghiệm- Học viện Quân y. Động vật được nuôi 7- 14 ngày để thích nghi với môi trường và điều kiện chăn nuôi của phòng thí nghiệm trước khi tiến hành nghiên cứu. Nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Động vật được ăn thức ăn dạng pellet và uống nước sạch tự do.

Động vật nghiên cứu sử dụng trong luận án được trình bày trong bảng sau:

Bảng 2.1. Động vật nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu	Loài động vật	Đặc điểm động vật
Độc tính cấp và xác định liều LD ₅₀	Chuột nhắt trắng chủng <i>Swiss</i>	Cả hai giống, khỏe mạnh, trọng lượng 20-25 g
Độc tính bán trường diễn	Chuột cống trắng chủng <i>Wistar</i>	Cả hai giống, khỏe mạnh, trọng lượng 160-180 g
Hoạt tính androgen	Chuột cống trắng chủng <i>Wistar</i>	Đực, 42 ngày tuổi

Bảng 2.1. Động vật nghiên cứu (tiếp theo)

Nội dung nghiên cứu	Loài động vật	Đặc điểm động vật
Tác dụng trên khả năng cương dương	Chuột cống trắng chủng <i>Wistar</i>	Đực, trưởng thành, khỏe mạnh, cân nặng 160-180 g
Tác dụng trên mô hình thỏ gây suy giảm sinh sản bằng fluconazol	Thỏ chủng New Zealand	Cả hai giống, trưởng thành, khỏe mạnh, cân nặng 2,3- 2,7 kg.

2.3. Thuốc, hóa chất, máy móc, thiết bị và dụng cụ phục vụ nghiên cứu

2.3.1. Thuốc và hóa chất

- Fluconazol đạt tiêu chuẩn USP 40; lô sản xuất: FLP0310418US; ngày sản xuất 04/2018; hạn dùng 03/2023; Synergene- Ấn Độ.

- Sildenafil (biệt dược: Viagra) 50 mg, lô 161483139; Pfizer Australia Pty., Ltd., 38 - 42 Wharf Road, West Ryde NSW 2114, Australia.

- Dung dịch Papanicolaou's solution 2a Orange G solution (OG6) lô HX87123288, hạn dùng: 31/08/2021, Merck KGaA, Đức.

- Dung dịch Papanicolaou's solution 3b polychromatic solution EA 50, lô sản xuất: HX112872; hạn dùng: 30/11/2021, Merck KGaA, Đức.

- Hematoxylin solution modified acc. to Gill II, lô: HX86994175, hạn dùng: 31/08/2020, Merck KGaA, Đức.

- Giấy đo pH (pH- indicator strips (pH 6,5- 10,0, Special Indicator), Merck- Đức).

- Streptozotocin (high purity), hàm lượng 99%; Lô YV397101; Cool Chemical Science and Technology (Bắc Kinh) Co. LTD.

- Thuốc tiêm testosterone propionat (thuốc tiêm Tesmon 25 mg/ml; Tai Yu Chemical & Pharma Co.,Ltd., Trung Quốc).

- Thuốc tiêm ketamin 10%, lọ 10 mL; Bremer Pharma GmbH, Herwigstr, Bremerhaven, Đức.

- Natri citrat.2H₂O; SKS AM0910348; ngày sản xuất 31/10/2018, Merck, Đức.

- Thuốc tiêm truyền NaCl 0,9%, chai 500 mL; công ty trách nhiệm hữu hạn B. Braun Việt Nam.

- Acid hydrochloric (HCl); SKS K48518817650; ngày sản xuất 08/12/2016; hạn dùng 31/12/21, Merck, Đức.

- Dung dịch tiêm cloprostenol 250 µg/mL (Han- prost), lọ 5 mL; lô 2093; Công ty trách nhiệm hữu hạn Dược Hanvet.

- Dung dịch gonadorelin acetat 100 µg/mL (Gonadorelin), lọ 5 mL; lô 490; Công ty trách nhiệm hữu hạn Dược Hanvet.

- Hóa chất xét nghiệm huyết học và sinh hóa.

- Một số thuốc và hóa chất khác.

2.3.2. Máy móc, thiết bị và dụng cụ

- Máy phân tích huyết học Humancout 30TS (Human, Đức).

- Máy xét nghiệm sinh hóa 3000 Evolution (Biochemical Systems International Srl, Ý).

- Máy phân tích tinh trùng tự động QwikCheck™ Gold- Isarel kèm theo E- capillary.

- Kính hiển vi huỳnh quang Nikon Eclipse Ti2 (Nhật Bản), kèm theo vật kính 10x, 20x, 40x và 100x.

- Máy nhuộm tiêu bản tự động Leica Autostainer XL- ST5010, Đức.

- Máy đọc đĩa ELISA Chromate 4300, Awareness Technology, Mỹ.

- Máy rửa tự động Stat Fax- 2600®, Awareness Technology, Mỹ.

- Máy ủ và lắc trộn Stat Fax- 2200, Awareness Technology, Mỹ.

- Hệ thống Powerlab, AD Instrument, Úc, kèm theo phần mềm xử lý Lab Chart Pro.

- Điện cực lưỡng cực dùng để kích thích thần kinh hang.

- Máy đo đường huyết ACCU-CHEK® Active, Roche, Đức kèm theo que thử của hãng.

- Kính hiển vi phẫu thuật đa năng YSX- 107; Richy- Trung Quốc.

- Máy ly tâm lạnh Universal 320R; Hettich- Đức.

- Tủ lạnh âm sâu Panasonic MDF- U33V- PB, Nhật Bản.

- Tủ ấm Memmert INB 500; Memmert- Đức.

- Cân phân tích Ohaus PA 214C (d = 0,0001 g); Ohaus- Mỹ.

- Bộ kit ELISA Rabbit Malondialdehyde (MDA) ELISA Kit, Abbkine: Cat no: KTE90101; lô ATSSE2001; hạn dùng 30/09/2020.

- Bộ kit ELISA EliKine™ Testosterone ELISA Kit, Abbkine, Cat no: KET0001; số lô ATSSE2001, hạn dùng 30/09/2020.

- Âm đạo giả (dùng cho thỏ), Guangxi Jiangs Animal Product Limited Corporation, Trung Quốc.

- Súng bắn tinh dùng để thụ tinh nhân tạo cho thỏ, Guangxi Jiangs Animal Product Limited Corporation, Trung Quốc.

- Dụng cụ cho động vật uống thuốc (kim cong đầu tù các cỡ).

- Micropipet các cỡ, đầu côn, ống falcon các loại.

- Dụng cụ phẫu thuật các cỡ, kim tiêm, chỉ, dao, kéo... và một số dụng cụ, máy móc khác.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp chuẩn bị chế phẩm

Viên nang TXCB được tháo bỏ vỏ nang, trộn đều bột thuốc trong nang. Cân chính xác một lượng bột thuốc trong nang, hòa tan và phân tán vừa đủ bằng dung môi thích hợp (nước). Nồng độ của hỗn dịch bột thuốc được chuẩn bị theo yêu cầu của từng thí nghiệm cụ thể.

2.4.2. Đánh giá độc tính của viên nang TXCB

2.4.2.1. Độc tính cấp và xác định liều LD₅₀

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss*, cả hai giống, khoẻ mạnh, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm như mô tả trong mục 2.2.

Xác định độc tính cấp và LD₅₀ của thuốc thử trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo hướng dẫn của OECD [98].

Trước khi tiến hành thí nghiệm, cho chuột nhịn ăn qua đêm. Từng lô chuột nhắt trắng, mỗi lô 10 con, được uống mẫu thuốc nghiên cứu theo liều tăng dần. Tìm liều cao nhất không gây chết chuột (0%), liều thấp nhất gây chết chuột hoàn toàn (100%) và các liều trung gian. Sau đó theo dõi số lượng chuột chết ở mỗi lô trong vòng 72 giờ sau khi cho chuột uống thuốc lần cuối và theo dõi tình trạng chung của chuột (hoạt động, ăn uống, bài tiết ...) ở mỗi lô trong vòng 14 ngày. Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD₅₀ của thuốc thử (nếu có).

2.4.2.2. Độc tính bán trường diễn

Chuột cống trắng chủng *Wistar* cả hai giống như mô tả trong mục 2.2 “Động vật nghiên cứu”. Nghiên cứu được tiến hành theo hướng dẫn số 408 của OECD [99]. Thiết kế nghiên cứu cụ thể như sau:

Tất cả các chuột mỗi giống được chia ngẫu nhiên vào 3 lô:

- + Lô 1: lô chứng sinh lý, uống nước cất với lượng 4 mL/kg/ngày.
- + Lô 2: uống viên nang TXCB liều 0,42 g/kg/ngày.
- + Lô 3: uống viên nang TXCB liều 1,26 g/kg/ngày.

Chuột được uống nước cất (lô chứng sinh lý) hoặc viên nang TXCB (lô 2 và lô 3) 01 lần/ngày vào buổi sáng liên tục trong 90 ngày.

- Chỉ số đánh giá: Đánh giá trên các chỉ tiêu sau:

+ Thể trạng chung của chuột, trọng lượng chuột, các dấu hiệu ngộ độc, tỉ lệ chuột chết được theo dõi trong suốt thời gian nghiên cứu.

+ Các mẫu máu được lấy vào các thời điểm: ngày 0, 30, 60 và 90 ở tất cả các lô. Các mẫu máu được phân tích các chỉ số huyết học (số lượng hồng cầu- RBC; hematocrit- HCT, hemoglobin- HBG, thể tích trung bình hồng cầu- MCV, số lượng bạch cầu- WBC và số lượng tiểu cầu- PLT).

+ Các chỉ số sinh hóa (cholesterol, alanin aminotransferase- ALT, aspartat transaminase- AST, creatinin và albumin).

Sau khi lấy máu vào ngày 90, động vật được giết để đánh giá đại thể các cơ quan: gan, lách và thận. Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, lách, thận của ít nhất 40% số chuột ở mỗi lô.

2.4.3. Đánh giá tác dụng tăng cường chức năng sinh dục đực của viên nang TXCB

2.4.3.1. Nghiên cứu hoạt tính androgen trên mô hình chuột cống đực non thiếu

Áp dụng mô hình Hershberger trên chuột cống đực non thiếu.

Chuột cống đực non được nuôi ổn định trong môi trường phòng thí nghiệm như mô tả trong mục 2.2 “Động vật nghiên cứu”. Đến ngày thứ 42, thiếu chuột theo phương pháp của Ottani và cộng sự [100] sau đó tiến hành thí nghiệm theo hướng dẫn của OECD [47], theo các bước cụ thể như sau:

Sau khi thiếu chuột, cho chuột nghỉ ngơi trong 7 ngày và phân ngẫu nhiên chuột vào 4 lô nghiên cứu, mỗi lô 10 con như sau:

- Lô 1 (lô chứng sinh lý): Uống nước cất với thể tích 4 mL/kg/ngày.

- Lô 2 (lô chứng dương): Tiêm dưới da đùi dung dịch testosterone propionat với liều 0,2 mg/kg/ngày.

- Lô 3 (lô trị 1): Uống viên nang TXCB liều 0,42 g/kg/ngày.

- Lô 4 (lô trị 2): Uống viên nang TXCB liều 0,84 g/kg/ngày.

Chuột được uống nước cất, tiêm thuốc đối chứng hoặc cho uống thuốc nghiên cứu mỗi ngày 1 lần vào buổi sáng. Thời gian dùng thuốc là 10 ngày.

Ở ngày thứ 11, cân chuột sau đó giết chuột, mổ bóc tách cẩn thận các cơ quan sinh dục phụ: túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper, đầu dương vật và cơ

nâng hậu môn. Xác định khối lượng bằng cách cân trên cân phân tích; riêng đối với túi tinh, ép nhẹ loại bỏ tinh dịch trước khi cân.

Từ kết quả trọng lượng các cơ quan, tính trọng lượng tương đối g/100 g trọng lượng cơ thể chuột. So sánh giữa các lô với nhau.

2.4.3.2. Nghiên cứu tác dụng trên chức năng cương dương

Chuột cống trắng đực (như mô tả trong mục 2.2 “Động vật nghiên cứu”) 40 con, lấy ra ngẫu nhiên 8 con để làm lô chứng sinh lý (lô 1- không gây ĐTĐ). 32 con còn lại được gây ĐTĐ bằng cách tiêm phúc mạc STZ (pha trong dung dịch đệm natri citrat 50 mM, pH 4,5) liều 45 mg/kg cân nặng, theo phương pháp được mô tả bởi Brian L. Furman [101]. 72 giờ sau khi tiêm, kiểm tra trọng cơ thể và đường huyết chuột. Chuột được coi là ĐTĐ khi đường huyết lớn hơn 300 mg/dL hoặc lớn hơn 16,7 mmol/L.

Sau đó, những chuột ĐTĐ được chia ngẫu nhiên vào 3 lô (lô 2, lô 3 và lô 4), sau đó tiến hành tiếp theo như sau:

- + Lô 1 (lô chứng): uống nước cất với thể tích 4 mL/kg cân nặng/ngày.
- + Lô 2 (lô mô hình): uống nước cất với thể tích 4 mL/kg cân nặng/ngày.
- + Lô 3 (lô sildenafil): uống sildenafil liều 5 mg/kg cân nặng/ngày.
- + Lô 4 (lô TXCB): uống viên nang TXCB liều 0,84 g/kg cân nặng/ngày.

Chuột được uống thuốc hoặc nước 1 lần/ngày vào buổi sáng trong 8 tuần liên tiếp. Các chỉ tiêu nghiên cứu:

- + Thể trạng chung của chuột, được đánh giá, theo dõi trong suốt thời gian nghiên cứu.

- + Trọng lượng cơ thể: xác định trọng lượng cơ thể chuột ở thời điểm ban đầu (trước khi tiêm STZ); sau khi tiêm STZ 72 giờ; trong quá trình uống thuốc 2 lần/tuần và thời điểm kết thúc thí nghiệm.

- + Nồng độ glucose máu: nồng độ glucose máu được đánh giá ở các thời điểm: thời điểm ban đầu trước khi tiêm STZ, 72 giờ sau khi tiêm STZ, sau 4

tuần uống thuốc và sau 8 tuần uống thuốc. Xác định nồng độ glucose máu bằng cách lấy máu đuôi chuột và đo trên máy đo đường huyết AccuCheck Active.

+ Các chỉ số đánh giá chức năng cương dương:

Sau thời gian uống thuốc, chuột được gây mê, phẫu thuật bóc lộ dây thần kinh hang để kích thích điện, đặt catheter vào trong thể hang để đo áp lực máu trong thể hang (ICP) và đặt catheter vào động mạch cảnh để ghi huyết áp động mạch.

Thông số của xung kích thích như sau:

Độ cao xung: 5V,

Chiều rộng xung: 0,005 giây (5 ms),

Tần số xung: 20 Hz,

Số xung lặp lại: 1200 (tương đương với thời gian kích thích 60 giây).

Ghi lại đồ thị của ICP và huyết áp động mạch, sử dụng phần mềm LabChart tính toán các thông số sau:

ICP nền (mmHg): ICP trung bình khi chưa kích thích dây thần kinh hang.

ICPmax (mmHg): Giá trị ICP cực đại sau khi kích thích thần kinh hang.

AUC (mmHg.s): Diện tích dưới đường cong của đồ thị ICP.

MAP (mmHg): Huyết áp động mạch trung bình.

Tỉ số ICPmax/MAP.

+ Nồng độ TES huyết thanh:

Sau khi đo ICP, lấy máu và ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 15 phút, tách lấy huyết thanh, bảo quản ở -80°C đến khi phân tích.

Định lượng TES trong huyết thanh bằng phương pháp ELISA, sử dụng kit ELISA EliKine™ Testosterone, phương pháp tiến hành theo chỉ dẫn của hãng. Đọc kết quả trên máy đọc đĩa ELISA Chromate 4300.

2.4.3.3. *Nghiên cứu tác dụng trên mô hình thỏ gây suy giảm sinh sản bằng fluconazol*

*** Thiết kế nghiên cứu:**

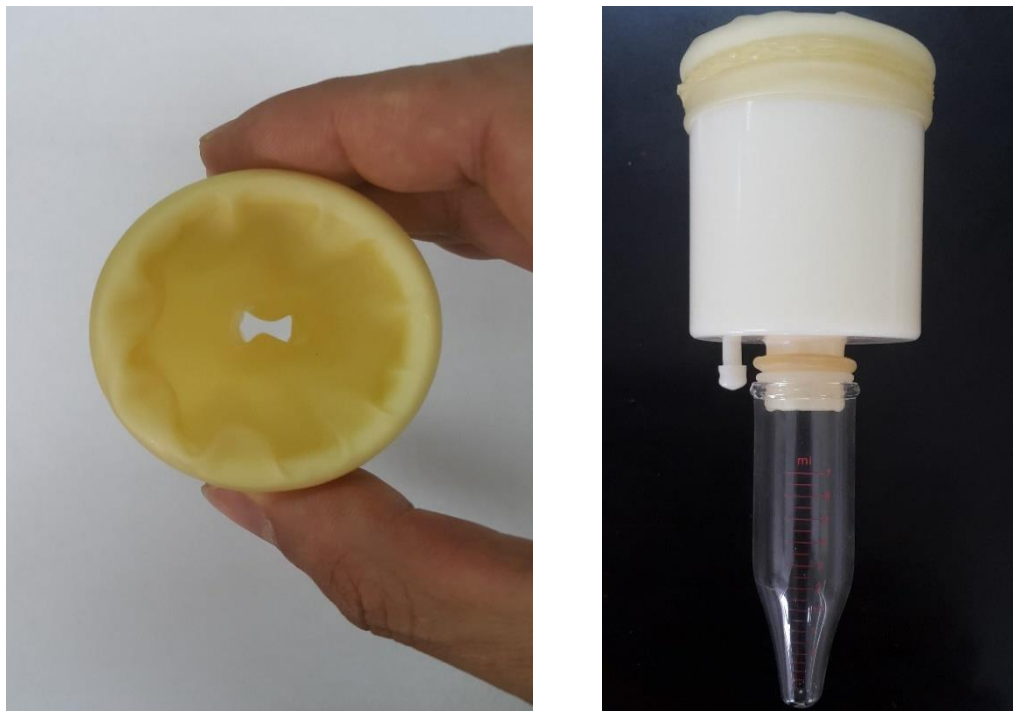
- Thỏ đực trưởng thành, khỏe mạnh, như mô tả trong mục 2.2 “Động vật nghiên cứu”. Trước khi tiến hành thí nghiệm, thỏ đực được huấn luyện, làm quen với lấy tinh bằng âm đạo giả với tần suất 2 lần/tuần trong 2 tuần. Cấu tạo và cách dùng âm đạo giả được mô tả như sau:

+ Cấu tạo của âm đạo giả gồm:

Thân âm đạo giả: ống rỗng hình trụ, bằng nhựa tổng hợp, cao khoảng 6 cm, đường kính khoảng 5 cm, mặt trên rỗng, mặt dưới có 2 lỗ, một lỗ ở chính giữa đường kính 1,5 cm (để gắn với ống thu tinh) và một lỗ nhỏ điều chỉnh mức nước làm ẩm âm đạo giả.

Quả bóng cao su cát thủng đáy, lót mặt trong của thân âm đạo giả. Khi lót mặt trong thân âm đạo giả có tác dụng giữ nước đã làm ẩm.

Ống thu tinh: Là ống thủy tinh đường kính khoảng 2 cm, được chia vạch.



Hình 2.1. Dụng cụ lấy tinh (âm đạo giả)

+ Cách sử dụng:

Trùm phần đáy của quả bóng cao su vào mặt trên thân âm đạo giả, cố định bằng dây thun. Đưa phần đầu quả bóng cao su qua lỗ chính giữa phần đáy thân âm đạo giả. Đổ nước (đã điều chỉnh tới nhiệt độ 42- 45⁰C) qua lỗ ở phần đáy vào giữa lớp cao su và mặt trong của thân âm đạo giả. Cố định phần đầu quả bóng cao su để giữ nước trong thân âm đạo giả. Lắp ống thu tinh ở bên dưới thân âm đạo giả.

Đưa thỏ cái vào chuồng của thỏ đực cần lấy tinh, khi thỏ đực nhảy lên lưng thỏ cái để thực hiện hành vi giao phối, đưa âm đạo giả sao cho dương vật thỏ đực tiếp xúc với bề mặt cao su của âm đạo giả. Khi dương vật thỏ đực tiếp xúc với bề mặt ẩm của âm đạo giả, thỏ đực sẽ xuất tinh.

- Thỏ đực sau khi hoàn thành giai đoạn tập làm quen với lấy tinh sẽ được chia ngẫu nhiên thành 4 lô nghiên cứu, mỗi lô 8 con. Lô 1 (lô chứng sinh lý) không uống fluconazol (FLZ); lô 2, lô 3 và lô 4 gây suy giảm sinh sản bằng cách uống FLZ theo phương pháp của Al- Medany và cs [102] có cải tiến. Thiết kế nghiên cứu cụ thể như sau:

+ Lô 1 (chứng sinh lý): uống natri carboxymethyl cellulose (Na CMC) 2,0% (dung môi pha FLZ) và uống dung môi pha thuốc (nước) trong 30 ngày sau đó uống dung môi pha thuốc (nước) trong 30 ngày.

+ Lô 2 (lô mô hình): uống FLZ liều 50 mg/kg cân nặng trong 30 ngày sau đó uống dung môi pha thuốc (nước) trong 30 ngày.

+ Lô 3 (lô trị 1): uống FLZ liều 50 mg/kg cân nặng và uống viên nang TXCB liều 180 mg/kg cân nặng/ ngày trong 30 ngày sau đó uống viên nang TXCB liều 180 mg/kg cân nặng/ ngày trong 30 ngày tiếp theo.

+ Lô 4 (lô trị 2): uống FLZ liều 50 mg/kg cân nặng và uống viên nang TXCB liều 360 mg/kg cân nặng/ ngày trong 30 ngày sau đó uống viên nang TXCB liều 360 mg/kg cân nặng/ ngày trong 30 ngày tiếp theo.

Thỏ được uống FLZ vào buổi sáng, uống thuốc nghiên cứu vào buổi chiều trong 30 ngày đầu sau đó uống thuốc nghiên cứu hoặc dung môi pha thuốc 01 lần/ngày vào buổi sáng trong 30 ngày tiếp theo.

*** Chỉ số đánh giá:**

Các chỉ số đánh giá bao gồm:

- Tình trạng chung của thỏ (lông, mắt, phân...), các dấu hiệu độc tính... được đánh giá, theo dõi trong suốt thời gian nghiên cứu.

- Trọng lượng cơ thể: Xác định trọng lượng cơ thể thỏ ở thời điểm ban đầu; trong quá trình uống thuốc 2 lần/tuần và thời điểm kết thúc thí nghiệm.

- Lấy tinh dịch:

Thỏ được lấy tinh dịch vào buổi sáng như mô tả ở trên tại các thời điểm: thời điểm ban đầu (trước khi gây suy giảm sinh sản); sau khi gây suy giảm sinh sản (sau khi uống FLZ 30 ngày) và sau 60 ngày uống thuốc nghiên cứu (3 lần lấy tinh/động vật). Tinh trùng được lấy vào một thời điểm nhất định trong ngày.

Trong quá trình lấy tinh, tính thời gian tiếp cận của thỏ đực. Thời gian tiếp cận là thời gian (giây) kể từ khi thả thỏ cái vào chuồng thỏ đực đến khi thỏ đực có động tác nhảy lên lưng con cái để thực hiện hành vi giao phối.

Tinh dịch sau khi lấy được phân tích đánh giá ngay các chỉ tiêu:

+ Thể tích tinh dịch (mL): được đo trực tiếp bằng ống thu tinh.

+ pH tinh dịch: được xác định bằng giấy đo pH.

Sau đó tinh dịch được chuyển ngay đến phòng thí nghiệm để phân tích các chỉ tiêu:

+ Mật độ tinh trùng, % tinh trùng di động, % tinh trùng di động tiến tới, % tinh trùng di động không tiến tới, % tinh trùng không di động được phân tích bằng máy phân tích tinh trùng tự động QwikCheck™ Gold- Isarel kèm theo E-capillary.

+ Tổng số tinh trùng: được tính bằng tích số của mật độ tinh trùng và thể tích tinh dịch.

+ % tinh trùng chết được đánh giá bằng vật kính 100X trên kính hiển vi huỳnh quang Nikon Eclipse Ti2 sau khi nhuộm eosin- nigrosin (thêm đồng lượng hỗn dịch eosin- nigrosin vào 50 μ L tinh dịch trong ống nghiệm, trộn đều).

+ % tinh trùng có hình thái bất thường: nhuộm Papanicolaou trên máy nhuộm tự động Leica Autostainer XL- ST5010 và đánh giá trên kính hiển vi huỳnh quang Nikon Eclipse Ti2 ở vật kính 100X. Quy trình nhuộm đánh giá sự sống- chết và hình thái của tinh trùng được thực hiện theo hướng dẫn của WHO [40], cụ thể như sau:

Tiêu bản sau khi kéo được cố định trong ethanol 96%, sau đó tiến hành nhuộm qua các bước:

Bảng 2.2. Quy trình nhuộm Papanicolaou

TT	Dung dịch	Thời gian	TT	Dung dịch	Thời gian
1	Ethanol 80%	30 giây	10	Ethanol 95%	15 phút
2	Ethanol 50%	30 giây	11	Cam OG-6	1 phút
3	Nước tinh khiết	30 giây	12	Ethanol 95%	30 giây
4	Haematoxylin	4 phút	13	Ethanol 95%	30 giây
5	Nước tinh khiết	30 giây	14	Ethanol 95%	30 giây
6	Ethanol acid hóa	6 giây	15	Xanh EA-50	1 phút
7	Nước máy lạnh	5 phút	16	Ethanol 95%	30 giây
8	Ethanol 50%	30 giây	17	Ethanol 95%	30 giây
9	Ethanol 80%	30 giây	18	Ethanol 100%	15 giây
			19	Ethanol 100%	15 giây

- Nồng độ malondialdehyd (MDA):

+ MDA trong tinh dịch: các mẫu tinh dịch sau khi phân tích tinh dịch đồ được ly tâm ở 3000 vòng/15 phút, tách lấy dịch trong và bảo quản trong tủ lạnh âm sâu ở -80°C đến phân tích.

+ MDA trong huyết thanh: sau khi lấy tinh, lấy 2 mL máu tĩnh mạch tại thỏ vào ống tách huyết thanh. Để yên cho máu đông trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm ở 3000 vòng/15 phút, tách huyết thanh thu được làm 2 phần và bảo quản ở -80°C đến khi phân tích (một phần huyết thanh dùng để phân tích nồng độ MDA và một phần huyết thanh dùng để phân tích nồng độ TES).

Phân tích nồng độ MDA trong huyết thanh và MDA trong tinh dịch bằng phương pháp ELISA, sử dụng kit ELISA Rabbit Malondialdehyde (MDA) ELISA Kit, Abbkine, tiến hành theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất, đọc kết quả trên máy đọc đĩa Chromate 4300 (Awareness Technology, Mỹ).

- Nồng độ TES huyết thanh:

Phân tích nồng độ TES huyết thanh bằng phương pháp ELISA, sử dụng kit ELISA EliKine™ Testosterone ELISA Kit, Abbkine, tiến hành theo quy trình hướng dẫn của hãng sản xuất, đọc kết quả trên máy đọc đĩa Chromate 4300 (Awareness Technology, Mỹ).

- Đánh giá tỉ lệ thụ thai và số con sinh ra của thỏ cái:

Ở thời điểm sau 60 ngày, các mẫu tinh dịch được pha loãng với dung dịch đệm Tris tới mật độ khoảng 20×10^6 (tinh trùng/mL). Thỏ cái được tiêm bắp 0,8 mL dung dịch cloprostenol 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trước khi thụ tinh 52 giờ. Thụ tinh cho thỏ cái bằng súng bắn tinh với lượng 0,5 mL/con. Ngay sau khi thụ tinh, tiêm bắp 0,2 mL dung dịch gonadorelin acetat 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ để gây rụng trứng. Tinh dịch của mỗi thỏ đực được thụ tinh cho 2 thỏ cái.

Xác định thỏ cái mang thai sau 14 ngày thụ tinh. Theo dõi thỏ cái đến khi đẻ, tính tỉ lệ thụ thai và số con/lứa đẻ.

- Mô học tinh hoàn:

Kết thúc thí nghiệm, lấy tinh hoàn, làm tiêu bản nhuộm HE (hematoxylin và eosin) và đánh giá hình ảnh vi thể của 50% số tinh hoàn.

2.5. Xử lý số liệu

Tính toán các kết quả nghiên cứu dựa vào kết quả in trực tiếp từ máy (nếu có), tính toán dựa trên phần mềm Microsoft Excel. Các số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình (TB) \pm SD, sử dụng thuật toán thống kê thích hợp với số liệu thu được, cụ thể như sau:

- So sánh sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các lô sử dụng phân tích phương sai 1 chiều (One-way ANOVA) và Post Hoc least- significant differences (LSD) test với trường hợp phương sai đồng nhất, sử dụng One-way ANOVA và Dunnett's T3 test với trường hợp phương sai không đồng nhất.

- So sánh sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các thời điểm nghiên cứu trong cùng một lô sử dụng phép so sánh theo cặp (Paired sample T test).

- So sánh tỉ lệ thụ thai giữa các lô sử dụng Chi Square tests.

Các kết quả xử lý thống kê được tính toán trên phần mềm IBM SPSS Statistics 20.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p \leq 0,05$.

2.6. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

* Thời gian nghiên cứu:

Các nghiên cứu được tiến hành từ tháng 02 năm 2018 đến tháng 6 năm 2020.

* Địa điểm nghiên cứu:

- Bộ môn Dược lý- Viện Đào tạo Dược- Học viện Quân y;
- + Phòng chăn nuôi động vật thí nghiệm.
- + Labo nghiên cứu dược lý *in vivo*.
- Đơn vị hỗ trợ sinh sản, Trung tâm Huyết học và truyền máu, Bệnh viện 198, Bộ Công an.
- Khoa giải phẫu bệnh lý- pháp y, Bệnh viện Quân y 103.
- Trung tâm Công nghệ sinh học Đông Nam Á (trang trại chăn nuôi thỏ tại xã Tân Ước, huyện Thanh Oai, thành phố Hà Nội).

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả đánh giá độc tính của viên nang TXCB

3.1.1. Độc tính cấp và liều LD_{50}

Kết quả xác định độc tính cấp của viên nang TXCB trên chuột nhắt trắng được thể hiện trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Độc tính cấp theo đường uống của viên nang TXCB

Lô chuột	Số chuột	Tổng liều sử dụng (g/kg/ngày)	Số chuột sống/chết	
			Sau 24 giờ	Sau 72 giờ
Lô 1	10	7,5	10/0	10/0
Lô 2	10	9,0	10/0	10/0
Lô 3	10	10,5	10/0	10/0
Lô 4	10	12,0	10/0	10/0
Lô 5	10	13,5	10/0	10/0
Lô 6	10	15,0	10/0	10/0

Nhận xét:

Kết quả bảng 3.1 cho thấy: với các mức liều khác nhau từ 7,5 g/kg thể trọng/ngày đến 15,0 g/kg thể trọng/ngày, tại tất cả các lô không có chuột nào chết sau 24 giờ và sau 72 giờ uống thuốc.

Như vậy, chuột đã uống đến liều 15,0 g/kg thể trọng là liều tối đa có thể dùng được bằng đường uống để đánh giá độc tính cấp của TXCB nhưng không có chuột nào chết.

Ngoài ra, khi theo dõi đến 14 ngày sau khi uống liều cuối cùng, chuột ở các lô đều khỏe mạnh, không xuất hiện triệu chứng bất thường hoặc dấu hiệu ngộ độc nào. Các chuột đều vận động bình thường, thở bình thường, lông mượt, mắt trong, phân khô.

Như vậy, chưa tìm thấy LD₅₀ của viên nang TXCB theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong 24 giờ là 15,0 g/kg thể trọng không xuất hiện độc tính cấp.

3.1.2. Độc tính bán trường diễn

3.1.2.1. Ảnh hưởng tới thể trạng chung, dấu hiệu ngộ độc và trọng lượng cơ thể chuột

Quan sát trong suốt thời gian nghiên cứu thấy: thể trạng chung của chuột bình thường, không thấy bất kì chuột nào có các dấu hiệu ngộ độc hoặc chết trong tất cả các lô. Tất cả các chuột ở lô chứng, lô trị 1 và lô trị 2 đều ăn, uống bình thường, lông mượt, mắt trong, phân khô.

Trọng lượng cơ thể chuột ở các lô được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.2. Trọng lượng cơ thể chuột (g) ở các lô theo thời gian (n = 10)

Thời điểm	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	p lô
Ban đầu	169,8 ± 5,07	171,0 ± 5,68	169,4 ± 4,60	0,771
Sau 30 ngày	187,6 ± 5,83	189,4 ± 8,41	188,8 ± 5,77	0,834
Sau 60 ngày	214,8 ± 7,83	217,5 ± 9,44	215,7 ± 9,25	0,788
Sau 90 ngày	233,9 ± 8,05	235,1 ± 9,92	236,4 ± 11,01	0,849

Ghi chú: Lô trị 1: Uống TXCB 0,42 g/kg; Lô trị 2: Uống TXCB 1,26 g/kg.

Nhận xét:

Qua bảng trên cho thấy, không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) về trọng lượng cơ thể chuột giữa các lô ở cùng thời điểm đánh giá trong suốt thời gian nghiên cứu. Chuột ở các lô chuột có sự tăng trọng lượng tương đồng nhau.

3.1.2.2. Ảnh hưởng tới các chỉ số huyết học

*** Một số chỉ số về hồng cầu:**

Ảnh hưởng của TXCB tới số lượng hồng cầu, huyết sắc tố (hemoglobin), tỉ lệ thể tích hồng cầu/ thể tích máu toàn bộ (hematocrit) và thể tích trung bình hồng cầu máu chuột được trình bày trong bảng 3.3.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của viên nang TXCB tới một số chỉ số hồng cầu (n = 10)

	Chỉ số	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	p lô
Ban đầu	RBC (T/L)	7,98 ± 0,69	8,16 ± 1,44	7,81 ± 0,75	0,748
	HGB (g/L)	138,30 ± 18,19	135,40 ± 27,43	136,60 ± 19,09	0,957
	HCT (%)	40,61 ± 2,38	41,26 ± 6,81	41,50 ± 4,21	0,913
	MCV (fL)	52,30 ± 2,11	51,10 ± 2,18	51,80 ± 1,40	0,390
Sau 30 ngày	RBC (T/L)	8,74 ± 0,68	9,00 ± 1,26	8,55 ± 0,77	0,561
	HGB (g/L)	146,00 ± 9,96	143,80 ± 14,51	145,10 ± 6,90	0,903
	HCT (%)	43,26 ± 2,70	43,19 ± 5,33	42,22 ± 2,05	0,777
	MCV (fL)	49,90 ± 2,47	49,30 ± 3,43	49,80 ± 3,97	0,912
Sau 60 ngày	RBC (T/L)	8,71 ± 0,71	8,20 ± 1,21	8,12 ± 1,33	0,448
	HGB (g/L)	137,60 ± 15,13	141,40 ± 21,04	144,80 ± 9,89	0,609
	HCT (%)	41,96 ± 4,51	42,08 ± 6,72	44,30 ± 3,58	0,523
	MCV (fL)	50,90 ± 2,38	51,30 ± 1,89	50,80 ± 1,32	0,827
Sau 90 ngày	RBC (T/L)	8,63 ± 0,54	9,03 ± 0,96	8,37 ± 0,43	0,118
	HGB (g/L)	143,00 ± 9,23	149,40 ± 11,55	148,20 ± 5,98	0,533
	HCT (%)	41,51 ± 2,45	43,16 ± 2,56	43,09 ± 2,52	0,265
	MCV (fL)	50,40 ± 1,78	49,40 ± 3,17	50,10 ± 3,11	0,711
p thời điểm		> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Ghi chú: RBC: Số lượng hồng cầu; HGB: hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: thể tích trung bình hồng cầu.

Lô trị 1: Uống TXCB 0,42 g/kg; Lô trị 2: Uống TXCB 1,26 g/kg.

Nhận xét:

Khi so sánh giữa các lô, kết quả cho thấy các chỉ số: số lượng hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu máu chuột giữa các lô trong cùng một thời điểm nghiên cứu đều khác nhau không có ý nghĩa ($p > 0,05$; ANOVA).

Khi so sánh giữa các thời điểm trong cùng một lô, kết quả cho thấy số lượng hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu máu chuột giữa các thời điểm nghiên cứu cũng khác nhau không có ý nghĩa ($p > 0,05$).

*** Số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu:**

Ảnh hưởng của TXCB lên số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu máu chuột ở các lô theo thời gian được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của viên nang TXCB tới số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu (n = 10)

	Chỉ số	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	p lô
Ban đầu	WBC (G/L)	11,62 ± 2,06	11,14 ± 1,99	11,59 ± 4,55	0,929
	PLT (G/L)	615,30 ± 120,95	561,90 ± 180,47	649,20 ± 103,09	0,379
Sau 30 ngày	WBC (G/L)	12,51 ± 2,87	12,63 ± 4,55	12,12 ± 2,88	0,946
	PLT (G/L)	575,40 ± 74,71	625,90 ± 136,33	609,00 ± 119,57	0,603
Sau 60 ngày	WBC (G/L)	11,23 ± 3,92	11,77 ± 3,41	11,40 ± 3,47	0,943
	PLT (G/L)	593,10 ± 139,33	637,40 ± 124,89	702,60 ± 100,25	0,152
Sau 90 ngày	WBC (G/L)	12,74 ± 4,17	12,45 ± 2,48	11,89 ± 3,90	0,867
	PLT (G/L)	588,60 ± 39,59	609,30 ± 110,42	635,70 ± 150,94	0,638
p thời điểm		> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Ghi chú: WBC: số lượng bạch cầu; PLT: số lượng tiểu cầu.

Lô trị 1: Uống TXCB 0,42 g/kg; Lô trị 2: Uống TXCB 1,26 g/kg.

Nhận xét:

Tại cùng một thời điểm nghiên cứu, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu máu chuột giữa các lô đều không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$; ANOVA).

Khi so sánh trong cùng một lô, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu máu chuột cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) giữa các thời điểm nghiên cứu.

3.1.2.3. Ảnh hưởng của TXCB tới một số chỉ số sinh hóa máu

*** Hoạt độ enzym AST (U/L) và hoạt độ enzym ALT (U/L):**

Ảnh hưởng của TXCB tới hoạt độ các enzym AST và ALT được trình bày trong bảng 3.5.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của TXCB lên hoạt độ enzym AST và ALT (n = 10)

	Chỉ số	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	p lô
Ban đầu	AST (U/L)	95,30 ± 29,45	96,20 ± 36,64	90,50 ± 25,82	0,907
	ALT (U/L)	73,10 ± 20,37	67,30 ± 14,43	71,40 ± 25,29	0,811
Sau 30 ngày	AST (U/L)	89,70 ± 19,45	88,80 ± 43,30	85,40 ± 8,82	0,936
	ALT (U/L)	64,60 ± 16,82	55,90 ± 9,77	61,70 ± 11,82	0,336
Sau 60 ngày	AST (U/L)	101,20 ± 34,15	104,60 ± 39,92	104,20 ± 42,71	0,978
	ALT (U/L)	72,50 ± 23,21	64,80 ± 19,83	77,10 ± 26,76	0,504
Sau 90 ngày	AST (U/L)	87,20 ± 25,59	85,20 ± 14,14	88,20 ± 10,81	0,931
	ALT (U/L)	66,80 ± 17,90	63,50 ± 18,11	66,50 ± 10,41	0,877
p thời điểm		> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Ghi chú: Lô trị 1: Uống TXCB 0,42 g/kg; Lô trị 2: Uống TXCB 1,26 g/kg.

Nhận xét:

Qua bảng trên cho thấy, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) về hoạt độ enzym AST và ALT khi so sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm nghiên cứu và khi so sánh giữa các thời điểm khác nhau trong cùng một lô.

*** Nồng độ creatinin (mmol/L):**

Nồng độ creatinin máu chuột của các lô được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của viên nang TXCB lên nồng độ creatinin máu (n = 10)

Thời điểm	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	p lô
Ban đầu	55,80 ± 10,81	56,00 ± 17,74	56,90 ± 13,39	0,983
Sau 30 ngày	49,20 ± 4,59	46,50 ± 4,35	50,30 ± 4,22	0,157
Sau 60 ngày	45,80 ± 10,96	45,00 ± 20,79	47,70 ± 5,95	0,907
Sau 90 ngày	50,40 ± 11,69	48,70 ± 9,29	47,60 ± 5,56	0,792
p thời điểm	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Ghi chú: Lô trị 1: Uống TXCB 0,42 g/kg; Lô trị 2: Uống TXCB 1,26 g/kg.

Nhận xét:

Qua bảng trên cho thấy: không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) về nồng độ creatinin giữa các lô trong cùng một thời điểm; đồng thời cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) khi so sánh giữa các thời điểm trong cùng một lô nghiên cứu.

*** Nồng độ albumin (g/L):**

Nồng độ albumin máu chuột của các lô được trình bày trong bảng 3.7:

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của viên nang TXCB lên nồng độ albumin máu ($n = 10$)

Thời điểm	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	p lô
Ban đầu	31,30 ± 1,34	31,20 ± 2,62	32,10 ± 1,60	0,528
Sau 30 ngày	32,80 ± 1,99	30,40 ± 3,50	31,70 ± 1,64	0,120
Sau 60 ngày	31,10 ± 2,73	30,60 ± 3,69	33,00 ± 1,70	0,153
Sau 90 ngày	30,70 ± 3,68	31,90 ± 1,52	32,30 ± 2,41	0,396
p thời điểm	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Ghi chú: Lô trị 1: Uống TXCB 0,42 g/kg; Lô trị 2: Uống TXCB 1,26 g/kg.

Nhận xét:

Kết quả cho thấy: không có sự khác nhau có ý nghĩa ($p > 0,05$) về nồng độ albumin máu giữa các lô nghiên cứu trong cùng một thời điểm. Đồng thời, cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) khi so sánh giữa các thời điểm trong cùng một lô.

*** Nồng độ cholesterol (mmol/L):**

Nồng độ cholesterol máu chuột được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của TXCB lên nồng độ cholesterol máu ($n = 10$)

Thời điểm	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	p lô
Ban đầu	1,27 ± 0,25	1,28 ± 0,23	1,22 ± 0,20	0,822
Sau 30 ngày	1,02 ± 0,41	1,05 ± 0,42	1,10 ± 0,51	0,922
Sau 60 ngày	1,08 ± 0,42	1,31 ± 0,16	1,20 ± 0,16	0,193
Sau 90 ngày	1,14 ± 0,26	1,24 ± 0,16	1,23 ± 0,18	0,493
p thời điểm	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

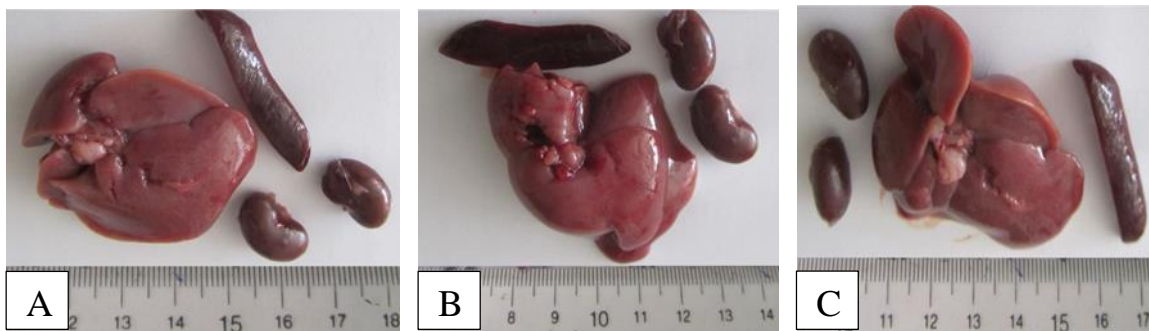
Ghi chú: Lô trị 1: Uống TXCB 0,42 g/kg; Lô trị 2: Uống TXCB 1,26 g/kg.

Nhận xét:

Kết quả bảng trên cho thấy: không có sự khác nhau có ý nghĩa ($p > 0,05$) về nồng độ cholesterol máu giữa các lô nghiên cứu trong cùng một thời điểm. Đồng thời, cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) khi so sánh giữa các thời điểm trong cùng một lô.

3.1.2.4. Ảnh hưởng của TXCB lên hình ảnh đại thể và vi thể một số cơ quan*** Hình ảnh đại thể gan, lách, thận:**

Hình ảnh đại thể gan, lách và thận của các lô nghiên cứu được trình bày trong hình sau:



Hình 3.1. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận của chuột ở các lô nghiên cứu
Ghi chú: A: lô chứng (chuột số 28); B: lô trị 1 (TXCB 0,42 g/kg) (chuột số 5);
C: lô trị 2 (TXCB 1,26 g/kg) (chuột số 16)

Nhận xét:

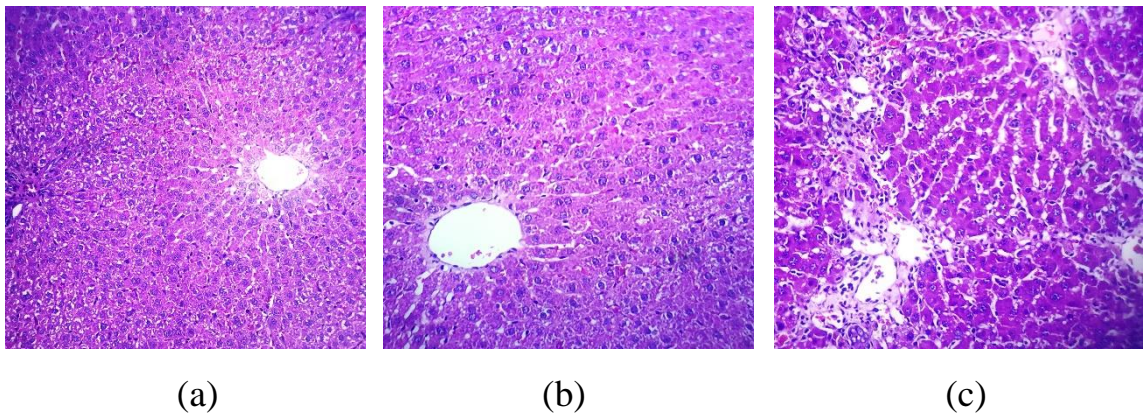
Quan sát đại thể bằng mắt thường dưới kính lúp, cho thấy: màu sắc, hình thái của gan, lách và thận ở hai lô dùng TXCB (ảnh B và ảnh C) có màu nâu đỏ thẫm đồng đều, bề mặt nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết, có đàn hồi khi ấn xuống. Không có sự khác biệt khi so với hình ảnh gan, lách, thận của chuột ở lô chứng (ảnh A).

*** Hình ảnh vi thể gan, lách, thận:**

Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học gan, lách, thận chuột cho thấy:

- Hình ảnh vi thể gan (hình 3.2): Ở các lô đều thấy: các bè gan, tiểu thùy gan và tế bào gan bình thường, không có hình ảnh thoái hóa hoặc viêm, tĩnh

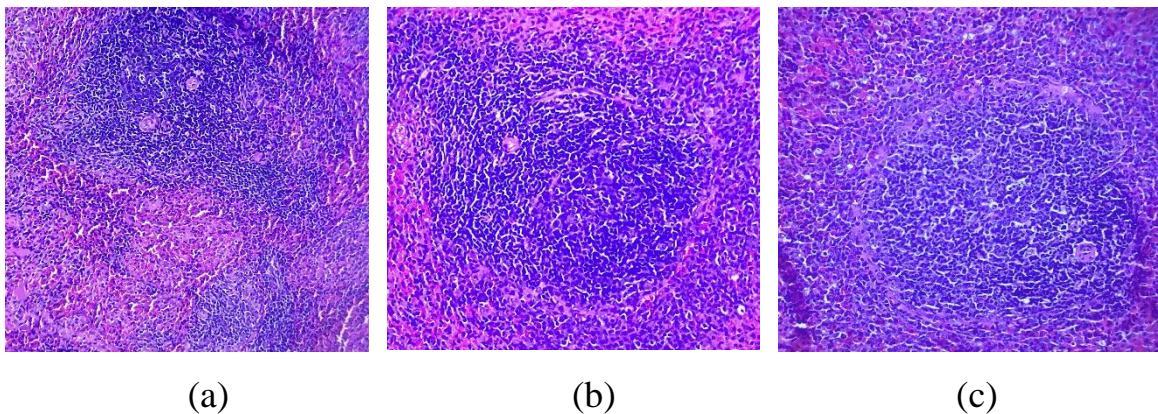
mạch trung tâm không giãn, các xoang mạch nan hoa và tĩnh mạch khoảng cửa không xung huyết.



Hình 3.2. Hình ảnh vi thể gan của chuột ở các lô nghiên cứu

Ghi chú: Nhuộm HE (400X); (a): lô chứng (chuột số 30); (b): lô trị 1 (TXCB 0,42 g/kg) (chuột số 01); (c): lô trị 2 (TXCB 1,26 g/kg) (chuột số 13).

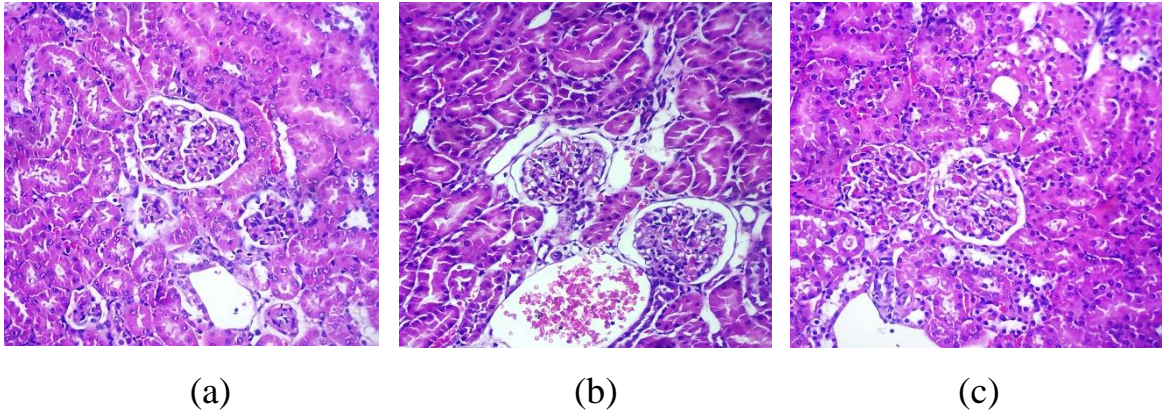
- Hình ảnh vi thể lách: Tại tất cả các lô: Lách rõ cấu trúc vùng vỏ và vùng tủy, vùng vỏ có các nang lympho lớn với động mạch bút lông. Không có xuất huyết, hoại tử. Vi thể lách được thể hiện trong hình 3.3.



Hình 3.3. Hình ảnh vi thể lách của chuột ở các lô nghiên cứu

Ghi chú: Nhuộm HE (400X); (a): lô chứng (chuột số 27); (b): lô trị 1 (TXCB 0,42 g/kg) (chuột số 02); (c): lô trị 2 (TXCB 1,26 g/kg) (chuột số 11).

- Hình ảnh vi thể thận: Ở tất cả các lô đều thấy: Các tiểu cầu thận với mao cuộn mạch rõ, các tế bào ống thận bình thường. Ảnh vi thể thận được thể hiện trong hình 3.4.



Hình 3.4. Hình ảnh vi thể thận của chuột ở các lô nghiên cứu

Ghi chú: Nhuộm HE (400X); (a): lô chứng (chuột số 26); (b): lô trị 1 (TXCB 0,42 g/kg) (chuột số 07); (c): lô trị 2 (TXCB 1,26 g/kg) (chuột số 18).

Như vậy, TXCB dùng đường uống với liều 0,42 g/kg/ngày và 1,26 g/kg/ngày liên tục trong 90 ngày đã không gây tổn thương trên gan, thận, lách của chuột.

3.2. Kết quả đánh giá tác dụng của viên nang TXCB trên chức năng sinh dục đực

3.2.1. Hoạt tính androgen của viên nang TXCB trên chuột công đực non thiến

3.2.1.1. Ảnh hưởng của viên nang TXCB trên trọng lượng cơ thể chuột

Trọng lượng cơ thể chuột được trình bày trong bảng 3.9:

Bảng 3.9. Trọng lượng cơ thể chuột (g) ở các lô nghiên cứu

Lô chuột	n	Ban đầu	Kết thúc
Lô chứng sinh lý	10	125,7 ± 4,8	161,5 ± 5,2
Lô chứng dương	10	125,2 ± 4,8	161,3 ± 4,4
Lô trị 1 (TXCB 0,42 g/kg)	10	124,4 ± 4,8	160,7 ± 4,4
Lô trị 2 (TXCB 0,84 g/kg)	10	127,1 ± 3,3	163,1 ± 3,8
p lô		0,591	0,667

Nhận xét:

Sau thời gian nghiên cứu, chuột tăng trọng lượng đều ở các lô, không có sự khác biệt về trọng lượng chuột ở các lô tại cùng một thời điểm. Ngoài ra, thể trạng chuột bình thường; chuột ăn uống tốt; lông mượt; phân khô.

3.2.1.2. Tác dụng của TXCB trên trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ*** Tác dụng trên trọng lượng tương đối túi tinh:**

Tác dụng của viên nang TXCB lên trọng lượng tương đối (g/100g trọng lượng cơ thể) của túi tinh được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.10. Trọng lượng tương đối túi tinh chuột

Lô nghiên cứu	n	Trọng lượng tương đối	Tăng so với lô chứng
Lô chứng sinh lý	10	0,273 ^b ± 0,047	-
Lô chứng dương	10	0,403 ^a ± 0,104	47,60%
Lô trị 1 (TXCB 0,42 g/kg)	10	0,354 ^{ab} ± 0,089	29,55%
Lô trị 2 (TXCB 0,84 g/kg)	10	0,368 ^a ± 0,082	34,81%
p lô		0,010	

Ghi chú: ^{a, b}: sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong một cột.

Nhận xét:

Từ kết quả trên cho thấy (ANOVA và Dunnett's T3 Test): Ở lô chứng dương và lô trị 2 có trọng lượng tương đối túi tinh cao hơn đáng kể so với lô chứng sinh lý với p lần lượt là 0,019 và 0,036.

Không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) về trọng lượng tương đối của túi tinh giữa lô trị 1 với lô chứng; giữa lô testosterone với lô trị 1, trị 2 và giữa lô trị 1 với lô trị 2.

*** Tác dụng trên trọng lượng tương đối tuyến tiền liệt:**

Kết quả được trình bày trong bảng 3.11.

Bảng 3.11. Trọng lượng tương đối tuyến tiền liệt chuột

Lô nghiên cứu	n	Trọng lượng tương đối	Tăng so với lô chứng
Lô chứng sinh lý	10	0,098 ± 0,022	-
Lô chứng dương	10	0,123 ^a ± 0,023	25,25%
Lô trị 1 (TXCB 0,42 g/kg)	10	0,116 ± 0,021	18,07%
Lô trị 2 (TXCB 0,84 g/kg)	10	0,114 ± 0,017	16,02%
p lô		0,076	

Ghi chú: ^a: sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong một cột.

Nhận xét:

Từ kết quả trên cho thấy: Ở lô chứng dương, trọng lượng tương đối của tuyến tiền liệt cao hơn có ý nghĩa khi so sánh với lô chứng sinh lý ($p = 0,012$). Ở các lô uống TXCB (trị 1 và trị 2), cũng có sự tăng trọng lượng tương đối của tuyến tiền liệt khi so với lô chứng, tuy nhiên sự tăng này chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) về trọng lượng tương đối tuyến tiền liệt khi so sánh giữa các lô: lô chứng dương, lô trị 1 và lô trị 2.

*** Tác dụng lên trọng lượng tương đối tuyến Cowper:**

Kết quả được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.12. Trọng lượng tương đối tuyến Cowper chuột

Lô nghiên cứu	n	Trọng lượng tương đối	Tăng so với lô chứng
Lô chứng sinh lý	10	0,019 ^b ± 0,011	-
Lô chứng dương	10	0,031 ± 0,009	67,16%
Lô trị 1 (TXCB 0,42 g/kg)	10	0,028 ± 0,006	49,70%
Lô trị 2 (TXCB 0,84 g/kg)	10	0,029 ± 0,005	53,88%
p lô		0,010	

Ghi chú: ^b: sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong một cột.

Nhận xét:

Từ kết quả bảng trên cho thấy (ANOVA và LSD Test): ở lô chứng dương, trọng lượng tương đối tuyến Cowper là $0,031 \pm 0,009$ cao hơn có ý nghĩa so với lô chứng sinh lý ($0,019 \pm 0,011$; $p = 0,002$).

Ở các lô dùng TXCB trọng lượng tương đối tuyến Cowper lần lượt là $0,028 \pm 0,006$ và $0,029 \pm 0,005$ cũng cao hơn có ý nghĩa với lô chứng sinh lý với p lần lượt là 0,017 và 0,010. Ngoài ra, không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) về trọng lượng tương đối tuyến Cowper khi so sánh giữa các lô: lô chứng dương, lô trị 1 và lô trị 2.

*** Tác dụng lên trọng lượng tương đối đầu dương vật:**

Trọng lượng tương đối (g/100g trọng lượng cơ thể) đầu dương vật ở các lô nghiên cứu được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.13. Trọng lượng tương đối đầu dương vật chuột

Lô nghiên cứu	n	Trọng lượng tương đối	Tăng so với lô chứng
Lô chứng sinh lý	10	$0,031 \pm 0,013$	-
Lô chứng dương	10	$0,033 \pm 0,010$	6,26%
Lô trị 1 (TXCB 0,42 g/kg)	10	$0,035 \pm 0,007$	12,07%
Lô trị 2 (TXCB 0,84 g/kg)	10	$0,034 \pm 0,010$	8,01%
p lô		0,875	

Nhận xét:

Từ kết quả trên (ANOVA và LSD Test) cho thấy: không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) về trọng lượng tương đối đầu dương vật giữa các lô nghiên cứu.

*** Tác dụng lên trọng lượng tương đối cơ nâng hậu môn hành hang:**

Kết quả tác dụng của viên nang TXCB lên trọng lượng tương đối (g/100g trọng lượng cơ thể) cơ nâng hậu môn hành hang chuột cống trắng được trình bày trong bảng 3.14.

Bảng 3.14. Trọng lượng tương đối cơ nâng hậu môn- hành hang chuột

Lô nghiên cứu	n	Trọng lượng tương đối	Tăng so với lô chứng
Lô chứng sinh lý	10	0,350 ^b ± 0,030	-
Lô chứng dương	10	0,398 ± 0,050	13,71%
Lô trị 1 (TXCB 0,42 g/kg)	10	0,392 ± 0,043	12,13%
Lô trị 2 (TXCB 0,84 g/kg)	10	0,394 ± 0,043	12,72%
p lô		0,049	

Ghi chú: ^b: sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong một cột.

Nhận xét:

Từ kết quả ở bảng trên (ANOVA và LSD Test) cho thấy: Ở lô chứng dương, trọng lượng tương đối cơ nâng hậu môn hành hang là $0,398 \pm 0,050$ cao hơn có ý nghĩa so với lô chứng sinh lý ($0,350 \pm 0,030$; $p = 0,015$).

Ở các lô dùng TXCB (lô trị 1 và lô trị 2), trọng lượng tương đối cơ nâng hậu môn hành hang lần lượt là $0,392 \pm 0,043$ và $0,394 \pm 0,043$ cũng cao hơn đáng kể so với lô chứng sinh lý với p lần lượt là 0,030 và 0,024. Ngoài ra, không có sự khác biệt có ý nghĩa về trọng lượng tương đối cơ nâng hậu môn hành hang khi so sánh giữa các lô: lô chứng dương, lô trị 1 và lô trị 2.

3.2.2. Tác dụng trên chức năng cương dương

32 chuột được gây ĐTD bằng cách tiêm phúc mạc dung dịch STZ với liều 45 mg/kg cân nặng. Sau 72 giờ, kiểm tra nồng độ glucose máu có 24/32 chuột thỏa mãn yêu cầu có nồng độ glucose máu lớn hơn 16,7 mmol/L. 24 chuột ĐTD sau đó được chia ngẫu nhiên vào 3 lô nghiên cứu và tiến hành tiếp theo như mô tả trong phần phương pháp. Kết quả nghiên cứu như sau:

3.2.2.1. Trọng lượng cơ thể chuột

Trọng lượng chuột trong các lô, ở các thời điểm nghiên cứu được trình bày trong bảng dưới đây:

Bảng 3.15. Trọng lượng cơ thể chuột (g) ở các thời điểm nghiên cứu (n = 8)

Lô	Ban đầu	Sau 72 giờ	Sau 4 tuần	Sau 8 tuần
Lô chứng	167,5 ± 16,89	169,4 ± 15,57	196,6 ^a ± 12,61	233,0 ^a ± 11,11
Lô mô hình	165,8 ± 17,56	158,1 ± 12,70	177,8 ± 18,11	200,6 ± 15,62
Lô sildenafil	168,3 ± 15,18	158,9 ± 10,48	176,4 ± 7,82	202,8 ± 9,32
Lô TXCB	172,3 ± 12,30	161,0 ± 8,37	179,4 ± 7,63	212,1 ± 11,52
p lô	0,862	0,246	0,009	< 0,001

Ghi chú: ^a: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong một cột.

Nhận xét:

Sau 72 giờ tiêm STZ, khi so sánh trong cùng một lô (paired simple T test), ở những lô chuột bị ĐTD (lô mô hình, lô sildenafil và lô TXCB) có sự giảm đáng kể về trọng lượng so với thời điểm ban đầu ($p < 0,05$). Như vậy ĐTD đã làm giảm trọng lượng cơ thể chuột.

Sau đó, chuột ở các lô ĐTD cũng có sự tăng về trọng lượng tuy nhiên tại các thời điểm 4 tuần và 8 tuần trọng lượng chuột ở các lô gây ĐTD thấp hơn đáng kể so với lô chứng ($p < 0,05$, ANOVA và LSD test).

Không có sự khác biệt giữa 3 lô gây ĐTD về trọng lượng chuột tại các thời điểm nghiên cứu.

3.2.2.2. Nồng độ glucose máu

Nồng độ glucose máu chuột (mmol/L) ở các lô nghiên cứu tại các thời điểm được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.16. Nồng độ glucose máu chuột nghiên cứu (n = 8)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 72 giờ (2)	Sau 4 tuần (3)	Sau 8 tuần (4)	p thời điểm
Lô chứng	5,71 ± 0,32	5,69 ^b ± 0,30	5,75 ^b ± 0,32	5,70 ^c ± 0,34	p > 0,05
Lô mô hình	5,50 ± 0,43	22,36 ± 5,14	21,78 ± 4,45	22,46 ± 4,51	p_{1-2,3,4} < 0,001 p _{2-3,4} > 0,05 p ₃₋₄ > 0,05
Lô sildenafil	5,68 ± 0,69	22,76 ± 4,82	22,33 ± 4,00	22,54 ± 4,27	p_{1-2,3,4} < 0,001 p _{2-3,4} > 0,05 p ₃₋₄ > 0,05
Lô TXCB	5,74 ± 0,49	22,30 ± 3,86	20,10 ± 3,21	16,31 ^b ± 3,33	p < 0,001*
p lô	0,777	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

Ghi chú: ^{b,c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) trong một cột.

*: p theo từng cặp trong cùng lô đều < 0,001.

Nhận xét:

- Khi so sánh giữa các lô: Ở thời điểm ban đầu, không có sự khác biệt giữa các lô về nồng độ glucose máu. Tại thời điểm 72 giờ sau khi gây ĐTĐ, chuột ở các lô mô hình, lô sildenafil và lô TXCB có nồng độ glucose tăng cao (p < 0,001) và đạt ngưỡng ĐTĐ (lớn hơn 16,7 mmol/L). Không có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05) khi so sánh giữa các lô: lô mô hình, lô sildenafil và lô TXCB.

Ở thời điểm sau 4 tuần uống thuốc, khi so sánh giữa các lô thấy nồng độ glucose máu ở các lô mô hình, lô sildenafil và lô TXCB vẫn cao hơn có ý nghĩa so với lô chứng (các giá trị p đều < 0,001). Ngoài ra, nồng độ glucose của lô TXCB là 20,10 ± 3,21 mmol/L, thấp hơn so với lô mô hình (21,78 ± 4,45 mmol/L) và sildenafil (22,33 ± 4,00 mmol/L), tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05).

Ở thời điểm sau 8 tuần uống thuốc, khi so sánh giữa các lô thì nồng độ glucose máu ở các lô mô hình, lô sildenafil và lô TXCB cũng vẫn cao hơn có ý nghĩa so với lô chứng (các giá trị p đều < 0,001). Tuy nhiên ở lô TXCB, nồng độ glucose máu là 16,31 ± 3,33 mmol/L thấp hơn đáng kể so với lô mô hình

($22,46 \pm 4,51$ mmol/L; $p = 0,046$) và lô sildenafil ($22,54 \pm 4,27$ mmol/L; $p = 0,034$).

- Khi so sánh giữa các thời điểm trong cùng một lô thấy: ở lô chứng không có sự thay đổi có ý nghĩa ($p > 0,05$) về nồng độ glucose máu trong suốt thời gian nghiên cứu.

Ở các lô mô hình và sildenafil, sau khi gây ĐTĐ, glucose máu tăng cao và sau đó thay đổi không có ý nghĩa ($p > 0,05$) trong thời gian uống thuốc.

Với lô TXCB, sau 4 tuần uống thuốc nồng độ glucose máu giảm có ý nghĩa so với thời điểm 72 giờ sau gây ĐTĐ ($p < 0,001$); sau 8 tuần uống thuốc, nồng độ glucose máu giảm rõ rệt so với thời điểm sau 4 tuần ($p < 0,001$) và thời điểm 72 giờ sau gây ĐTĐ ($p < 0,001$).

3.2.2.3. ICP nền

ICP nền được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.17. Giá trị ICP nền của các lô nghiên cứu ($n = 8$)

Lô	ICP nền (mmHg)	So sánh (tăng, giảm; %)			
		Lô chứng	Lô mô hình	Lô sildenafil	Lô TXCB
Lô chứng	$26,04^a \pm 5,81$	-	31,0	14,8	12,9
Lô mô hình	$19,88^b \pm 3,15$	-23,7	-	-12,4	-13,8
Lô sildenafil	$22,69^{ab} \pm 3,09$	-12,9	14,1	-	-1,6
Lô TXCB	$23,07^{ab} \pm 4,99$	-11,4	16,0	1,7	-
p lô	0,862	-			

Ghi chú: ^{a, b, c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong một cột.

Nhận xét:

Giá trị ICP nền của lô mô hình là $19,88 \pm 3,15$ mmHg thấp hơn đáng kể so với lô chứng ($26,04 \pm 5,81$ mmHg) với $p = 0,009$. Ở các lô sildenafil và lô TXCB, ICP nền có thấp hơn so với lô chứng (12,9% và 11,4%), tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$).

Ở lô sildenafil và lô TXCB, ICP nền cao hơn lô mô hình lần lượt là 14,1% và 16,0% tuy nhiên không sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$).

3.2.2.4. ICP cực đại

ICP cực đại (ICP max) được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.18. Giá trị ICP max của các lô nghiên cứu ($n = 8$)

Lô	ICP max (mmHg)	So sánh (tăng, giảm; %)			
		Lô chứng	Lô mô hình	Lô sildenafil	Lô TXCB
Lô chứng	75,95 ^b ± 11,28	-	46,8	-18,9	-7,6
Lô mô hình	51,74 ^c ± 11,01	-31,9	-	-44,8	-37,1
Lô sildenafil	93,67 ^a ± 12,32	23,3	81,0	-	13,9
Lô TXCB	82,23 ^{ab} ± 12,42	8,3	58,9	-12,2	-
p lô	< 0,001				

Ghi chú: ^{a, b, c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong một cột.

Nhận xét:

Ở lô mô hình, ICP max là 51,74 ± 11,01 mmHg thấp hơn có ý nghĩa so với lô chứng (75,95 ± 11,28 mmHg, với $p < 0,001$), lô sildenafil (93,67 ± 12,32 mmHg, với $p < 0,001$) và lô TXCB (82,23 ± 12,42 mmHg, với $p < 0,001$).

Ở lô sildenafil, ICP max cao hơn đáng kể so với lô chứng ($p = 0,005$) và lô mô hình ($p < 0,001$). Với lô TXCB, ICP max cao hơn có ý nghĩa so với lô mô hình ($p < 0,001$); ngoài ra còn cao hơn 8,3% so với lô chứng và thấp hơn 12,2% so với lô sildenafil tuy nhiên các sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.2.5. Diện tích dưới đường cong của ICP

Diện tích dưới đường cong của ICP (AUC) được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.19. Diện tích dưới đường cong của ICP (n = 8)

Lô	AUC (mmHg.s)	So sánh (tăng, giảm; %)			
		Lô chứng	Lô mô hình	Lô sildenafil	Lô TXCB
Lô chứng	2431,32 ± 808,73	-	95,5	-31,1	-12,6
Lô mô hình	1243,83 ^b ± 512,45	-48,8	-	-64,8	-55,3
Lô sildenafil	3530,08 ± 1376,35	45,2	183,8	-	26,8
Lô TXCB	2783,20 ± 366,96	14,5	123,8	-21,2	-
p lô	< 0,001				

Ghi chú: ^b: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong một cột.

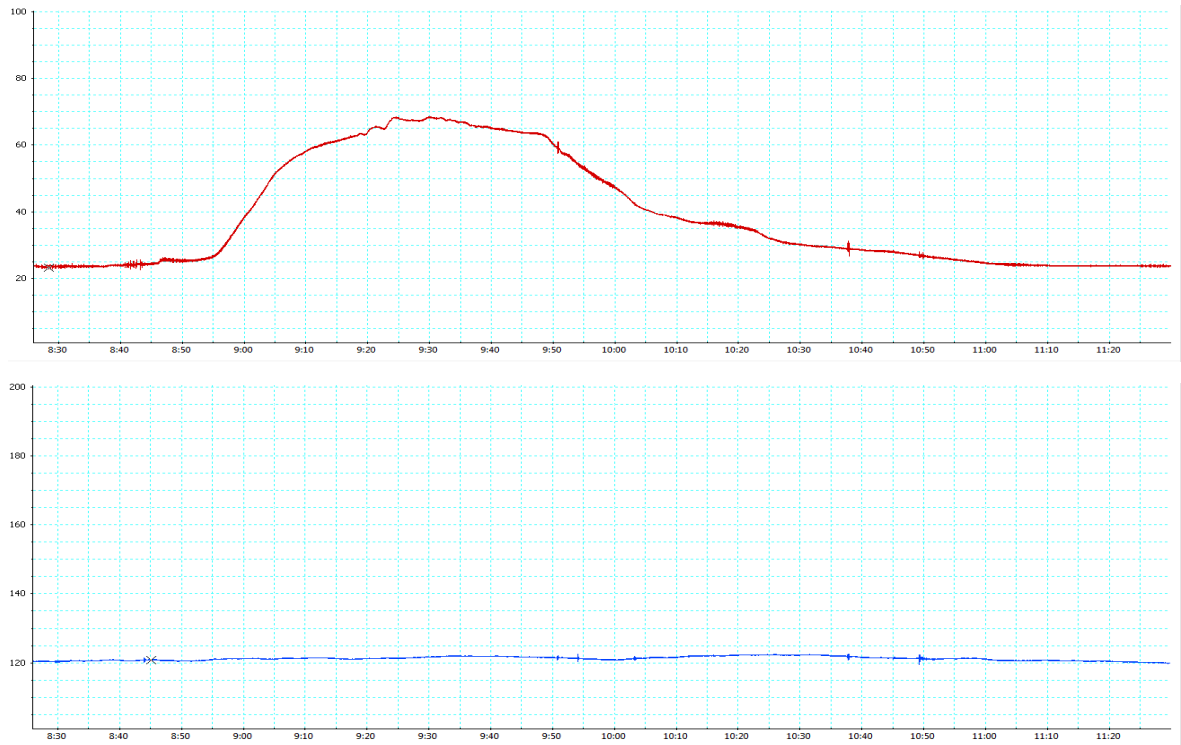
Nhận xét:

Qua bảng trên cho thấy:

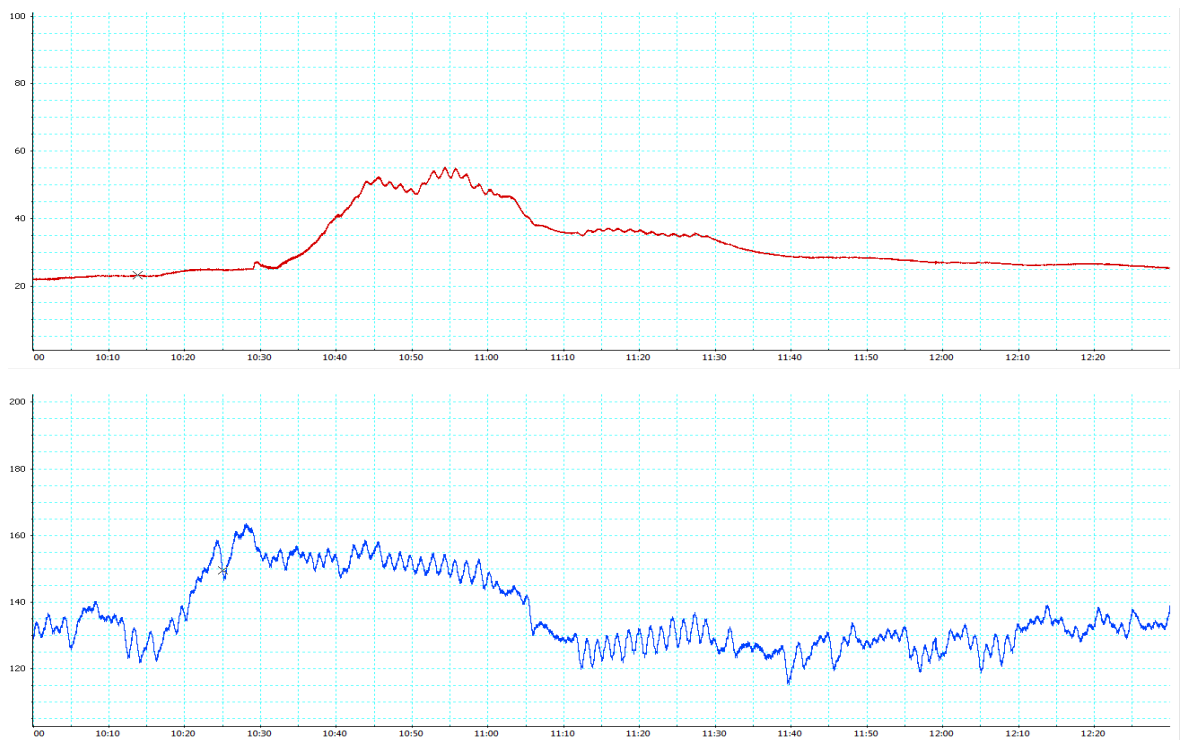
Ở lô mô hình, AUC là $1243,83 \pm 512,45$ mmHg.s thấp hơn đáng kể so với lô chứng ($2431,32 \pm 808,73$ mmHg.s; $p = 0,024$). Ở lô sildenafil, giá trị AUC là $3530,08 \pm 1376,35$ mmHg.s cao hơn đáng kể so với lô mô hình ($p = 0,010$). Khi so sánh với lô chứng thì AUC cao hơn 45,2% tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê ($p = 0,341$).

Ở lô TXCB, giá trị AUC là $2783,20 \pm 366,96$ mmHg.s cũng cao hơn có ý nghĩa so với lô mô hình ($p < 0,001$). Khi so sánh với lô chứng thì AUC cao hơn 14,5% và khi so sánh với lô sildenafil thì thấp hơn 21,2% tuy nhiên các sự khác nhau này không có ý nghĩa thống kê (p lần lượt là 0,827 và 0,616).

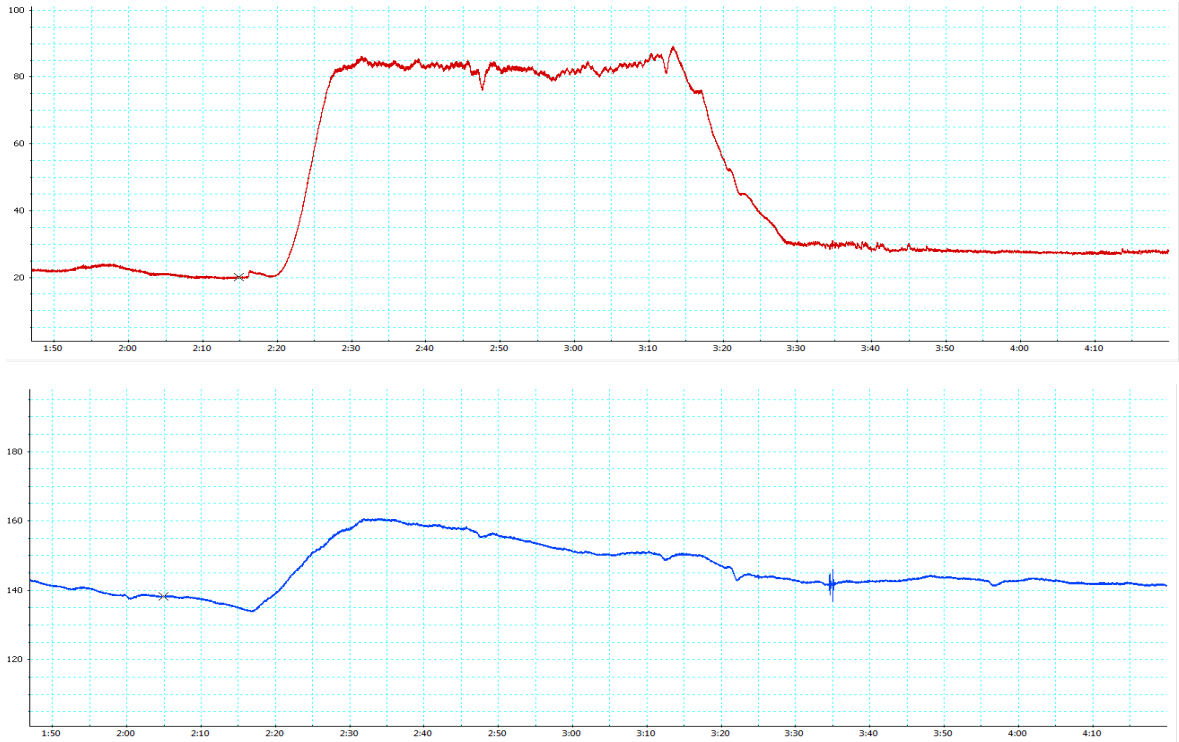
Đường cong ICP của các lô được trình bày trong các hình sau:



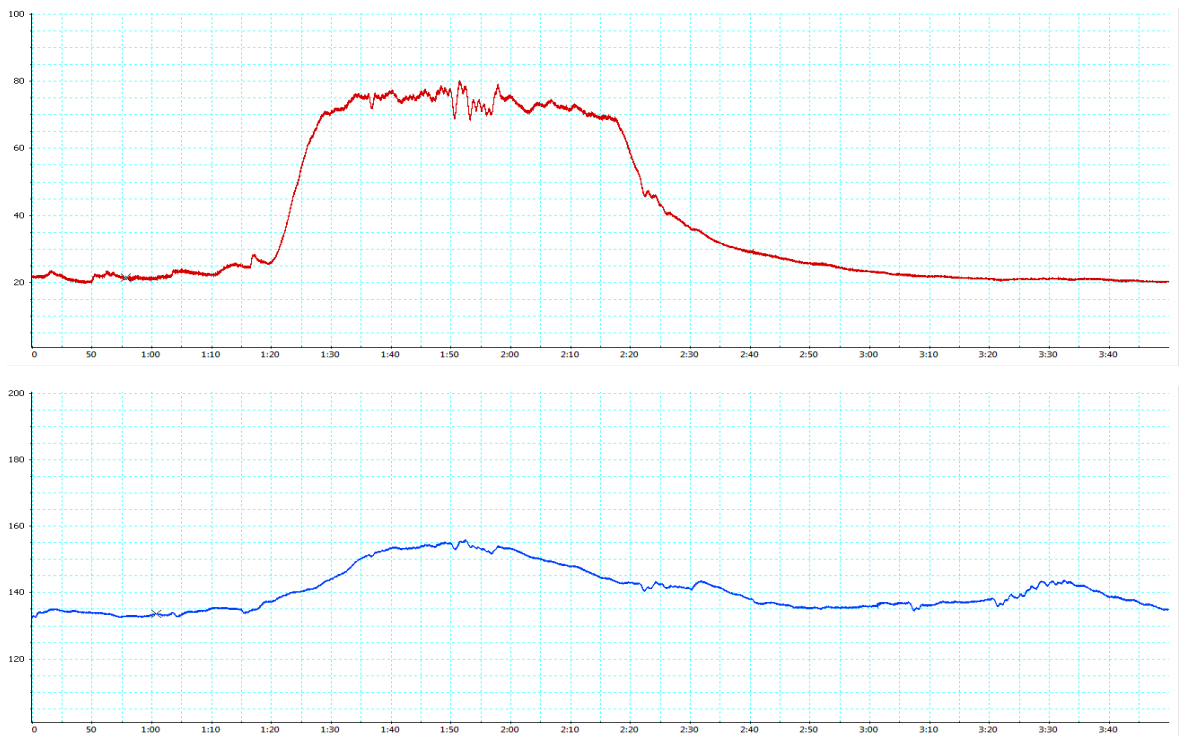
Hình 3.5. Đồ thị ICP (hình trên) và MAP (hình dưới)
của lô chứng (chuột số 04)



Hình 3.6. Đồ thị ICP (hình trên) và MAP (hình dưới)
của lô mô hình (chuột số 02)



Hình 3.7. Đồ thị ICP (hình trên) và MAP (hình dưới)
của lô sildenafil (chuột số 06)



Hình 3.8. Đồ thị ICP (hình trên) và MAP (hình dưới)
của lô TXCB (chuột số 06)

3.2.2.6. Huyết áp động mạch trung bình

Huyết áp động mạch trung bình (MAP) của các lô được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.20. Huyết áp động mạch trung bình chuột ở các lô (n = 8)

Lô	MAP (mmHg)	So sánh (tăng, giảm; %)			
		Lô chứng	Lô mô hình	Lô sildenafil	Lô TXCB
Lô chứng	121,61 ^b ± 13,15	-	-12,2	-14,7	-7,3
Lô mô hình	138,54 ^a ± 7,92	13,9	-	-2,8	5,6
Lô sildenafil	142,56 ^a ± 12,21	17,2	2,9	-	8,6
Lô TXCB	131,22 ^{ab} ± 10,99	7,9	-5,3	-7,9	-
p lô	0,005				

Ghi chú: ^{a, b}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) trong một cột.

Nhận xét:

Ở lô mô hình và lô sildenafil giá trị MAP lần lượt là 138,54 ± 7,92 mmHg và 142,56 ± 12,21 mmHg cao hơn đáng kể so với lô chứng (121,61 ± 13,15 mmHg) với p lần lượt là 0,005 và 0,001.

Ở lô dùng TXCB, MAP cũng cao hơn 7,9% so với lô chứng đồng thời thấp hơn 5,3% so với lô mô hình, thấp hơn 7,9% so với lô sildenafil tuy nhiên các sự khác nhau này không có ý nghĩa thống kê (p lần lượt là 0,098, 0,204 và 0,053).

Đồ thị MAP của các lô được thể hiện trong các hình 3.5 đến 3.8 trên.

3.2.2.7. Tỷ số ICP max và MAP

Tỷ số ICP max và MAP được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.21. Tỉ số ICP max và MAP của chuột ở các lô (n = 8)

Lô	ICP max/MAP	So sánh (tăng, giảm; %)			
		Lô chứng	Lô mô hình	Lô sildenafil	Lô TXCB
Lô chứng	0,63 ± 0,09	-	68,3	-4,7	-0,1
Lô mô hình	0,37 ^b ± 0,07	-40,6	-	-43,4	-40,7
Lô sildenafil	0,66 ± 0,09	5,0	76,7	-	4,9
Lô TXCB	0,63 ± 0,09	0,1	68,5	-4,7	-
p lô	< 0,001				

Ghi chú: ^b: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) trong một cột.

Nhận xét:

Tỉ số ICP max/MAP của lô mô hình là 0,37 ± 0,07 thấp hơn có ý nghĩa so với lô chứng (0,63 ± 0,09) với p < 0,001. Ở các lô sildenafil và TXCB, tỉ số ICP max/MAP lần lượt là 0,66 ± 0,09 và 0,63 ± 0,09 cao hơn có ý nghĩa so với lô mô hình với p đều < 0,001. Không có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05) về tỉ số ICP max/MAP giữa các lô: lô chứng, lô sildenafil và lô dùng TXCB.

3.2.2.8. Nồng độ testosterone trong huyết thanh

Nồng độ TES trong huyết thanh được trình bày trong bảng 3.22.

Bảng 3.22. Nồng độ testosterone trong huyết thanh chuột (n = 8)

Lô	Nồng độ TES (ng/mL)	So sánh (tăng, giảm; %)			
		Lô chứng	Lô mô hình	Lô sildenafil	Lô TXCB
Lô chứng	4,89 ^b ± 0,79	-	81,0	78,0	-29,1
Lô mô hình	2,70 ^c ± 0,91	-44,8	-	-1,7	-60,8
Lô sildenafil	2,75 ^c ± 1,24	-43,8	1,7	-	-60,2
Lô TXCB	6,89 ^a ± 1,65	41,0	155,3	151,0	-
p lô	< 0,001				

Ghi chú: ^{a, b, c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) trong một cột.

Nhận xét:

Qua bảng trên cho thấy: nồng độ TES huyết thanh ở lô mô hình ($2,70 \pm 0,91$ ng/mL) và lô sildenafil ($2,75 \pm 1,24$ ng/mL) thấp hơn có ý nghĩa so với lô chứng ($4,89 \pm 0,79$ ng/mL) với p đều là 0,001.

Nồng độ TES huyết thanh của lô TXCB ($6,89 \pm 1,65$ ng/mL) cao hơn đáng kể so với lô chứng ($p = 0,002$) đồng thời cũng cao hơn có ý nghĩa so với lô mô hình ($p < 0,001$) và lô sildenafil ($p < 0,001$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa về nồng độ TES huyết thanh giữa lô mô hình và lô sildenafil ($p = 0,939$).

3.2.3. Tác dụng trên mô hình thỏ gây suy giảm sinh sản bằng fluconazol

3.2.3.1. Trọng lượng cơ thể và thể trạng chung của thỏ

Trong suốt thời gian nghiên cứu, thỏ khỏe mạnh, ăn uống bình thường, không có bất kỳ dấu hiệu ngộ độc hay triệu chứng bất thường được ghi nhận. Trọng lượng thỏ (kg) ở các lô được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.23. Trọng lượng thỏ tại các thời điểm nghiên cứu (n = 8)

Lô	Ban đầu	Sau 30 ngày	Sau 60 ngày
Lô chứng	$2,48 \pm 0,17$	$2,68 \pm 0,13$	$2,76 \pm 0,12$
Lô mô hình	$2,59 \pm 0,19$	$2,78 \pm 0,17$	$2,86 \pm 0,12$
Lô trị 1	$2,56 \pm 0,14$	$2,76 \pm 0,12$	$2,83 \pm 0,13$
Lô trị 2	$2,51 \pm 0,18$	$2,69 \pm 0,15$	$2,78 \pm 0,10$
p lô	0,559	0,387	0,316

Ghi chú: lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

Thỏ ở các lô nghiên cứu tăng trọng lượng tương đương như nhau, không có sự khác biệt có ý nghĩa về trọng lượng thỏ giữa các lô ở cùng một thời điểm nghiên cứu ($p > 0,05$).

3.2.3.2. Thời gian tiếp cận

Thời gian tiếp cận của thỏ đực (giây) ở các lô trong quá trình nghiên cứu được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.24. Thời gian tiếp cận của thỏ đực (n = 8)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	11,63 ± 5,71	13,25 ± 6,50	13,75 ± 5,60	p ₁₋₂ = 0,569 p ₁₋₃ = 0,487 p ₂₋₃ = 0,874
Lô mô hình	11,13 ± 5,14	35,38 ^a ± 14,62	36,13 ^a ± 15,15	p₁₋₂ < 0,001 p₁₋₃ = 0,001 p ₂₋₃ = 0,784
Lô trị 1	13,50 ± 6,41	14,38 ± 8,18	15,88 ± 6,42	p ₁₋₂ = 0,514 p ₁₋₃ = 0,355 p ₂₋₃ = 0,649
Lô trị 2	13,38 ± 6,55	14,00 ± 3,96	8,75 ± 5,04	p ₁₋₂ = 0,844 p ₁₋₃ = 0,185 p ₂₋₃ = 0,075
p lô	0,806	< 0,001	< 0,001	

Ghi chú: ^a: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) trong một cột.

Lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

Qua kết quả trên cho thấy, khi so sánh giữa các lô: ở lô mô hình có sự tăng đáng kể thời gian phản ứng của thỏ đực sau 30 ngày và sau 60 ngày nghiên cứu khi so sánh với lô chứng và các lô trị (các giá trị p đều < 0,001).

Ở lô trị 2, tại thời điểm sau 60 ngày có sự giảm của thời gian phản ứng tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi so sánh với lô chứng và lô trị 1 (p > 0,05).

Không có sự khác nhau có ý nghĩa (p > 0,05) về thời gian phản ứng giữa lô trị 1 và lô chứng ở các thời điểm nghiên cứu.

3.2.3.3. Các chỉ số về số lượng và chất lượng tinh dịch

*** Thế tích tinh dịch:**

Thế tích tinh dịch được trình bày trong bảng 3.25.

Bảng 3.25. Thể tích tinh dịch thỏ tại các thời điểm (n = 8)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	0,69 ± 0,20	0,71 ± 0,18	0,70 ^b ± 0,17	p ₁₋₂ = 0,787 p ₁₋₃ = 0,950 p ₂₋₃ = 0,862
Lô mô hình	0,72 ± 0,20	0,46 ^b ± 0,14	0,50 ^c ± 0,13	p₁₋₂ = 0,008 p₁₋₃ = 0,006 p ₂₋₃ = 0,549
Lô trị 1	0,71 ± 0,19	0,64 ± 0,13	0,68 ^b ± 0,17	p ₁₋₂ = 0,270 p ₁₋₃ = 0,644 p ₂₋₃ = 0,442
Lô trị 2	0,71 ± 0,19	0,68 ± 0,15	0,88 ^a ± 0,20	p ₁₋₂ = 0,510 p ₁₋₃ = 0,148 p₂₋₃ = 0,030
p lô	0,995	0,012	0,001	

Ghi chú: ^{a, b, c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) trong một cột.

Lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

- Khi so sánh giữa các lô:

Tại thời điểm 30 ngày, ở lô mô hình thể tích tinh dịch là 0,46 ± 0,14 mL, thấp hơn đáng kể so với lô chứng (0,71 ± 0,18 mL; p = 0,002). Thể tích tinh dịch của hai lô dùng thuốc nghiên cứu lần lượt là 0,64 ± 0,13 mL và 0,68 ± 0,15 mL cao hơn đáng kể so với lô mô hình (p lần lượt là 0,027 và 0,009). Không có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05) khi so sánh giữa các lô: lô trị 1, lô trị 2 và lô chứng.

Ở thời điểm 60 ngày, thể tích tinh dịch của lô mô hình là 0,50 ± 0,13 mL vẫn thấp hơn có ý nghĩa so với lô chứng (0,70 ± 0,17 mL; p = 0,024). Thể tích tinh dịch của lô trị 1 và lô trị 2 lần lượt là 0,68 ± 0,17 mL và 0,88 ± 0,20 mL cao hơn có ý nghĩa so với lô mô hình (p lần lượt là 0,046 và < 0,001). Không có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05) về thể tích tinh dịch giữa lô trị 1 và lô chứng. Tuy nhiên, thể tích tinh dịch ở lô trị 2 cao hơn có ý nghĩa so với lô chứng và lô trị 1 (p lần lượt là 0,046 và 0,024).

- Khi so sánh giữa các thời điểm:

Ở lô chứng và lô trị 1, thể tích tinh dịch ở các thời điểm khác nhau không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Với lô mô hình, thể tích tinh dịch ở các thời điểm sau 30 ngày và sau 60 ngày giảm đáng kể so với thời điểm ban đầu (p lần lượt là 0,008 và 0,006).

Đối với lô trị 2, thể tích tinh dịch ở thời điểm 60 ngày tăng và cao hơn có ý nghĩa so với thời điểm 30 ngày ($p = 0,030$).

*** pH tinh dịch:**

pH tinh dịch của thỏ trong các lô tại các thời điểm nghiên cứu được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.26. pH tinh dịch thỏ tại các thời điểm nghiên cứu ($n = 8$)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	7,21 ± 0,16	7,29 ± 0,16	7,21 ± 0,16	$p_{1-2} = 0,351$ $p_{1-3} = 1,000$ $p_{2-3} = 0,451$
Lô mô hình	7,25 ± 0,16	7,33 ± 0,14	7,25 ± 0,16	$p_{1-2} = 0,351$ $p_{1-3} = 1,000$ $p_{2-3} = 0,351$
Lô trị 1	7,18 ± 0,14	7,25 ± 0,16	7,25 ± 0,16	$p_{1-2} = 0,170$ $p_{1-3} = 0,351$ $p_{2-3} = 1,000$
Lô trị 2	7,21 ± 0,16	7,21 ± 0,16	7,21 ± 0,16	$p_{1-2} = 1,000$ $p_{1-3} = 1,000$ $p_{2-3} = 1,000$
p lô	0,810	0,502	0,928	

Ghi chú: lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

Kết quả trên cho thấy, không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) về pH tinh dịch ở các lô tại cùng một thời điểm nghiên cứu và trong cùng một lô tại các thời điểm khác nhau.

*** Mật độ tinh trùng:**

Mật độ tinh trùng của thỏ (tinh trùng x 10⁶/mL) được trình bày trong bảng 3.27.

Bảng 3.27. Mật độ tinh trùng thỏ tại các thời điểm nghiên cứu (n = 8)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	220,75 ± 14,65	205,23 ^a ± 21,49	205,44 ± 36,83	p ₁₋₂ = 0,154 p ₁₋₃ = 0,381 p ₂₋₃ = 0,982
Lô mô hình	228,98 ± 11,39	157,99 ^{bc} ± 17,14	174,45 ^b ± 27,60	p₁₋₂ < 0,001 p₁₋₃ = 0,001 p ₂₋₃ = 0,249
Lô trị 1	225,36 ± 9,10	166,19 ^{ab} ± 31,62	206,63 ± 24,68	p₁₋₂ = 0,002 p ₁₋₃ = 0,051 p ₂₋₃ = 0,066
Lô trị 2	217,56 ± 15,74	185,13 ^{ab} ± 22,37	229,76 ± 9,00	p₁₋₂ = 0,014 p ₁₋₃ = 0,100 p₂₋₃ = 0,001
p lô	0,329	0,002	0,003	

Ghi chú: ^{a, b, c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) trong một cột.

Lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

- Khi so sánh giữa các lô:

Ở thời điểm ban đầu, không có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05) về mật độ tinh trùng giữa các lô nghiên cứu.

Ở thời điểm 30 ngày, mật độ tinh trùng của lô mô hình thấp hơn có ý nghĩa so với lô chứng (p = 0,002). Ở lô trị 1 và lô trị 2, mật độ tinh trùng cũng thấy thấp hơn so với lô chứng, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa (p > 0,05). Không có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05) về mật độ tinh trùng khi so sánh giữa các lô: lô mô hình, lô trị 1 và lô trị 2.

Tại thời điểm 60 ngày, mật độ tinh trùng thỏ ở lô mô hình vẫn thấp hơn đáng kể so với lô chứng (p = 0,027). Ở lô trị 1 và lô trị 2 mật độ tinh trùng cao hơn đáng kể so với lô mô hình (p lần lượt là 0,022 và < 0,001). Không có sự

khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) về mật độ tinh trùng giữa các lô: lô chứng, lô trị 1 và lô trị 2.

- Khi so sánh giữa các thời điểm:

Ở lô chứng, mật độ tinh trùng giữa các thời điểm khác nhau không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Ở lô mô hình, mật độ tinh trùng ở các thời điểm 30 ngày và 60 ngày đều thấp hơn có ý nghĩa so với thời điểm ban đầu (p lần lượt là $< 0,001$ và $0,001$).

Ở lô trị 1 và lô trị 2, tại thời điểm 30 ngày mật độ tinh trùng giảm đáng kể so với thời điểm ban đầu (p lần lượt là $0,002$ và $0,014$) tuy nhiên tại thời điểm 60 ngày ở lô trị 2 đã có sự phục hồi, cao hơn đáng kể so với ở thời điểm 30 ngày ($p = 0,001$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh giữa thời điểm 60 ngày với thời điểm ban đầu ($p > 0,05$).

*** Tổng số tinh trùng trong 1 lần xuất tinh:**

Tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh (tinh trùng $\times 10^6$) tại các thời điểm nghiên cứu được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.28. Tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh ($n = 8$)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	151,80 \pm 38,76	146,25 ^a \pm 42,32	144,38 ^{ab} \pm 47,59	$p_{1-2} = 0,665$ $p_{1-3} = 0,722$ $p_{2-3} = 0,897$
Lô mô hình	165,82 \pm 52,02	74,33 ^c \pm 28,66	85,09 ^d \pm 18,09	$p_{1-2} = 0,001$ $p_{1-3} = 0,002$ $p_{2-3} = 0,408$
Lô trị 1	159,95 \pm 44,96	104,92 ^{bc} \pm 26,88	137,61 ^{bc} \pm 27,62	$p_{1-2} = 0,006$ $p_{1-3} = 0,151$ $p_{2-3} = 0,002$
Lô trị 2	154,23 \pm 39,08	123,39 ^{ab} \pm 22,80	201,36 ^a \pm 48,18	$p_{1-2} = 0,093$ $p_{1-3} = 0,085$ $p_{2-3} = 0,001$
p lô	0,921	0,001	<0,001	

Ghi chú: ^{a, b, c, d}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong một cột.

Lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

- Khi so sánh giữa các lô: tại thời điểm ban đầu, không có sự khác biệt có ý nghĩa về tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh ($p > 0,05$).

Tại thời điểm 30 ngày: ở lô mô hình và lô trị 1, tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh thấp hơn đáng kể so với lô chứng (p lần lượt là $< 0,001$ và $0,013$). Ngoài ra, mật độ tinh trùng ở lô trị 2 cao hơn đáng kể so với lô mô hình ($p = 0,004$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) khi so sánh giữa lô trị 1 và lô mô hình; giữa lô trị 1 và lô trị 2; giữa lô trị 2 và lô chứng.

Tại thời điểm 60 ngày: ở lô mô hình, tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh vẫn thấp hơn đáng kể so với lô chứng ($p = 0,048$). Ở lô trị 1, tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh cao hơn đáng kể so với lô mô hình ($p = 0,004$) và khác biệt không có ý nghĩa so với lô chứng ($p > 0,05$). Ở lô trị 2, tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh cao hơn có ý nghĩa so với lô mô hình ($p = 0,001$) và lô trị 1 ($p = 0,041$), đồng thời không có sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh với lô chứng ($p > 0,05$).

- Khi so sánh giữa các thời điểm, ở lô mô hình có sự giảm đáng kể tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh tại thời điểm 30 ngày và 60 ngày khi so sánh với thời điểm ban đầu (p lần lượt là $0,001$ và $0,002$).

Ở lô trị 1, tại thời điểm 30 ngày có sự giảm đáng kể so với thời điểm ban đầu ($p = 0,006$) tuy nhiên chỉ số này được phục hồi tại thời điểm 60 ngày.

Ở lô trị 2, tại thời điểm 30 ngày tuy có sự giảm về tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh so với thời điểm ban đầu tuy nhiên sự giảm này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tại thời điểm 60 ngày, có sự tăng đáng kể so với thời điểm 30 ngày ($p = 0,001$).

*** Tỉ lệ tinh trùng di động:**

Tỉ lệ tinh trùng di động (%) tại các thời điểm nghiên cứu được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.29. Tỷ lệ tinh trùng di động tại các thời điểm (n = 8)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	30,00 ± 11,03	32,75 ^{bc} ± 5,95	33,75 ± 9,05	p ₁₋₂ = 0,635 p ₁₋₃ = 0,561 p ₂₋₃ = 0,803
Lô mô hình	33,13 ± 12,19	28,38 ^c ± 10,39	22,25 ^b ± 9,54	p ₁₋₂ = 0,399 p ₁₋₃ = 0,066 p ₂₋₃ = 0,290
Lô trị 1	29,13 ± 7,43	38,25 ^{ab} ± 8,10	34,75 ± 6,11	p ₁₋₂ = 0,068 p ₁₋₃ = 0,077 p ₂₋₃ = 0,478
Lô trị 2	29,50 ± 7,21	42,13 ^a ± 6,69	39,13 ± 7,24	p₁₋₂ = 0,003 p ₁₋₃ = 0,055 p ₂₋₃ = 0,388
p lô	0,837	0,010	0,002	

Ghi chú: ^{a, b, c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) trong một cột.

Lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

- Khi so sánh giữa các lô: ở thời điểm ban đầu, không có sự khác biệt có ý nghĩa về tỷ lệ tinh trùng di động giữa các lô nghiên cứu.

Tại thời điểm 30 ngày, tỷ lệ tinh trùng di động ở lô trị 1 cao hơn đáng kể so với lô mô hình (p = 0,019); ở lô trị 2 cao hơn đáng kể so với lô chứng (p = 0,026) và lô mô hình (p = 0,002). Ngoài ra không có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05) khi so sánh giữa lô mô hình với lô chứng; lô trị 1 với lô chứng và giữa lô trị 1 và lô trị 2.

Tại thời điểm 60 ngày: ở lô mô hình, tỷ lệ tinh trùng di động thấp hơn đáng kể so với lô chứng (p = 0,008), lô trị 1 (p = 0,005) và lô trị 2 (p < 0,001). Không có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05) giữa các lô chứng, trị 1 và trị 2.

- Ngoài ra, khi so sánh giữa các thời điểm, ở lô trị 2 có sự tăng đáng kể tỷ lệ tinh trùng di động tại thời điểm 30 ngày so với thời điểm ban đầu (p = 0,003).

*** Tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới:**

Tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới (%) được trình bày trong bảng 3.30.

Bảng 3.30. Tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới (n = 8)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	27,13 ± 10,55	29,75 ^{bc} ± 5,34	30,63 ± 8,63	p ₁₋₂ = 0,633 p ₁₋₃ = 0,570 p ₂₋₃ = 0,810
Lô mô hình	29,75 ± 12,29	25,50 ^c ± 10,16	19,63 ^b ± 8,72	p ₁₋₂ = 0,448 p ₁₋₃ = 0,079 p ₂₋₃ = 0,278
Lô trị 1	26,25 ± 6,94	34,75 ^{ab} ± 7,50	31,50 ± 5,83	p ₁₋₂ = 0,068 p ₁₋₃ = 0,079 p ₂₋₃ = 0,482
Lô trị 2	26,75 ± 7,21	38,50 ^a ± 6,21	35,88 ± 6,38	p₁₋₂ = 0,003 p ₁₋₃ = 0,053 p ₂₋₃ = 0,407
p lô	0,885	0,010	0,001	

Ghi chú: ^{a, b, c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) trong một cột.

Lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

- Khi so sánh giữa các lô:

Tại thời điểm ban đầu, không có sự khác biệt có ý nghĩa về tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới giữa các lô (p > 0,05).

Tại thời điểm 30 ngày: Ở lô trị 1 và lô trị 2, tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới cao hơn đáng kể so với lô mô hình (p lần lượt là 0,020 và 0,002); ngoài ra ở lô trị 2 tỷ lệ này còn cao hơn đáng kể so với lô chứng (p = 0,027). Không có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05) khi so sánh giữa lô mô hình với lô chứng, lô trị 1 với lô chứng và lô trị 1 với lô trị 2.

Tại thời điểm 60 ngày: ở lô mô hình, tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới thấp hơn đáng kể so với lô chứng (p = 0,007), lô trị 1 (p = 0,004) và lô trị 2 (p < 0,001). Không có sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh giữa các lô: lô chứng, lô trị 1 và lô trị 2.

- Ngoài ra, khi so sánh giữa các thời điểm, ở lô trị 2 có sự tăng đáng kể tỉ lệ tinh trùng di động tiến tới tại thời điểm 30 ngày khi so sánh với thời điểm ban đầu ($p = 0,003$).

*** Tỉ lệ tinh trùng di động không tiến tới:**

Tỉ lệ tinh trùng di động không tiến tới (%) tại các thời điểm nghiên cứu được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.31. Tỉ lệ tinh trùng di động không tiến tới ($n = 8$)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	$2,88 \pm 0,83$	$3,00 \pm 0,76$	$3,13 \pm 0,64$	$p_{1-2} = 0,763$ $p_{1-3} = 0,563$ $p_{2-3} = 0,785$
Lô mô hình	$3,38 \pm 0,52$	$2,88 \pm 0,64$	$2,63 \pm 0,92$	$p_{1-2} = 0,227$ $p_{1-3} = 0,048$ $p_{2-3} = 0,563$
Lô trị 1	$2,88 \pm 0,64$	$3,50 \pm 0,93$	$3,25 \pm 0,46$	$p_{1-2} = 0,180$ $p_{1-3} = 0,080$ $p_{2-3} = 0,598$
Lô trị 2	$2,75 \pm 0,46$	$3,63 \pm 0,74$	$3,25 \pm 0,89$	$p_{1-2} = 0,021$ $p_{1-3} = 0,170$ $p_{2-3} = 0,285$
p lô	0,224	0,168	0,307	

Ghi chú: lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

- Khi so sánh giữa các lô:

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ tinh trùng di động không tiến tới tại cùng một thời điểm nghiên cứu.

- Khi so sánh giữa các thời điểm:

Ở lô mô hình, có sự giảm đáng kể tỉ lệ tinh trùng di động không tiến tới tại thời điểm 60 ngày so với thời điểm ban đầu (với $p = 0,048$).

Ở lô trị 2, có sự tăng đáng kể tỉ lệ tinh trùng di động không tiến tới tại thời điểm 30 ngày so với thời điểm ban đầu ($p = 0,021$).

*** Tỷ lệ tinh trùng không di động:**

Tỷ lệ tinh trùng không di động (%) được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.32. Tỷ lệ tinh trùng không di động (n = 8)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	70,00 ± 11,03	67,25 ^{ab} ± 5,95	66,25 ± 9,05	p ₁₋₂ = 0,635 p ₁₋₃ = 0,561 p ₂₋₃ = 0,803
Lô mô hình	66,88 ± 12,19	71,63 ^a ± 10,39	77,75 ^a ± 9,54	p ₁₋₂ = 0,399 p ₁₋₃ = 0,066 p ₂₋₃ = 0,290
Lô trị 1	70,88 ± 7,43	61,75 ^{bc} ± 8,10	65,25 ± 6,11	p ₁₋₂ = 0,068 p ₁₋₃ = 0,077 p ₂₋₃ = 0,478
Lô trị 2	70,50 ± 7,21	57,88 ^c ± 6,69	60,88 ± 7,24	p₁₋₂ = 0,003 p ₁₋₃ = 0,055 p ₂₋₃ = 0,388
p lô	0,837	0,010	0,002	

Ghi chú: ^{a, b, c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) trong một cột.

Lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

- Khi so sánh giữa các lô: tại thời điểm ban đầu, không có sự khác biệt có ý nghĩa về tỷ lệ tinh trùng không di động.

Tại thời điểm 30 ngày: Ở lô trị 1 và lô trị 2, tỷ lệ tinh trùng không di động thấp hơn đáng kể so với lô mô hình (p lần lượt là 0,019 và 0,002); đồng thời ở lô trị 2 tỷ lệ này cũng thấp hơn đáng kể so với lô chứng (p = 0,026). Không có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05) khi so sánh giữa lô mô hình với lô chứng; giữa lô trị 1 với lô chứng và giữa lô trị 1 với lô trị 2.

Tại thời điểm 60 ngày: ở lô mô hình, tỷ lệ tinh trùng không di động cao hơn có ý nghĩa so với lô chứng (p = 0,008), lô trị 1 (p = 0,005) và lô trị 2 (p < 0,001). Không có sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh giữa các lô: lô chứng, lô trị 1 và lô trị 2.

- Hơn nữa, khi so sánh giữa các thời điểm trong cùng một lô thấy: ở lô trị 2, tại thời điểm 30 ngày có sự giảm đáng kể tỉ lệ tinh trùng không di động so với thời điểm ban đầu ($p = 0,003$).

*** Tỉ lệ tinh trùng chết:**

Tỉ lệ tinh trùng chết (%) được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.33. Tỉ lệ tinh trùng chết tại các thời điểm ($n = 8$)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	27,63 ± 6,91	26,94 ± 5,80	27,50 ^b ± 9,26	$p_{1-2} = 0,825$ $p_{1-3} = 0,981$ $p_{2-3} = 0,857$
Lô mô hình	26,09 ± 6,44	36,50 ^a ± 8,53	39,84 ^a ± 9,47	$p_{1-2} = 0,016$ $p_{1-3} = 0,005$ $p_{2-3} = 0,479$
Lô trị 1	26,28 ± 7,84	23,88 ± 6,63	23,50 ^{bc} ± 6,92	$p_{1-2} = 0,540$ $p_{1-3} = 0,499$ $p_{2-3} = 0,922$
Lô trị 2	27,84 ± 7,60	20,66 ± 6,32	18,56 ^c ± 3,54	$p_{1-2} = 0,009$ $p_{1-3} = 0,023$ $p_{2-3} = 0,489$
p lô	0,945	0,001	<0,001	

Ghi chú: ^{a, b, c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong một cột.

Lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

- Khi so sánh giữa các lô: Tại thời điểm ban đầu, không có sự khác biệt có ý nghĩa về tỉ lệ tinh trùng chết ($p > 0,05$).

Tại thời điểm 30 ngày: ở lô mô hình, tỉ lệ tinh trùng chết cao hơn có ý nghĩa khi so sánh với lô chứng ($p = 0,010$), lô trị 1 ($p = 0,001$) và lô trị 2 ($p < 0,001$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) khi so sánh giữa các lô: lô chứng, lô trị 1 và lô trị 2.

Tại thời điểm 60 ngày: ở lô mô hình, tỉ lệ tinh trùng chết cao hơn đáng kể so với lô chứng ($p = 0,003$). Ở lô trị 1 và lô trị 2, tỉ lệ tinh trùng chết thấp hơn đáng kể so với lô mô hình (p đều $< 0,001$); đồng thời tỉ lệ này ở lô trị 2 cũng thấp hơn đáng kể so với lô chứng ($p = 0,027$). Không có sự khác

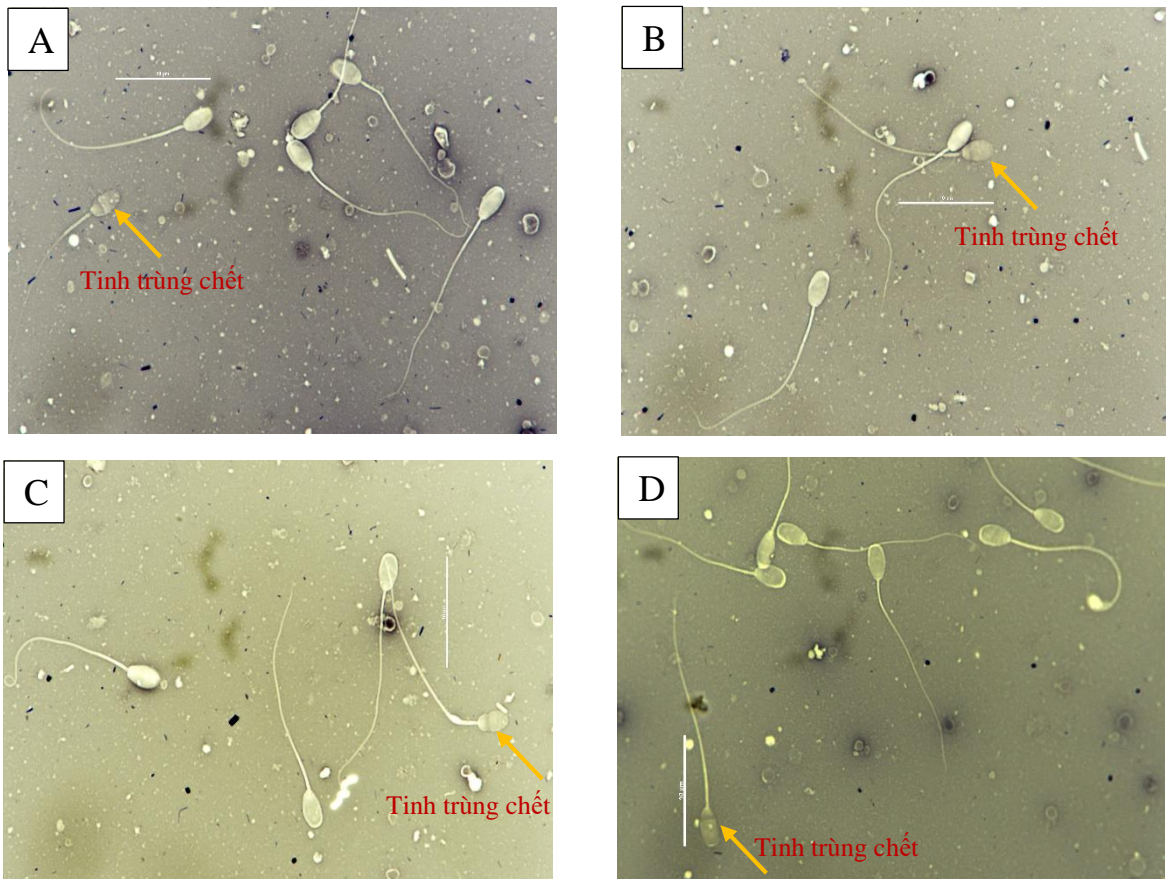
biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) khi so sánh giữa lô trị 1 với lô chứng và giữa lô trị 1 với lô trị 2.

- Ngoài ra, khi so sánh giữa các thời điểm trong cùng một lô thấy:

Ở lô mô hình, tại thời điểm 30 ngày và 60 ngày, tỉ lệ tinh trùng chết tăng rõ rệt so với thời điểm ban đầu với p lần lượt là 0,016 và 0,005.

Ở lô trị 2, tỉ lệ tinh trùng chết tại các thời điểm 30 ngày và 60 ngày lại có sự giảm rõ rệt so với thời điểm ban đầu, với p lần lượt là 0,009 và 0,023. Không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) về tỉ lệ tinh trùng chết ở lô trị 1 khi so sánh giữa các thời điểm nghiên cứu.

Một số hình ảnh tiêu bản đánh giá sự sống- chết của tinh trùng:



Hình 3.9. Hình ảnh nhuộm đánh giá sự sống- chết của tinh trùng (nhuộm eosin- nigrosin, 100X)

Ghi chú: A: lô chứng; B: lô mô hình; C: lô trị 1 (uống TXCB 180 mg/kg);

D: lô trị 2 (uống TXCB 360 mg/kg).

*** Tỷ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường:**

Tỷ lệ tinh trùng có hình thái bất thường (%) của các lô nghiên cứu được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.34. Tỷ lệ tinh trùng có hình thái bất thường (n = 8)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	16,41 ± 3,46	16,34 ± 3,91	17,28 ± 5,72	p ₁₋₂ = 0,973 p ₁₋₃ = 0,745 p ₂₋₃ = 0,370
Lô mô hình	16,88 ± 4,55	26,44 ^a ± 5,28	25,59 ^a ± 7,47	p₁₋₂ = 0,003 p₁₋₃ = 0,004 p ₂₋₃ = 0,749
Lô trị 1	17,75 ± 5,91	20,06 ± 6,37	17,66 ± 4,53	p ₁₋₂ = 0,390 p ₁₋₃ = 0,970 p ₂₋₃ = 0,126
Lô trị 2	17,13 ± 5,88	18,53 ± 4,27	14,13 ± 4,19	p ₁₋₂ = 0,259 p ₁₋₃ = 0,240 p ₂₋₃ = 0,059
p lô	0,960	0,003	0,003	

Ghi chú: ^a: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) trong một cột.

Lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

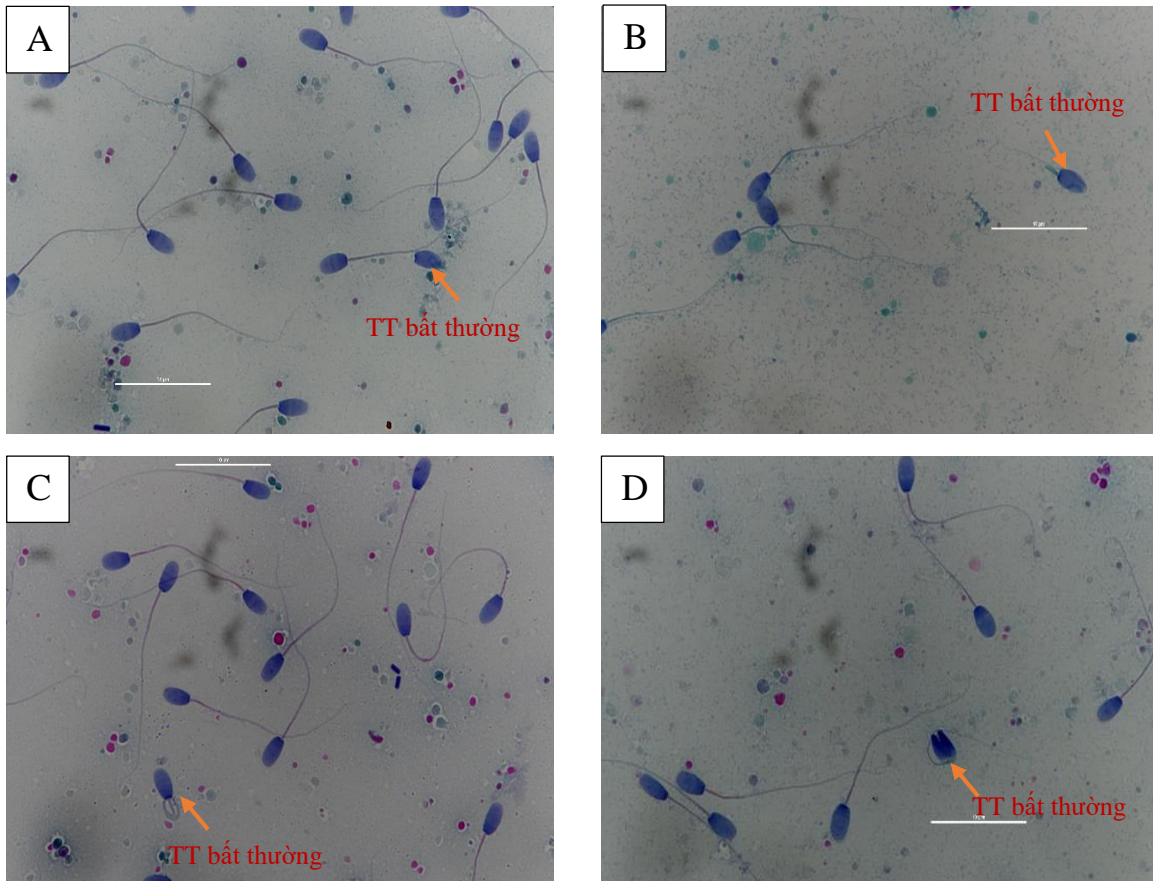
- Khi so sánh giữa các lô: tại thời điểm ban đầu, không có sự khác biệt có ý nghĩa về tỷ lệ tinh trùng có hình thái bất thường (p > 0,05).

Tại thời điểm 30 ngày: ở lô mô hình, tỷ lệ tinh trùng bất thường cao hơn đáng kể so với lô chứng (p < 0,001). Ở lô trị 1 và trị 2, tỷ lệ này thấp hơn đáng kể so với lô mô hình (p lần lượt là 0,018 và 0,004). Không có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05) khi so sánh giữa các lô: lô chứng, lô trị 1 và lô trị 2.

Tại thời điểm 60 ngày: ở lô mô hình, tỷ lệ tinh trùng có hình thái bất thường vẫn cao hơn đáng kể so với lô chứng (p = 0,006), ngoài ra còn cao hơn lô trị 1 (p = 0,009) và lô trị 2 (p < 0,001). Không có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05) khi so sánh giữa các lô chứng, trị 1 và trị 2.

- Hơn nữa khi so sánh giữa các thời điểm trong cùng một lô thì tại lô mô hình, có sự tăng đáng kể tỉ lệ tinh trùng có hình thái bất thường ở thời điểm 30 ngày và 60 ngày so với thời điểm ban đầu, với p lần lượt là 0,003 và 0,004.

Một số hình ảnh tiêu bản đánh giá hình thái của tinh trùng:



Hình 3.10. Hình ảnh nhuộm đánh giá hình thái tinh trùng
(nhuộm Papanicolaou, 100X)

Ghi chú: A: lô chứng; B: lô mô hình; C: lô trị 1 (uống TXCB 180 mg/kg);
D: lô trị 2 (uống TXCB 360 mg/kg).

3.2.3.4. Nồng độ testosterone trong huyết thanh

Nồng độ TES huyết thanh (ng/mL) tại các thời điểm nghiên cứu được trình bày trong bảng 3.35.

Bảng 3.35. Nồng độ testosterone huyết thanh thỏ (n = 8)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	2,528 ± 0,651	2,794 ^a ± 0,693	2,618 ^b ± 0,585	p ₁₋₂ = 0,502 p ₁₋₃ = 0,776 p ₂₋₃ = 0,263
Lô mô hình	2,516 ± 0,433	1,349 ^c ± 0,326	1,749 ^c ± 0,407	p₁₋₂ = 0,002 p₁₋₃ = 0,020 p₂₋₃ = 0,002
Lô trị 1	2,562 ± 0,635	2,080 ^b ± 0,462	4,427 ^{ab} ± 1,541	p₁₋₂ = 0,015 p₁₋₃ = 0,006 p₂₋₃ = 0,003
Lô trị 2	2,354 ± 0,870	2,386 ^{ab} ± 0,681	5,520 ^a ± 1,762	p ₁₋₂ = 0,938 p₁₋₃ = 0,003 p₂₋₃ = 0,001
p lô	0,926	< 0,001	< 0,001	

Ghi chú: ^{a, b, c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) trong một cột.

Lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

- Khi so sánh giữa các lô: Tại thời điểm ban đầu, không có sự khác biệt có ý nghĩa về nồng độ TES trong huyết thanh (p > 0,05).

Tại thời điểm 30 ngày: ở lô mô hình, nồng độ TES huyết thanh thấp hơn có ý nghĩa khi so sánh với lô chứng (p < 0,001), lô trị 1 và lô trị 2. Ở lô trị 1, nồng độ TES huyết thanh cũng thấp hơn có ý nghĩa so với lô chứng (p = 0,017) tuy nhiên cao hơn đáng kể so với lô mô hình (p = 0,015). Ở lô trị 2, nồng độ TES huyết thanh cao hơn đáng kể so với lô mô hình (p = 0,001) tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh với lô chứng và lô trị 1 (p > 0,05).

Tại thời điểm 60 ngày: ở lô mô hình, nồng độ TES huyết thanh vẫn thấp hơn đáng kể so với lô chứng (p = 0,025), lô trị 1 và lô trị 2. Ở lô trị 1, nồng độ TES huyết thanh cao hơn đáng kể so với lô mô hình (p = 0,008), ngoài ra không có sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh với lô chứng (p > 0,05). Ở lô trị 2, nồng độ TES huyết thanh cao hơn có ý nghĩa so với lô chứng (p = 0,010) và lô mô hình (p = 0,002); so với lô trị 1, sự khác biệt không có ý nghĩa (p > 0,05).

- Ngoài ra khi so sánh giữa các thời điểm trong cùng một lô:

Ở lô mô hình, tại thời điểm 30 ngày nồng độ TES huyết thanh giảm đáng kể so với thời điểm ban đầu ($p = 0,002$). Tại thời điểm 60 ngày, nồng độ TES huyết thanh vẫn giảm đáng kể khi so với thời điểm ban đầu ($p = 0,020$) tuy nhiên khi so với thời điểm 30 ngày lại có sự tăng đáng kể ($p = 0,002$).

Ở lô trị 1, tại thời điểm 30 ngày nồng độ TES huyết thanh cũng giảm đáng kể so với thời điểm ban đầu ($p = 0,015$). Tuy nhiên, tại thời điểm 60 ngày, nồng độ TES huyết thanh lại tăng đáng kể so với thời điểm 30 ngày ($p = 0,003$) đồng thời tăng cao hơn so với thời điểm ban đầu ($p = 0,006$).

Ở lô trị 2: tại thời điểm 30 ngày, không có sự khác biệt có ý nghĩa về nồng độ TES huyết thanh so với thời điểm ban đầu ($p > 0,05$). Tại thời điểm 60 ngày, có sự tăng đáng kể so với thời điểm ban đầu ($p = 0,003$) và thời điểm 30 ngày ($p = 0,001$).

3.2.3.5. Nồng độ MDA huyết thanh

Nồng độ MDA huyết thanh thỏ (nmol/L) được trình bày trong bảng 3.36.

Bảng 3.36. Nồng độ MDA trong huyết thanh thỏ ($n = 8$)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	12,87 ± 1,11	11,70 ^b ± 0,78	12,02 ^a ± 0,75	$p_{1-2} = 0,065$ $p_{1-3} = 0,061$ $p_{2-3} = 0,537$
Lô mô hình	12,67 ± 1,10	14,25 ^a ± 1,35	12,70 ^a ± 0,92	$p_{1-2} = 0,020$ $p_{1-3} = 0,969$ $p_{2-3} = 0,022$
Lô trị 1	12,71 ± 1,08	10,31 ^c ± 1,14	8,49 ^b ± 0,66	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,003$
Lô trị 2	12,80 ± 1,04	10,15 ^c ± 1,11	6,42 ^c ± 1,30	$p_{1-2} = 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,001$
p lô	0,981	< 0,001	< 0,001	

Ghi chú: ^{a, b, c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong một cột.

Lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

- Khi so sánh giữa các lô: tại thời điểm ban đầu, không có sự khác biệt có ý nghĩa về nồng độ MDA huyết thanh ($p > 0,05$).

Tại thời điểm 30 ngày: ở lô mô hình, nồng độ MDA huyết thanh cao hơn đáng kể so với lô chứng ($p < 0,001$), lô trị 1 và lô trị 2. Ở lô trị 1, nồng độ MDA huyết thanh thấp hơn đáng kể so với lô mô hình ($p < 0,001$) và lô chứng ($p = 0,019$). Ở lô trị 2, nồng độ MDA huyết thanh cũng thấp hơn có ý nghĩa so với lô mô hình ($p < 0,001$) và lô chứng ($p = 0,009$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh giữa lô trị 1 và trị 2.

Tại thời điểm 60 ngày: ở lô mô hình, nồng độ MDA huyết thanh cao hơn đáng kể so với lô trị 1 và lô trị 2; không có sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh với lô chứng. Ở lô trị 1, nồng độ MDA huyết thanh thấp hơn có ý nghĩa so với lô chứng ($p < 0,001$) và lô mô hình ($p < 0,001$) tuy nhiên cao hơn có ý nghĩa so với lô trị 2. Ở lô trị 2, nồng độ MDA huyết thanh thấp hơn có ý nghĩa so với lô chứng ($p < 0,001$), lô mô hình ($p < 0,001$) và lô trị 1 ($p < 0,001$).

- Ngoài ra, khi so sánh giữa các thời điểm trong cùng lô thấy: ở lô mô hình, tại thời điểm 30 ngày nồng độ MDA huyết thanh tăng đáng kể so với thời điểm ban đầu ($p = 0,020$). Tại thời điểm 60 ngày, nồng độ MDA huyết thanh đã giảm có ý nghĩa so với thời điểm 30 ngày ($p = 0,022$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa thời điểm 60 ngày và thời điểm ban đầu.

Ở lô trị 1: thời điểm 30 ngày, nồng độ MDA giảm đáng kể so với thời điểm ban đầu ($p < 0,001$). Tại thời điểm 60 ngày, nồng độ MDA huyết thanh tiếp tục giảm có ý nghĩa so với thời điểm 30 ngày ($p = 0,003$). Khi so sánh với thời điểm ban đầu, nồng độ MDA huyết thanh đã giảm 33,2% ($p < 0,001$).

Lô trị 2: thời điểm 30 ngày, nồng độ MDA huyết thanh cũng giảm đáng kể so với ban đầu ($p = 0,001$). Tại thời điểm 60 ngày, nồng độ MDA huyết thanh tiếp tục giảm có ý nghĩa so với thời điểm 30 ngày ($p = 0,001$). Khi so sánh với thời điểm ban đầu, nồng độ MDA huyết thanh giảm 49,8% ($p < 0,001$).

3.2.3.6. Nồng độ MDA trong tinh dịch

Nồng độ MDA trong tinh dịch thỏ (nmol/L) được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.37. Nồng độ MDA trong tinh dịch thỏ (n = 8)

Lô	Ban đầu (1)	Sau 30 ngày (2)	Sau 60 ngày (3)	p thời điểm
Lô chứng	9,98 ± 1,78	10,23 ^b ± 2,46	9,88 ^b ± 2,01	p ₁₋₂ = 0,861 p ₁₋₃ = 0,823 p ₂₋₃ = 0,796
Lô mô hình	10,03 ± 2,25	14,46 ^a ± 3,92	13,69 ^a ± 1,28	p ₁₋₂ = 0,051 p₁₋₃ = 0,006 p ₂₋₃ = 0,552
Lô trị 1	10,57 ± 1,28	7,11 ^c ± 1,53	5,96 ^c ± 2,21	p₁₋₂ = 0,002 p₁₋₃ = 0,002 p ₂₋₃ = 0,218
Lô trị 2	11,13 ± 1,91	5,32 ^c ± 1,70	5,39 ^c ± 1,05	p₁₋₂ < 0,001 p₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,910
p lô	0,568	< 0,001	< 0,001	

Ghi chú: ^{a, b, c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) trong một cột.

Lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét:

- Khi so sánh giữa các lô: tại thời điểm ban đầu, không có sự khác biệt có ý nghĩa về nồng độ MDA trong tinh dịch. Tại thời điểm 30 ngày: ở lô mô hình, nồng độ MDA trong tinh dịch cao hơn đáng kể so với lô chứng (p = 0,003), lô trị 1 và lô trị 2. Ở lô trị 1, nồng độ MDA trong tinh dịch thấp hơn đáng kể so với lô chứng (p = 0,022) và lô mô hình (p < 0,001). Ở lô trị 2, nồng độ MDA trong tinh dịch cũng thấp hơn đáng kể so với lô chứng (p = 0,001) và lô mô hình (p < 0,001). Không có sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh lô trị 1 và lô trị 2.

Tại thời điểm 60 ngày: ở lô mô hình, nồng độ MDA trong tinh dịch vẫn cao hơn đáng kể so với lô chứng (p < 0,001), lô trị 1 và lô trị 2. Ở lô trị 1 và lô trị 2, nồng độ MDA tinh dịch đều thấp hơn đáng kể so với lô chứng (p đều <

0,001) và lô mô hình (p đều $< 0,001$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh giữa lô trị 1 và lô trị 2.

- Ngoài ra, khi so sánh giữa các thời điểm trong cùng lô thấy: ở lô mô hình, tại thời điểm 30 ngày có sự tăng của nồng độ MDA tinh dịch tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê. Tại thời điểm 60 ngày, thấy có sự tăng đáng kể của nồng độ MDA tinh dịch so với thời điểm ban đầu ($p = 0,006$).

Ở lô trị 1: tại thời điểm 30 ngày, nồng độ MDA tinh dịch giảm đáng kể so với thời điểm ban đầu ($p = 0,002$). Tại thời điểm 60 ngày, nồng độ MDA tiếp tục giảm so với thời điểm 30 ngày tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê. Nhưng so với thời điểm ban đầu, nồng độ MDA tinh dịch vẫn giảm có ý nghĩa ($p = 0,002$). Ở lô trị 2: tại thời điểm 30 ngày, nồng độ MDA tinh dịch giảm rõ rệt so với thời điểm ban đầu ($p < 0,001$). Tại thời điểm 60 ngày, nồng độ MDA tinh dịch vẫn thấp hơn đáng kể so với thời điểm ban đầu ($p < 0,001$) tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh với thời điểm 30 ngày.

3.2.3.7. Kết quả đánh giá trên khả năng thụ thai

Kết quả đánh giá khả năng thụ thai của tinh dịch thỏ đực của các lô được trình bày trong bảng 3.38.

Bảng 3.38. Tỷ lệ thụ thai và số con sinh ra

Lô (n = 8)	Số thỏ cái được thụ tinh	Số thỏ cái có thai	Tỷ lệ thụ thai (%)	Số con sinh ra
Lô chứng	16	9	56,25	6,33 ^b ± 1,00
Lô mô hình	16	5	31,25	4,80 ^c ± 1,30
Lô trị 1	16	10	62,50	6,90 ^{ab} ± 1,00
Lô trị 2	16	13	81,25	7,69 ^a ± 1,55
p lô			$\chi^2 = 8,392$; df = 3; p = 0,039	0,001

Ghi chú: ^{a, b, c}: Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong một cột.

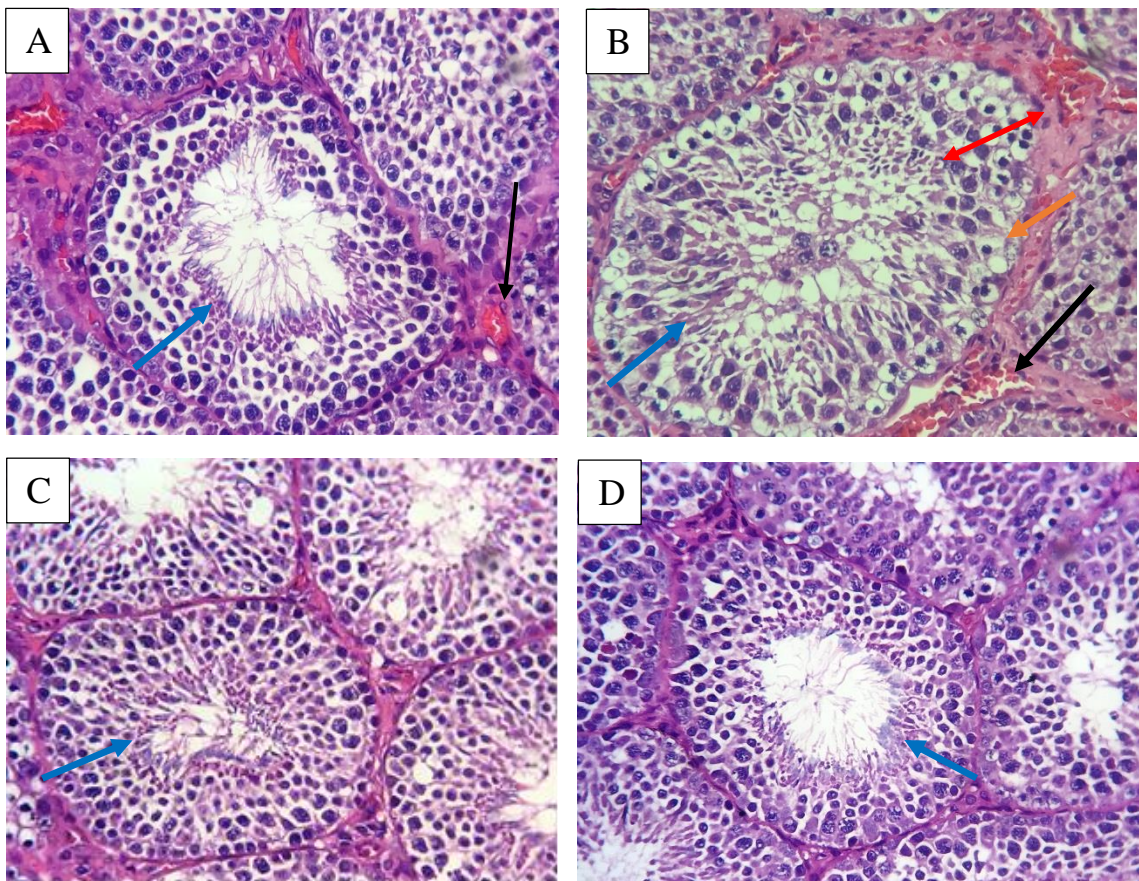
Lô trị 1: uống TXCB 180 mg/kg; lô trị 2: uống TXCB 360 mg/kg.

Nhận xét: Kết trên cho thấy, tỉ lệ thụ thai của lô chứng là 56,25%, lô mô hình là 31,25%, lô trị 1 là 62,50% và của lô trị 2 là 81,25%. Có sự khác biệt có ý nghĩa về tỉ lệ thụ thai giữa các lô ($\chi^2 = 8,392$; $df = 3$; $p = 0,039$).

Về số lượng con sinh ra: ở lô mô hình, số lượng con sinh ra thấp hơn có ý nghĩa so với lô chứng ($p = 0,036$), lô trị 1 và lô trị 2. Ở lô trị 1, số con sinh ra cao hơn đáng kể so với lô mô hình ($p = 0,005$), ngoài ra không có sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh với lô chứng. Ở lô trị 2, số con sinh ra cao hơn đáng kể so với lô chứng ($p = 0,018$) và lô mô hình ($p < 0,001$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa số lượng con sinh ra ở lô trị 1 và lô trị 2.

3.2.3.8. Mô bệnh học tinh hoàn

Hình ảnh mô bệnh học tinh hoàn được thể hiện trong hình sau:



Hình 3.11. Hình ảnh mô bệnh học tinh hoàn thỏ

Ghi chú: nhuộm HE, 400X; A: lô chứng; B: lô mô hình;

C: lô trị 1 (uống TXCB 180 mg/kg); D: lô trị 2 (uống TXCB 360 mg/kg).

Nhận xét:

Trên hình ảnh mô bệnh học tinh hoàn cho thấy:

- Ở lô chứng hình ảnh tinh hoàn bình thường: các ống sinh tinh khá đều nhau, các ống sinh tinh trong lòng có chứa nhiều tinh trùng có đuôi rõ (mũi tên xanh). Thành ống sinh tinh có đầy đủ các tế bào dòng tinh: tế bào Sertoli, tinh nguyên bào, tinh bào 1, tinh bào 2 và tiền tinh trùng. Rải rác một số nhân chia. Mô liên kết ngoài ống sinh tinh có các mao mạch máu xung huyết (mũi tên đen).

- Ở lô mô hình có hình ảnh suy giảm sinh tinh (Jonhson score 8): các ống sinh tinh khá đều nhau, các ống sinh tinh trong lòng có chứa ít tinh trùng (mũi tên xanh). Thành ống sinh tinh có các tế bào dòng tinh với số lượng ít với số hàng tế bào ở thành ống sinh tinh ít (mũi tên đỏ): tế bào Sertoli, tinh nguyên bào, tinh bào 1, tinh bào 2 và tiền tinh trùng. Không thấy hình nhân chia. Một số ống sinh tinh có các tế bào dòng tinh bị thoái hóa (mũi tên vàng). Mô liên kết ngoài ống sinh tinh có các mao mạch máu xung huyết (mũi tên đen).

- Ở lô trị 1, có hình ảnh tinh hoàn bình thường: các ống sinh tinh khá đều nhau, các ống sinh tinh trong lòng có chứa nhiều tinh trùng có đuôi rõ (mũi tên xanh). Thành ống sinh tinh có đầy đủ các tế bào dòng tinh: tế bào Sertoli, tinh nguyên bào, tinh bào 1, tinh bào 2 và tiền tinh trùng. Rải rác một số nhân chia. Mô liên kết ngoài ống sinh tinh các mao mạch máu không bị xung huyết.

- Ở lô trị 2, có hình ảnh tăng sinh sản tinh trùng: các ống sinh tinh khá đều nhau, các ống sinh tinh trong lòng có chứa nhiều tinh trùng có đuôi rõ (mũi tên xanh). Thành ống sinh tinh có đầy đủ các tế bào dòng tinh: tế bào Sertoli, tinh nguyên bào, tinh bào 1, tinh bào 2 và tiền tinh trùng. Rải rác một số nhân chia. Mô liên kết ngoài ống sinh tinh các mao mạch máu không bị xung huyết.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Về đánh giá độc tính của viên nang TXCB

4.1.1. Độc tính cấp

Một thuốc nói chung muốn được đưa vào sử dụng trên người thì cần phải an toàn và có hiệu quả điều trị, xét chung thì tính an toàn của thuốc là quan trọng hơn hiệu quả vì thuốc có hiệu quả đến mấy nhưng không an toàn thì cũng không thể được dùng trong trị liệu. Các thử nghiệm về độc tính là công cụ để đánh giá tính an toàn của một chế phẩm. Ngoài các thử nghiệm chung về độc tính cấp và độc tính bán trường diễn, những chế phẩm khác nhau có thể được yêu cầu tiến hành các thử nghiệm khác về độc tính như độc tính trên sinh sản, độc tính gây đột biến gen, độc tính sinh ung thư...

Nghiên cứu về độc tính cấp là nghiên cứu dược lý đầu tiên cần phải được tiến hành của một sản phẩm nhằm xác định độc tính xảy ra sau khi dùng thuốc một lần hoặc vài ba lần trong ngày [103]. Kết quả từ nghiên cứu độc tính cấp và LD₅₀ có thể được sử dụng: (a) làm cơ sở để phân loại và ghi nhãn các chất về độc tính; (b) cung cấp những thông tin cần thiết về kiểu của tác động gây độc cấp của chất thử, bước đầu xác định cơ quan đích có thể bị độc bởi thuốc thử cũng như sơ bộ xác định cơ chế gây độc, từ đó định hướng để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo như nghiên cứu độc tính bán trường diễn hoặc các độc tính trên cơ quan riêng biệt; (c) giúp cho việc xây dựng cơ sở liệu cho một chất thử mới; (d) giúp cho việc xác định liều trong các nghiên cứu trên động vật tiếp theo bao gồm cả nghiên cứu độc tính dài hạn và nghiên cứu tác dụng dược lý; (e) giúp xác định LD₅₀ và dự đoán về kiểu tác dụng của chất thử, từ đó xác định trị số điều trị và quyết định việc thuốc có thể được đưa vào sử dụng trên người hay không.

Trong các nghiên cứu độc tính cấp, thường các chất thử nghiệm được dùng liều duy nhất (01 lần/ngày) tuy nhiên trong một số trường hợp có thể được dùng nhiều hơn 01 lần. Theo lý thuyết, thể tích tối đa có thể dùng theo đường

uống với chuột nhắt trắng là 0,5 mL/10 g thể trọng, tuy nhiên thể tích tối ưu là 0,2- 0,5 mL/20g chuột [103]. Trong nghiên cứu này, thể tích cho chuột nhắt uống là 0,2 mL/10 g thể trọng, điều này làm giảm sự ảnh hưởng của việc uống một thể tích lớn đối với chuột. Theo các nghiên cứu thăm dò về độc tính cấp thì TXCB khá an toàn, hơn nữa khi pha TXCB trong nước, ở nồng độ 0,25 g/mL là nồng độ cao nhất mà TXCB phân tán đều và qua kim công đầu tù dễ dàng (kim cho chuột uống thuốc) do vậy nếu dùng liều duy nhất thì liều dùng cao nhất có thể được thử nghiệm là 5 g/kg thể trọng. Một số tác giả cho rằng khi đã thử với liều 5 g/kg mà động vật không chết thì không cần tiến hành thêm các thử nghiệm độc tính cấp khác. Với chế phẩm TXCB, liều dự kiến sử dụng trên người là 60 mg/kg, như vậy liều ngoại suy sang chuột nhắt trắng là 0,72 g/kg (hệ số 12). Với mức liều tối đa là 5 g/kg thì liều này cao hơn liều dự kiến dùng trên người khoảng 7 lần. Vì vậy, nghiên cứu này đã cho chuột nhắt uống 3 lần/ngày x 0,2 mL/10 g thể trọng để tăng liều tối đa lên 15 g/kg và cao hơn liều dự kiến dùng trên người là khoảng 14 lần.

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi cho chuột nhắt trắng uống liều tối đa có thể dung nạp được là 15 g/kg, ở tất cả các lô đến 72 giờ đều không có chuột nào chết. Ngoài ra, khi theo dõi đến 14 ngày tất cả các chuột đều không có bất kỳ dấu hiệu ngộ độc nào. Như vậy, chưa tìm thấy liều LD₅₀ và TXCB không có độc tính cấp khi dùng tới liều 15 g/kg. Đối chiếu với sự phân loại độc tính cấp đường uống được khuyến nghị bởi OECD, TXCB được phân vào nhóm 5 (LD₅₀ > 5000 mg/kg), là loại có độc tính thấp nhất. Các chất có giá trị LD₅₀ cao hơn 5000 mg/kg theo đường uống được coi là an toàn hoặc thực tế không độc hại. Tuy rằng nhóm 5 theo phân loại này dành cho các hóa chất có độc tính cấp tính tương đối thấp, nhưng trong một số trường hợp nhất định, có thể gây nguy hiểm cho các quần thể đặc biệt dễ bị tổn thương.

Khi so sánh với các nghiên cứu khác đã được công bố; tuy chưa có công bố về độc tính cấp của TXCB tuy nhiên một số dược liệu trong công thức bào chế của TXCB cũng đã được đánh giá độc tính cấp:

- Về tảo dương: Trần Thị Hằng và cs (2016), lần đầu tiên đã báo cáo về độc tính cấp của tảo dương (*B. laxiflora*), theo đó đã xác định được liều LD₅₀ của dịch chiết methanol tảo dương là 10,64 g/kg thể trọng [104].

- Về thạch斛 tía (*Dendrobium officinale*): Khi đã dùng tới liều tối đa là 10 g/kg nhưng vẫn không gây độc [105].

- Về ngư đại lực: Zengyan Yang và cs (2014), ngư đại lực (*Radix millettiae speciosae*) an toàn ở liều tối đa có thể dung nạp với dịch chiết nước là 1000 g/kg (tương đương với 110 lần liều dùng trên người) và dịch chiết ethanol là 1700 g/kg (tương đương với 186 lần liều dùng trên người) [106].

- Về sâm cau (*C. orchioides*): Theo Elumalai Anandakirouchenane và cs (2013), dịch chiết methanol rễ sâm cau dùng tới liều 2000 mg/kg không thấy độc tính cấp [107]. Ở liều cao hơn, Madhavan, V và cs (2007) dùng liều 3 g/kg với dịch chiết ethanol và dịch chiết nước đều chưa xuất hiện độc tính cấp [108]. Một nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng không xác định được liều LD₅₀ của cao chiết côn sâm cau khi đã dùng liều tối đa tương đương 45,0 g cao/kg thể trọng chuột nhắt trắng [109]. Theo dược điển Trung Quốc (2010) thì liều thường dùng trong điều trị của sâm cau là 3- 9 g/ngày, khi dùng với liều gấp 1384 lần liều dùng trên người chuột vẫn không chết và liều LD₅₀ của dịch chiết ethanol của sâm cau xác định được là 215,9 g/kg, tương đương với 1439 lần liều dùng trên lâm sàng [110].

- Về dâm dương hoắc: Sui, H.X và cs (2006), đã đánh giá độc tính cấp của *Herba Epimedii*, theo đó dâm dương hoắc không có độc tính cấp, liều LD₅₀ cao hơn 80 g/kg trên chuột nhắt trắng [111].

- Về ba kích: Ba kích liều 250 g/kg không làm chết chuột nhắt khi theo dõi đến 3 ngày [112].

Như vậy kết quả về độc tính cấp của TXCB cũng phù hợp với các nghiên cứu về độc tính cấp của các dược liệu có trong công thức bào chế.

4.1.2. Độc tính bán trường diễn

Các nghiên cứu độc tính bán trường diễn đánh giá tác dụng không mong muốn của việc tiếp xúc liên tục hoặc lặp lại của chất thử nghiệm trong một phần tuổi thọ trung bình của động vật thí nghiệm, chẳng hạn như loài gặm nhấm. Cụ thể, nó cung cấp những thông tin về cơ quan đích bị ngộ độc và được thiết kế để xác định mức độ tác dụng phụ không thể quan sát được [113]. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn cũng có thể giúp xác định chế độ liều thích hợp cho các nghiên cứu dài hạn.

Theo kết quả nghiên cứu độc tính cấp thì với mức liều 15 g/kg không gây độc tính cấp. Chế phẩm được bào chế dưới dạng viên nang, khối lượng bột cao dược liệu trong một nang là 400 mg. Với liều dự kiến dùng trên người là 6- 8 viên/ngày tương đương với khoảng 60 mg/kg trọng lượng cơ thể. Do vậy, liều nghiên cứu độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng (hệ số 7) được lựa chọn là 0,42 g/kg (tương đương với liều dự kiến dùng trên người) và 1,26 g/kg (gấp 3 lần liều dự kiến dùng trên người).

Kết quả cho thấy không có chuột nào thuộc các lô trị chết và có biểu hiện các triệu chứng ngộ độc. Không có sự thay đổi về da, lông, mắt và phân khi so sánh với lô chứng. Biết rằng ở liều cao của những chiết xuất từ thực vật có thể chuyển hóa thành sản phẩm cuối độc hại, có thể can thiệp vào chức năng dạ dày và giảm hiệu quả chuyển đổi thức ăn, từ đó có thể dẫn đến những thay đổi qua sản phẩm bài tiết (phân). Tuy nhiên, ở những chuột uống TXCB không thấy có sự thay đổi trong phân, như vậy TXCB không ảnh hưởng tới sự tiêu hóa, hấp thu của thức ăn.

Sự thay đổi trọng lượng cơ thể chuột có thể do lượng thức ăn, nước uống đưa vào nhiều hơn hoặc bản thân TXCB là chất dinh dưỡng có thể thuận lợi cho việc tăng cân. Ở tất cả các lô, có sự tăng trọng lượng ở thể chuột trong thời

gian nghiên cứu và không có sự thay đổi về trọng lượng cơ thể khi so sánh các lô dùng TXCB với lô chứng ($p > 0,05$), như vậy TXCB không ảnh hưởng tới quá trình trao đổi chất bình thường ở chuột cống trắng.

Việc phân tích các chỉ số sinh hóa máu có ý nghĩa trong việc đánh giá các nguy cơ, bất kỳ sự thay đổi nào về các chỉ số sinh hóa khi nghiên cứu trên động vật đều có giá trị khi đánh giá nguy cơ dùng thuốc trên người. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các chỉ số sinh hóa của chuột được uống TXBC các ở 2 mức liều khác nhau không thay đổi khi so sánh với lô chứng.

Các phân tích huyết học và sinh hóa lâm sàng được thực hiện để đánh giá các thay đổi có thể có trong chức năng gan và thận bị ảnh hưởng bởi các chất thử nghiệm. Phân tích chức năng gan và thận là rất quan trọng trong việc đánh giá độc tính của thuốc và chiết xuất thực vật vì cả hai đều cần thiết cho sự sống của một sinh vật. Hoạt độ cao của các enzym ALT và AST là sự báo hiệu cho những bệnh lý ở gan hoặc gây độc cho gan. Không có sự thay đổi có ý nghĩa ($p > 0,05$) về hoạt độ ALT và AST ở các lô uống TXCB chứng tỏ rằng TXCB dùng trong 90 ngày không làm tổn thương tế bào gan.

Sự rối loạn chức năng thận có thể được đánh giá bằng việc định lượng urea và creatinin. Trong đó, nồng độ urea máu thay đổi tùy theo khẩu phần ăn, tăng nhất thời sau bữa ăn nhiều đạm; creatinin là thành phần có nitơ trong máu ổn định nhất, không phụ thuộc vào chế độ ăn hoặc những thay đổi bệnh lý khác mà chỉ phụ thuộc vào khả năng đào thải của thận. Khi cầu thận bị tổn thương, nồng độ creatinin máu tăng sớm hơn urea máu. Do vậy, với chức năng thận, đánh giá nồng độ creatinin máu có ý nghĩa hơn so với đánh giá nồng độ urea máu. Trong nghiên cứu này, ở các lô dùng TXCB trong 90 ngày, không có sự khác biệt có ý nghĩa về nồng độ creatinin máu so với lô chứng. Như vậy, TXCB không ảnh hưởng tới chức năng thận khi nghiên cứu trên chuột cống trắng.

Đánh giá về công thức máu là đánh giá sinh lý và bệnh lý quan trọng ở động vật và người. Số lượng và chất lượng các tế bào máu phản ánh tình trạng

của cơ quan tạo máu. Thông thường các chỉ số được đánh giá là RBC, PLT, WBC, HGB, HCT và MCV. Nếu chất thử nghiệm tác động đến cơ quan tạo máu, có độc tính với cơ quan tạo máu có thể làm thay đổi giới hạn bình thường của các chỉ số huyết học này. Hơn nữa, việc phân tích công thức máu có liên quan đến đánh giá rủi ro khi dùng thuốc vì những thay đổi trong hệ thống huyết học có giá trị tiên đoán cao hơn đối với độc tính của con người khi dữ liệu được ngoại suy từ các nghiên cứu trên động vật [114]. Ở tất cả các lô dùng TXCB trong 90 ngày cho thấy không có sự thay đổi đáng kể về các chỉ số huyết học khi so sánh với nhóm chứng. Tác dụng không đáng kể của TXCB lên số lượng hồng cầu, thể tích trung bình hồng cầu, hematocrit, hemoglobin và tiểu cầu cho thấy rằng TXCB không ảnh hưởng đến sự tạo hồng cầu, hình thái hồng cầu hoặc sức bền của tế bào hồng cầu.

Bạch cầu là dòng tế bào bảo vệ cơ thể đầu tiên đáp ứng với các tác nhân truyền nhiễm, tổn thương ở mô hoặc quá trình viêm. Trong nghiên cứu này, TXCB không làm ảnh hưởng tới số lượng bạch cầu khi dùng liên tục trong 90 ngày.

Hình ảnh đại thể của các cơ quan được uống TXCB không thể hiện bất kỳ thay đổi nào về màu sắc khi so sánh với lô chứng. Phi đại các cơ quan là dấu hiệu đầu tiên về độc tính của chất thử nghiệm hoặc chất có hoạt tính sinh học. Tuy nhiên, không có sự phì đại của các cơ quan được quan sát trong nghiên cứu này trong số tất cả các lô sử dụng chế phẩm nghiên cứu. Ngoài ra, trên hình ảnh vi thể, không có cơ quan nào từ các lô chuột uống TXCB cho thấy bất kỳ sự thay đổi nào trong cấu trúc tế bào hoặc bất kỳ tác động không có lợi nào khi nhìn dưới kính hiển vi ở nhiều độ phóng đại khác nhau. Không có bệnh lý nào được ghi nhận về mô học của các cơ quan: gan, lách, thận của nhóm chứng. Nói chung, bất kỳ tác động có hại nào cho các tế bào nhu mô gan đều dẫn đến sự tăng nồng độ của cả hai transaminase trong máu. Do đó, sự thay đổi không đáng kể về hoạt độ ALT và AST cho thấy rằng việc sử dụng TXCB không làm

thay đổi tế bào gan cho nên sự chuyển hóa bình thường của chuột quan sát được trong mô bệnh học của gan. Tương tự, cũng không có sự thay đổi đáng kể về nồng độ creatinin máu của các lô dùng TXCB khi so sánh với nhóm chứng. Bất kỳ sự gia tăng về nồng độ creatinin trong máu sẽ được quan sát thấy nếu có tác động tới chức năng của các nephron cầu thận [115]. Điều này được xác nhận thêm bằng các quan sát mô bệnh học của thận trong nghiên cứu này.

Từ những kết quả về sinh hóa, huyết học, hình ảnh đại thể và vi thể của gan, lách và thận trên chứng tỏ TXCB liều 0,42 g/kg và 1,26 g/kg uống liên tục trong 90 ngày là an toàn khi nghiên cứu trên chuột cống trắng. Đây là nghiên cứu đầu tiên công bố về độc tính bán trường diễn của TXCB. Tuy nhiên cũng có một số tác giả đã công bố về độc tính bán trường diễn của các dược liệu có trong công thức bào chế của TXCB, cụ thể như:

- Về tảo dương: Với liều 0,28 g/kg/ngày và 0,84 g/kg/ngày trong 28 ngày, dịch chiết nước tảo dương đã không làm thay đổi các chỉ số huyết học. Tuy nhiên, làm tăng có ý nghĩa nồng độ cholesterol, hoạt độ enzym AST và ALT, tăng nồng độ creatinin ở mức liều 0,84 g/kg/ngày [75]. Ngoài ra, dịch chiết nước tảo dương liều 0,48 g/kg/ngày và 1,44 g/kg/ngày uống trong 28 ngày liên tục làm giảm khả năng thụ thai của chuột nhất con F1 sinh ra từ chuột thế hệ P được uống mẫu thử [116].

- Với sâm cau: Theo Elumalai Anandakirouchenane và cs (2013), dịch chiết rễ sâm cau với các mức liều 200, 400 và 800 mg/kg trong 28 ngày cho thấy đều không ảnh hưởng tới các chỉ số sinh hóa, huyết học, chức năng gan, thận và hình thái mô học gan, thận [107]. Cao chiết còn sâm cau với liều 0,263 g/kg và 1,315 g/kg đã được chứng minh không ảnh hưởng đến thể trọng, chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận cũng như mô bệnh học gan, thận trong suốt quá trình uống cũng như sau khi ngừng uống 15 ngày [109].

Yan Nie và các cs (2013), khi nghiên cứu độc tính của sâm cau liều 30 g/kg và 60 g/kg trong 60 ngày không gây bất kỳ dấu hiệu độc tính nào; tuy

nhiên ở liều 120 g/kg trong 60 ngày làm tổn thương gan, thận và một số cơ quan của hệ sinh dục [110].

- Về dâm dương hoắc: Nghiên cứu độc tính trường diễn của flavonoid tổng số của dâm dương hoắc cho thấy ở liều 410 g/kg trong 12 tuần trên chuột cống đã không làm thay đổi các thông số về sinh hóa, huyết học và hình ảnh mô học các cơ quan quan trọng [117].

- Về ba kích: Theo các nghiên cứu về độc tính bán trường diễn thì các dịch chiết ba kích được đánh giá là an toàn, không gây độc tính khi dùng trên lâm sàng [112].

- Về câu kỷ tử: Giống như các loại trái cây thường ăn khác, *L. barbarum* không độc hại. *L. barbarum* đã được sử dụng theo truyền thống như một loại thực phẩm và như một loại thuốc thảo dược trong hơn 2500 năm mà không có độc tính cụ thể. Không có độc tính được biết đến được báo cáo về *L. barbarum* trong các tài liệu khoa học hoặc trong sách giáo khoa y học cổ truyền châu Á. Chính quyền Hà Lan năm 2004 và Cơ quan Tiêu chuẩn Thực phẩm Vương quốc Anh (2007) đã phân loại *L. barbarum* là một loại thực phẩm và không phải là một loại thực phẩm mới, dựa trên việc sử dụng truyền thống lâu dài mà không có độc tính. Các bài báo và sách giáo khoa khác nhau đã trích dẫn các khía cạnh lợi ích truyền thống của *L. barbarum* và không đề cập đến bất kỳ khía cạnh độc tính nào [118].

- Về ngư đại lực: Không thấy xuất hiện độc tính, không làm thay đổi khối lượng, đại thể cũng như vi thể các cơ quan đồng thời cũng không ảnh hưởng tới các chỉ số sinh hóa, huyết học khi dùng đến mức liều 25 g/kg/ngày [85].

Đối chiếu với những kết quả nghiên cứu đã được công bố trước đó về độc tính của các dược liệu đơn lẻ, đáng chú ý thấy dịch chiết nước tủa dương có độc tính bán trường diễn ở liều 0,84 g/kg. Trong viên nang TXCB, khối lượng bột cao khô tủa dương là 75 mg/450 mg, chiếm tỉ lệ 16,67%. Với liều

viên nang TXCB sử dụng trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn là 0,42 g/kg và 1,26 g/kg thì liều tương ứng với bột cao khô tủa dương là 0,07 g/kg và 0,21 g/kg. Các mức liều này thấp hơn so với liều 0,28 g/kg dịch chiết nước tủa dương (mức liều đã không làm thay đổi có ý nghĩa các chỉ số sinh hóa và huyết học trong nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thanh Hương). Như vậy, loại trừ khả năng tương tác giữa các dược liệu thì kết quả về độc tính của nghiên cứu này là phù hợp.

4.2. Về tác dụng của viên nang TXCB trên chức năng sinh dục đực

4.2.1. Hoạt tính androgen

Androgen là những hormon giới tính nam quan trọng, thực hiện nhiều chức năng sinh lý, quyết định những đặc tính sinh dục ở nam giới. Có một số phương pháp đánh giá hoạt tính androgen của một chất hay sản phẩm. Phương pháp kinh điển là dựa trên sự đáp ứng của mào gà trống non thiếu đối với chất thử. Theo đó, đánh giá dựa vào diện tích bề mặt mào gà [46].

Hiện nay, phương pháp dựa trên sự thay đổi trọng lượng của 5 mô- cơ quan phụ thuộc androgen ở chuột công đực non thiếu (thử nghiệm Hershberger-Hershberger assay) là phương pháp hay được sử dụng. Đây là phương pháp có độ nhạy cao, đáng tin cậy và được cho là một mô hình tốt để sàng lọc các thuốc có hoạt tính androgen. OECD (The Organization for Economic Co-operation and Development- Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế) cũng đã đề xuất sử dụng phương pháp này trong việc sàng lọc các chất có hoạt tính androgen và kháng androgen [47].

Bởi vì phép thử Hershberger đạt được độ nhạy khi sử dụng con đực với sự sản xuất androgen nội sinh tối thiểu. Điều này đạt được thông qua việc sử dụng con đực bị thiếu, sau khi thiếu các mô đích suy giảm đến trọng lượng tối thiểu. Do đó, khi đánh giá những chất có hoạt tính androgen, có nồng độ androgen nội sinh thấp, trục dưới đồi- tuyến yên- tuyến sinh dục không thể bù lại được qua cơ chế điều hòa ngược, khả năng đáp ứng của mô- cơ quan là tối

đa. Vì vậy, phép thử Hershberger chỉ cần 6 con cho mỗi nhóm liều trong khi các xét nghiệm khác với con đực không thiến (trưởng thành hoặc chưa trưởng thành) đề nghị sử dụng 15 con đực cho mỗi nhóm liều [47].

Ở chuột cống đực non thiến, 5 mô- cơ quan này đều đáp ứng với androgen với sự gia tăng trọng lượng tương đối. Các chất có hoạt tính androgen làm kích thích, tăng trọng lượng của các mô- cơ quan này [47]. Nhìn chung, chất có hoạt tính androgen sẽ làm tăng trọng lượng của tất cả các cơ quan sinh dục phụ, song không phải lúc nào sự đáp ứng cũng như nhau với mọi chất thử. Hơn nữa, sự phát triển của túi tinh có thể được kích thích không chỉ bởi androgen mà còn bởi các chất có hoạt tính oestrogen, còn được gọi là tác dụng nghịch của oestrogen.

Lô chứng dương được khuyến cáo sử dụng là tiêm dưới da TES propionat liều 0,2 hoặc 0,4 mg/kg/ngày [47]. Trong báo cáo thẩm định xây dựng phương pháp thử nghiệm của OECD, các liều khác nhau của TES propionat đã được sử dụng: 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 và 1,6 mg/kg/ngày; ngoài ra cũng đánh giá sự đáp ứng giữa hai mức liều TES propionat là 0,2 mg/kg/ngày và 0,4 mg/kg/ngày, kết quả cho thấy lựa chọn một trong hai mức liều này là tối ưu [119]. Một số tác giả cũng đã sử dụng liều chứng dương là 0,4 mg/kg/ngày [49].

Trong luận án này, chứng dương đã được sử dụng là tiêm dưới da TES propionat liều 0,2 mg/kg trong 10 ngày. Kết quả cho thấy, TES propionat đã làm tăng rõ rệt trọng lượng tương đối của túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper và cơ nâng hậu môn- hành hang so với lô chứng sinh lý. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đó về chứng dương với liều TES propionat là 0,2 mg/kg/ngày [120].

Về các lô sử dụng chế phẩm nghiên cứu, ở cả hai mức liều dùng là 0,42 g/kg/ngày (tương đương với liều dự kiến dùng trên người) và 0,84 g/kg/ngày (gấp 2 lần liều dự kiến dùng trên người) đều có sự tăng đáng kể về khối lượng tương đối của túi tinh, tuyến Cowper và cơ nâng hậu môn- hành hang so với lô

chúng ($p < 0,05$). Không có sự khác nhau có ý nghĩa ($p > 0,05$) về trọng lượng tương đối các mô- cơ quan khi so sánh giữa 2 lô dùng chế phẩm nghiên cứu. Như vậy, chế phẩm ở 2 mức liều thử nghiệm có thể hiện hoạt tính androgen (tăng trọng lượng tương đối của 3/5 mô- cơ quan). Như vậy, có điều thú vị là mặc dù có hoạt tính androgen nhưng TXCB không làm tăng trọng lượng tương đối của tuyến tiền liệt, đây có thể sẽ là một lợi ích của TXCB nếu được sử dụng trong trị liệu.

Trong thành phần của chế phẩm nghiên cứu có chứa 8 dược liệu (như đã trình bày ở trên), trong đó có tảo dương, sâm cau và ba kích là đã được chứng minh có hoạt tính androgen. Cụ thể, với tảo dương: theo tác giả Nguyễn Thanh Hương và cộng sự, cao lỏng tảo dương liều 1,4 g/kg làm tăng rõ rệt khối lượng túi tinh, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn so với lô chứng ($p < 0,05$) nhưng không làm tăng khối lượng bao qui đầu và tuyến tiền liệt trên chuột cống đực non thiếu [49]. Với sâm cau, N.S. Chauhan và cs (2007) thấy dịch chiết ethanol thân rễ sâm cau liều 100 mg/kg làm tăng trọng lượng túi tinh sau 30 ngày [86]; dịch chiết thân rễ sâm cau liều 350 mg/kg và 525 mg/kg, trong thời gian 3 tuần làm tăng trọng lượng túi tinh, tuyến tiền liệt, nồng độ TES trong máu trên mô hình chuột cống trưởng thành không thiếu và chuột non thiếu. Cao khô ba kích ở liều thử 200 mg/kg trên chuột nhắt trắng (không thiếu) làm tăng trọng lượng túi tinh, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn- hành hang và tăng nồng độ TES trong huyết tương có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng [121].

Theo hướng dẫn của OECD, ngoài những đánh giá về trọng lượng của 5 cơ quan sinh dục phụ thì có thể đánh giá, phân tích thêm nồng độ TES huyết thanh và/hoặc LH. Trong phạm vi luận án này, ngoài trọng lượng của 5 cơ quan sinh dục phụ thì đã không đánh giá thêm các chỉ tiêu khác bởi lẽ: đánh giá tác dụng của chế phẩm trên sự sinh tổng hợp TES sẽ được đánh giá ở trên 2 mô hình là mô hình gây rối loạn cương dương bằng đái tháo đường và mô hình gây suy giảm sinh sản bằng FLZ. Thực tế, nồng độ TES huyết thanh có thể coi là

“không bắt buộc” trong đánh giá hoạt tính androgen. Một trong những lý do lý giải điều này là tiêu chuẩn đánh giá dương tính (có hoạt tính androgen) là có sự thay đổi $\geq 2/5$ cơ quan sinh dục phụ, âm tính là $\geq 4/5$ cơ quan không có sự thay đổi, mà không có đánh giá về nồng độ TES [122].

4.2.2. Tác dụng trên khả năng cương dương

4.2.2.1. Về lựa chọn mô hình gây ĐTD để nghiên cứu trên chức năng cương dương

Sự suy giảm khả năng cương dương ở nam giới có nhiều nguyên nhân, trong đó có 2 nhóm nguyên nhân chính là do sinh lý (do tuổi) và do sự rối loạn các chức năng nội ngoại tiết và vận mạch do các bệnh mắc kèm. Với nguyên nhân do tuổi, đây là một thực tế không thể đảo ngược, các thuốc có thể tác động có lẽ chỉ làm giảm bớt phần nào sự suy giảm khả năng cương dương bởi không chỉ chức năng cương dương mà toàn bộ chức năng của các cơ quan tổ chức khác cũng đều bị suy giảm. Như vậy, suy giảm do các bệnh lý mắc kèm khác là lý do chính được quan tâm nghiên cứu. Trong đó ĐTD là một trong những yếu tố nguy cơ hàng đầu của ED. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng ED gặp ở 3/4 bệnh nhân nam mắc ĐTD và ở nhóm bệnh nhân ĐTD này, ED xảy ra sớm hơn và cao gấp 3 lần so với trung bình chung [27]. Tại Việt Nam, theo nghiên cứu của Phạm Nam Việt (2011), tần suất ED ở bệnh nhân ĐTD typ 2 là 64,28%. Tần suất này càng cao ở bệnh nhân tuổi càng cao, thời gian mắc ĐTD lâu, không kiểm soát đường huyết tốt và có biến chứng của ĐTD [123]. Theo tác giả Đoàn Văn Cường (2013), trong 100 trường hợp đến khám và điều trị ED tại bệnh viện đa khoa Tây Đô, Cần Thơ thì nhóm tuổi từ 40 trở lên chiếm 75%. Có 35% số bệnh nhân có mắc các bệnh lý đi kèm khác như tăng huyết áp, ĐTD, suy thận [124]. Còn theo tác giả Đoàn Minh Thụy (2013), nghiên cứu trên 150 bệnh nhân ĐTD có 115 bệnh nhân bị ED, chiếm 76,7%. Trong đó mức độ trung bình đến nặng là 64,6%; ngoài ra những bệnh nhân béo phì, bệnh nhân có biến

chúng mạch máu, biến chứng thần kinh có tỷ lệ ED cao hơn nhóm không lần lượt là 2,2, 3,09 và 2,89 lần [125].

Cơ chế bệnh sinh của ED do ĐTĐ là kết quả của nhiều các yếu tố, chẳng hạn như sự gia tăng của các sản phẩm glycat hóa bền vững (advanced glycation end products- AGEs), sự suy giảm của con đường nitric oxyd- guanosin monophosphat vòng (NO- GMPv), stress oxy hóa, tổn thương thần kinh và suy sinh dục [126]. Nitric oxyd (NO), có nguồn gốc chủ yếu từ nội mô và mô thần kinh, là cơ chế chủ yếu điều chỉnh sự cương cứng của dương vật. NO kích thích sản xuất GMPv và giãn cơ trơn thể hang. Giảm tổng hợp NO và mất hoạt tính sinh học của NO trong các mạch máu là những đặc trưng của rối loạn chức năng nội mô trong ĐTĐ [127].

Tăng glucose máu đã được báo cáo là sinh ra các loại oxy phản ứng (ROS) và dữ liệu cho thấy ROS can thiệp vào sản xuất NO, gây ra apoptosis cơ trơn thể hang và rối loạn điều hòa chức năng nội mô [128]. Ngoài ra, nhiều bằng chứng chỉ ra rằng ĐTĐ có liên quan đến suy sinh dục có thể đóng một vai trò quan trọng trong ED [129]. GMPv trong thể hang bị giáng hóa bởi phosphodiesterase typ 5 (PDE5). Thuốc ức chế chọn lọc PDE5 là lựa chọn điều trị chính cho bệnh nhân ED do ĐTĐ. Tuy nhiên, bệnh nhân ED do ĐTĐ kém nhạy cảm với thuốc ức chế PDE5 đường uống hơn bệnh nhân không mắc ĐTĐ do bệnh lý thần kinh và tổn thương nội mô [27]. Do đó, nghiên cứu các phương pháp trị liệu mới để điều trị nam giới mắc ED do ĐTĐ là cần thiết.

Chính vì vậy mà các mô hình gây ĐTĐ của ED đã được phát triển. Cũng xuất phát từ những lý do đó mà trong luận án này lựa chọn mô hình ĐTĐ gây ED trong nghiên cứu tác dụng của TXCB.

4.2.2.2. Về kết quả tác dụng của TXCB lên chức năng cương dương

Các kết quả trong phần 3.2.2 cho thấy, ĐTĐ đã làm giảm chức năng cương dương trên chuột cống trắng, cụ thể làm giảm đáng kể ($p < 0,05$) ICP nền, ICPmax, AUC và tỉ số ICPmax/MAP, kết quả này cũng phù hợp với nhiều

ngiên cứu trước đó và phù hợp với cơ chế bệnh sinh của ED do ĐTĐ. TXCB đã làm tăng rõ rệt ICPmax, AUC và tỉ số ICP/MAP ở chuột ĐTĐ, điều này cho thấy rằng TXCB có thể cải thiện ED ở chuột ĐTĐ. Sự cải thiện về các chỉ số cương dương này có thể do một số cơ chế sau:

(1): TXCB cải thiện chỉ số cương dương do làm giảm nồng độ glucose máu:

Nồng độ glucose máu gây ra những nguy cơ đối với ED, vậy giảm nồng độ glucose máu, kiểm soát glucose máu có làm cải thiện chức năng cương dương hay không?

Để trả lời câu hỏi này, Woo Suk Choi và cs (2015) thấy rằng việc kiểm soát nồng độ glucose máu trên mô hình chuột cống gây ĐTĐ bằng STZ làm phục hồi chức năng cương dương thông qua các tỉ số ICP/MAP, AUC/MAP, đồng thời kết hợp giữa việc kiểm soát nồng độ glucose máu và dùng thuốc ức chế PDE5 có lợi trên các chỉ số cương dương hơn là chỉ kiểm soát nồng độ glucose máu [130]. Ngoài ra một số nghiên cứu trên lâm sàng chỉ ra rằng mức độ nặng của ED có tương quan nghịch với việc kiểm soát đường huyết, nồng độ HbA1c càng cao thì ED càng nặng; đồng thời bệnh lý thần kinh ngoại biên cùng với nồng độ HbA1c chứ không phải tuổi bệnh nhân là yếu tố tiên lượng độc lập cho ED [131]. Như vậy có cơ sở để nói rằng kiểm soát nồng độ glucose máu làm cải thiện chức năng cương dương.

Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy, ở lô uống TXCB sau 4 tuần nồng độ glucose máu bắt đầu giảm (so với lô mô hình và lô dùng sildenafil) và giảm rõ rệt ở thời điểm 8 tuần ($p < 0,05$). Như vậy có thể nguyên nhân làm cải thiện các chỉ số cương dương của TXCB là do TXCB đã làm giảm nồng độ glucose máu. Tác dụng làm giảm nồng độ glucose máu của TXCB phù hợp với các nghiên cứu đã công bố về tác dụng của các dược liệu có trong TXCB. Có nhiều bằng chứng rõ ràng về tác dụng giảm glucose máu của thạch斛 tía, sâm cau, câu kỷ tử, là những dược liệu có trong TXCB:

Thạch học tía làm giảm nồng độ glucose máu trên chuột nhất gây đái tháo đường bằng STZ [132].

Với sâm cau: V. Madhavan và cs (2007), dịch chiết ethanol và nước của sâm cau có tác dụng làm giảm glucose máu trên mô hình chuột cống trắng gây ĐTĐ bằng alloxan. Theo đó, dịch chiết ethanol và dịch chiết nước liều 0,5 g và 1 g/kg khi uống đến 21 ngày đã làm giảm đáng kể nồng độ glucose máu sau 7 ngày, 14 ngày và 21 ngày uống [108]. Theo Elumalai Anandakirouchenane và cs (2013) dịch chiết rễ sâm cau với các mức liều 200, 400 và 800 mg làm giảm nồng độ glucose máu trên chuột cống bình thường [107]. Một nghiên cứu khác của Avinash Patil và cs (2013), dịch chiết rễ sâm cau liều 1000 mg/kg làm giảm có ý nghĩa nồng độ glucose máu trên chuột gây ĐTĐ bằng STZ. Sau 16 ngày uống thuốc, nồng độ glucose máu giảm về mức tương đương với lô không gây ĐTĐ ($p > 0,05$). Theo đó, STZ đã làm tổn thương nghiêm trọng cấu trúc mô học của tuyến tụy, thận và gan của chuột bị ĐTĐ, các cấu trúc vi thể này đã được phục hồi ở một mức độ nhất định ở động vật được điều trị bằng dịch chiết sâm cau [133].

Với câu kỷ tử: Zhengwei Zhou và cs (2009) tác dụng hạ glucose máu của dịch chiết nước câu kỷ tử (polysaccharid từ *Lycium barbarum*) trên mô hình chuột nhất gây ĐTĐ bằng alloxan, ở liều 20 và 40 mg/kg đã làm giảm rõ rệt nồng độ glucose máu [96].

(2): Qua cơ chế làm giảm stress oxy hóa.

Trong các nghiên cứu khác nhau về chống stress oxy hóa, các phương pháp trị liệu để khôi phục sinh tổng hợp và hoạt tính sinh học của NO đã giúp ích cho việc khôi phục chức năng nội mô và chức năng cương dương trong mô hình động vật gây ED do ĐTĐ [128]. Dữ liệu nghiên cứu cho thấy, điều trị bằng chất chống oxy hóa làm giảm sản xuất gốc tự do anion superoxid ($O_2^{\cdot-}$), làm giảm nồng độ anion superoxid, tăng nồng độ NO và phục hồi chức năng cương dương trong mô hình động vật ED do ĐTĐ [128]. Ngoài ra, việc chuyển

gen NO synthase nội mô (eNOS) đã cải thiện chức năng cương dương ở chuột bị ED do ĐTĐ. Biết rằng việc tăng glucose máu gián tiếp làm tăng ROS bằng cách làm tăng sản xuất O_2^{*-} và ức chế khả năng chống oxy hóa trong thể hang [134]. ROS cũng đóng một vai trò quan trọng trong việc gây ra apoptosis trong thể hang. Do đó, giảm ROS, khôi phục eNOS và hoạt tính sinh học của NO có thể là một chiến lược tiềm năng để phục hồi chức năng cương dương ở bệnh nhân ĐTĐ.

MDA có thể được sử dụng như một marker sinh học đánh giá sự tổn thương do oxy hóa. Ngoài ra, SOD là một enzym làm giảm O_2^{*-} và có thể được sử dụng để đo mức độ stress oxy hóa. GSH-Px là một enzym chống oxy hóa có vai trò sinh học chính là bảo vệ các cơ quan, tổ chức bởi tổn thương do oxy hóa [135]. Trong phạm vi của nghiên cứu này không đánh giá các chỉ số về mức độ stress oxy hóa và khả năng chống oxy hóa của TXCB nên chưa thể khẳng định TXCB có tác dụng trên khả năng cương dương theo cơ chế này tuy nhiên cũng có những chỉ báo nhất định về việc TXCB có tác dụng chống oxy hóa. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng tất cả 8 dược liệu có trong công thức bào chế của TXCB đều có hoạt tính chống oxy hóa ở các mức độ khác nhau. Một số nghiên cứu còn chỉ ra tác dụng chống oxy hóa của các dược liệu này có lợi cho việc cải thiện chức năng cương dương. Như nghiên cứu trên polysaccharid của câu kỷ tử (LBP) cho thấy, LBP có tác dụng bảo vệ thần kinh bằng cách chống lại tổn thương tế bào thần kinh do stress oxy hóa bằng cách thúc đẩy hoạt động của enzym chống oxy hóa và bằng cách loại bỏ các gốc tự do, từ đó làm tăng NOS trong các bó sợi thần kinh và kích hoạt con đường NO/GMPv làm phục hồi một số chỉ số cương dương bị giảm bởi tổn thương dây thần kinh hang [135].

Như vậy những cải thiện về chức năng cương dương của chuột trong các lô dùng TXCB có thể do tác dụng ức chế stress oxy hóa của TXCB.

(3): Thông qua con đường NO/GMPv

Đã biết rằng, kích hoạt đường dẫn tín hiệu NO/GMPv là chủ yếu, và cần thiết cho sự cương cứng của dương vật. Các nghiên cứu tập trung vào bệnh nhân ED mắc ĐTDĐ đã chứng minh rằng ĐTDĐ làm trầm trọng thêm con đường truyền tín hiệu NO/GMPv [136]. Ngoài ra, sự giãn cơ trơn thể hang qua trung gian eNOS và nNOS bị suy yếu ở động vật mắc ĐTDĐ [137]. Cả nghiên cứu lâm sàng và cơ bản đều chỉ ra rằng bệnh ĐTDĐ làm xấu đi các khiếm khuyết chức năng trong con đường NO/GMPv liên quan đến sự tiến triển của bệnh ED liên quan đến ĐTDĐ. Trong nghiên cứu này, vì một số lý do mà các thí nghiệm nhằm đánh giá TXCB có làm cải thiện các chỉ số cương dương theo con đường này hay không đã không được tiến hành. Do đó chưa có cơ sở để khẳng định chắc chắn TXCB có tác dụng thông qua con đường NO/GMPv hay không, tuy nhiên qua tham khảo tài liệu, có một số nghiên cứu đã công bố chứng minh rằng các dược liệu có trong TXCB cải thiện chức năng cương dương theo con đường NO/GMPv, cụ thể:

Theo Dong Wan Sohn và cs (2008), cấu kỷ tử kết hợp với một số thành phần khác (trong đó cấu kỷ tử là thành phần chính, chiếm 32% trong công thức) làm tăng ICP thông qua con đường NO/GMPv [138]. Cụ thể những hoạt động NOS của nhóm dùng chế phẩm nghiên cứu tăng lên đáng kể, mức độ biểu hiện của nNOS và eNOS tăng có ý nghĩa so với nhóm chứng.

Do đó, có thể TXCB đã làm cải thiện chức năng cương dương bằng cách kích hoạt con đường dẫn tín hiệu NO/GMPv.

(4): Thông qua TES.

Sự sản xuất TES bình thường đòi hỏi sự phối hợp nhịp nhàng và toàn vẹn của trục dưới đồi- tuyến yên- tuyến sinh dục (HPG). Vùng dưới đồi tiết ra GnRH theo nhịp, kích thích sự tiết LH và FSH ở tuyến yên, sau đó là sản xuất TES và sinh tinh trùng ở tinh hoàn. Sự tích lũy đủ TES có tác dụng như một cơ chế điều hòa ngược làm giảm cả GnRH và sự bài tiết gonadotropin của tuyến

yên. Sự thiếu hụt hoặc mắc phải các bệnh lý bẩm sinh trong trục HPG dẫn đến suy sinh dục [139].

TES có vai trò quan trọng đối với sức khỏe của con người, đặc biệt là nam giới. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng TES không chỉ là yếu tố then chốt cần thiết cho sự sinh sản và trưởng thành của các đặc điểm sinh dục ngoài mà còn liên quan đến sức khỏe và sức khỏe chung của nam giới. Nồng độ TES trong huyết thanh thấp được phát hiện có liên quan đến nhiều rối loạn/bệnh lý như ĐTD, alzheimer, xơ vữa động mạch, ung thư, loãng xương, vô sinh, trầm cảm.

Các nghiên cứu đã báo cáo rằng nam giới mắc ĐTD tít 2 có nồng độ TES, TES tự do thấp hơn đáng kể và tỷ lệ mắc bệnh suy sinh dục ở những bệnh nhân này cao hơn so với dân số nói chung [140]. Nghiên cứu cho thấy TES gây ra sản xuất NO thông qua kích hoạt eNOS [141]. Theo đó, liệu pháp thay thế TES làm cải thiện chức năng nội mô và ngăn ngừa ED, điều này cho thấy TES nội sinh có thể bảo vệ nội mạc thể hang [142]. Kết quả nghiên cứu trên cho thấy, chuột bị ĐTD có sự giảm đáng kể nồng độ TES huyết thanh, điều này phù hợp với các nghiên cứu trên lâm sàng [129]. Ở lô dùng TXCB có nồng độ TES huyết thanh cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với lô bị ĐTD mà không điều trị và lô ĐTD được điều trị bằng sildenafil, đồng thời cũng cao hơn đáng kể so với lô chứng. Điều này chỉ ra rằng TXCB có tác động có lợi đối với trục HPG, kích thích giải phóng hormon. Đây có thể là kết quả của hoạt tính androgen của TXCB đã được chứng minh ở trên.

4.2.3. Nghiên cứu trên khả năng sinh sản

4.2.3.1. Về mô hình gây suy giảm sinh sản bằng fluconazol

*** Lý do lựa chọn fluconazol là tác nhân gây suy giảm sinh sản:**

Để đánh giá tác dụng của thuốc lên một trường hợp bệnh lý cần có các mô hình phù hợp. Vì cơ thể người và động vật là một thể thống nhất, toàn vẹn do vậy khi cơ thể khỏe mạnh bình thường thì thuốc khó có thể làm thay đổi các chức năng sinh lý bình thường, khó phá vỡ các cơ chế điều hòa của cơ thể. Để

thấy được tác dụng của thuốc, cần sử dụng mô hình mô phỏng các trường hợp bệnh lý trong thực tế. Mô hình càng giống với bệnh thực tế bao nhiêu, càng đem lại những thông tin hữu ích cho việc sử dụng thuốc sau này trong điều trị (nếu có thể).

Đối với việc nghiên cứu tác dụng của thuốc lên quá trình sinh sản trên động vật thực nghiệm, cần có các mô hình gây suy giảm sinh sản. Một số phương pháp gây suy giảm sinh sản có thể áp dụng trong nghiên cứu là: gây suy giảm bằng nhiệt [69], bằng stress [143], bằng thuốc- hóa chất, mô hình chuột già hay các mô hình sử dụng động vật biến đổi gen. Mỗi mô hình đều có những ưu điểm nhất định riêng, có thể phù hợp trong việc ngoại suy, dự đoán tác dụng khi sử dụng trên người. Ví dụ như mô hình gây suy giảm bằng nhiệt có thể hữu ích trong nghiên cứu sử dụng cho những bệnh nhân bị suy giảm sinh sản khi tiếp xúc với môi trường quá nóng (người làm việc trong điều kiện khắc nghiệt).

Tuy nhiên, dù chọn lựa mô hình nào thì nên lựa chọn mô hình mà đã biết rõ về cơ chế gây suy giảm. Khi biết rõ được cơ chế gây suy giảm thì sẽ dễ dàng cho nhà nghiên cứu trong việc đưa ra kết luận và dự đoán, biện giải về cơ chế tác dụng của thuốc.

Trong những mô hình trên thì mô hình gây suy giảm sinh sản bằng thuốc, hóa chất được nhiều nhà nghiên cứu lựa chọn. Ngoài cyclophosphamid liều trên chuột cống là 200 mg/kg cân nặng [68] thì natri valproat được một số tác giả trong và ngoài nước sử dụng để gây suy giảm sinh sản. Liều thường dùng trên chuột cống là uống 500 mg/kg trong 7 ngày [67]. Tuy rằng natri valproat hay được sử dụng nhưng natri valproat gây suy giảm sinh sản theo cơ chế nào thì lại chưa thực sự rõ ràng, cụ thể:

Về sự ảnh hưởng tới các hormon giới tính: Tác giả Lossius nghiên cứu trên nam giới được điều trị bằng natri valproat thấy có sự giảm nồng độ TES, giảm nồng độ progesteron, tăng nồng độ FSH và giảm chỉ số cơ thể (BMI),

không ảnh hưởng tới SHBG [144]. Tuy nhiên một nghiên cứu khác lại thấy rằng: bệnh nhân được điều trị bằng natri valproat có nồng độ dehydroepiandrosterone (DHEAS) cao hơn đáng kể và nồng độ FSH và LH thấp hơn so với nhóm chứng, trong khi không có sự khác biệt về nồng độ TES, tỷ lệ TES/SHBG hoặc nồng độ androstenedion [145]. Có báo cáo khác lại thấy rằng valproat làm tăng nồng độ androstenedion, không có sự thay đổi về nồng độ các hormon khác (TES, SHBG, LH, FSH, prolactin, inhibin B) trên người [146].

Về ảnh hưởng đến các thông số tinh trùng, có một số giả thuyết về tác động có thể của natri valproat đến các thông số tinh trùng. Valproat có thể làm giảm khả năng vận động của tinh trùng bằng cách can thiệp vào chức năng màng tinh trùng [145]; tăng tỉ lệ bất thường ở đuôi của tinh trùng, tăng tinh trùng có hình thái bất thường, giảm độ di động của tinh trùng có thể nguyên nhân do làm giảm khối lượng, thể tích tinh hoàn [146].

Vì những lý do trên nên có sự khó khăn nhất định khi biện giải kết quả nghiên cứu khi sử dụng valproat gây suy giảm sinh sản.

FLZ là thuốc chống nấm tổng hợp nhóm azo (triazol). Cơ chế chống nấm của FLZ là ức chế cytochrom P₄₅₀ 14-alpha-demethylase, ngăn chặn tổng hợp ergosterol là sterol chủ yếu ở màng tế bào nấm. FLZ có ái lực mạnh với enzym P₄₅₀ của nấm và có ái lực yếu với enzym P₄₅₀ của động vật có vú tuy nhiên cũng đủ gây ra các tương tác [147]. So với ketoconazol (KEZ) thì FLZ ít tác động tới enzym P₄₅₀ động vật có vú hơn, tác dụng chọn lọc hơn với enzym P₄₅₀ của nấm nên tác động trên sinh sản của động vật có vú cũng ít hơn. Những nghiên cứu công bố về tác động trên sinh sản nam của FLZ không nhiều tuy nhiên có báo cáo thấy rằng FLZ làm tăng có ý nghĩa nồng độ các hormon prolactin và FSH khi dùng trên chuột cống trong 30 ngày, điều này gợi ý rằng FLZ cũng ảnh hưởng tới nồng độ TES cũng như khả năng sinh sản. Thực tế, FLZ cũng đã được chứng minh làm suy giảm khả năng sinh sản, có tác dụng kháng androgen;

làm suy giảm thể tích tinh dịch và chất lượng tinh trùng, làm giảm số lượng và khả năng di động của tinh trùng [14].

KEZ cũng có tác dụng ức chế tổng hợp TES ở các tế bào Leydig, chặn sự kích thích của gonadotropin để kích thích tế bào Leydig sản xuất TES, làm giảm nồng độ TES huyết thanh [148]. Do vậy, có thể sử dụng FLZ và KEZ để gây suy giảm sinh sản trong các mô hình dược lý. Tuy nhiên khi gây suy giảm sinh sản bằng KEZ thì KEZ đã gây ra thoái hóa tinh hoàn nghiêm trọng, hoại tử tế bào mầm trong các ống sinh tinh, teo ống, hoại tử và phân hủy các tế bào sinh tinh từ màng đáy [149] nên khả năng phục hồi khả năng sinh sản là thấp nên tác giả không lựa chọn KEZ làm tác nhân gây suy giảm sinh sản mà lựa chọn FLZ.

*** Lý do lựa chọn thỏ là đối tượng nghiên cứu:**

Trong nghiên cứu phát triển thuốc mới, trước khi thuốc được đưa vào thử nghiệm lâm sàng và dùng trên người thì thuốc cần phải được thử nghiệm trên động vật. Trước đây, khi công nghệ nuôi cấy mô, nuôi cấy tế bào chưa phát triển thì việc nghiên cứu độc tính và tác dụng của thuốc trên động vật là bước quan trọng đầu tiên. Hiện nay, với công nghệ nuôi cấy mô và tế bào phát triển, việc sàng lọc tác dụng, độc tính của thuốc đã được thực hiện trên *in vitro* nhiều hơn. Tuy nhiên, việc đánh giá độc tính và tác dụng trên động vật vẫn không thể thiếu. Các loại động vật nghiên cứu hay được sử dụng nhất là chuột cống, chuột nhắt, thỏ, chó...

Trong EU, sau chuột nhắt (59,3%) và chuột cống (17,7%), loài động vật thực nghiệm có vú được các phòng thí nghiệm sử dụng thường xuyên nhất là thỏ (2,78%) [150]. Trong thử nghiệm độc tính, thỏ thường là loài trong phòng thí nghiệm thứ hai bắt buộc bên cạnh chuột nhắt hoặc chuột cống, và là loài được ưu tiên trong thử nghiệm hóa chất liên quan đến kích ứng da cấp tính (Hướng dẫn số 404 của OECD) [151]. Hơn nữa, trình tự gen của thỏ giống với trình tự gen của con người hơn so với của các loài gặm nhấm khác (chuột cống,

chuột nhất...) [71]. Ngoài ra, có rất nhiều lợi thế khiến thỏ trở thành một mô hình động vật rất phù hợp cho các nghiên cứu về sinh sản, có thể kể đến như:

- Thỏ là động vật nhỏ nhất và rẻ tiền nhất trong số các loại động vật có thể lấy tinh được bằng âm đạo giả, cho phép có thể phân tích, đánh giá tinh dịch ở nhiều thời điểm nghiên cứu (so sánh trước sau trong nghiên cứu). Với các nghiên cứu tiến hành trên chuột, chỉ lấy được tinh dịch ở thời điểm cuối và phải giết chuột.

- Các quá trình sinh sản bình thường của thỏ, chu kỳ của sự sinh tinh, sự chín (trưởng thành) của tinh hoàn đều đã được biết rõ.

- Con cái có thể được thụ tinh nhân tạo bằng tinh dịch lấy từ con đực để đánh giá tác động lên khả năng thụ thai, số lượng con trong một lứa đẻ, khả năng sống sót của con cái... hơn nữa, chu kỳ sinh sản có thể dự đoán được (thỏ cái mang thai khoảng 30 ngày).

- Thỏ là động vật khá dễ nuôi và chăm sóc.

Những lợi thế này cho phép đánh giá theo chiều dọc của việc sản xuất tinh trùng (thuốc có ảnh hưởng đến sản xuất tinh trùng hay không?), hình thái của tinh trùng, các chỉ số sinh hóa và khả năng thụ thai.

Tuy nhiên ở Việt Nam hiện nay việc sử dụng thỏ trong nghiên cứu được lý nói chung và nghiên cứu trên sinh sản nói riêng còn rất hạn chế. Chưa có báo cáo được ghi nhận về sử dụng thỏ là đối tượng nghiên cứu trên sinh sản, về sử dụng âm đạo giả để thu tinh dịch thỏ và về thụ tinh nhân tạo cho thỏ cái để đánh giá khả năng thụ thai.

*** Về việc không sử dụng chứng dương trong nghiên cứu:**

Trong thiết kế nghiên cứu được lý, nhóm đối chứng dương thường được sử dụng. Chứng dương lựa chọn phải là chất hoặc chế phẩm có tác dụng được lý rõ ràng [152], trong trường hợp này là tăng cường khả năng sinh sản thông qua tăng cường số lượng và chất lượng tinh trùng một cách rõ ràng, được thừa nhận rộng rãi. Về mặt sản xuất và cung ứng: sản phẩm đó phải được sản xuất

theo quy trình và dây chuyền đạt chuẩn; theo một tiêu chuẩn chất lượng nhất định đã được công bố. Tuy nhiên việc sử dụng nhóm đối chứng dương không phải là bắt buộc trong nghiên cứu dược lý. Trong nghiên cứu này, đã không lựa chọn được chất hay sản phẩm có tác dụng tương tự thỏa mãn điều kiện nêu trên nên đã không có nhóm đối chứng dương trong thử nghiệm đánh giá tác dụng trên khả năng sinh sản của viên nang TXCB. Trên thực tế, có nhiều nghiên cứu đã công bố không sử dụng nhóm đối chứng dương khi thiết kế nghiên cứu [67], [153], [154].

*** Thời gian dùng thuốc nghiên cứu:**

Chu kỳ của sự sinh tinh có ý nghĩa quan trọng trong việc thiết kế các thử nghiệm để nghiên cứu tác động của một tác nhân lên hệ thống sinh sản nam. Có sự khuyến nghị rằng trong các nghiên cứu độc tính bán trường diễn, hay thử nghiệm khả năng sinh sản, sự tiếp xúc với chất thử nghiệm nên duy trì ít nhất trong 1 chu kỳ trước khi đánh giá bởi các thông số nghiên cứu. Khoảng thời gian này là đủ để tác nhân thử nghiệm tích lũy trong các mô, phát huy tác dụng và tạo ra những thay đổi trong tinh trùng thông qua quá trình xuất tinh. Hiệu quả tối đa sẽ được tạo ra tại thời điểm này và các tổn thương mô học cũng sẽ được nhìn thấy tối đa. Ngoài ra, thời gian uống thuốc hoặc tiếp xúc với tác nhân nghiên cứu tùy theo mục đích của nghiên cứu. Vì thời gian cho một chu kỳ sinh tinh ở thỏ là khoảng 7- 8 tuần, nên thời gian sử dụng thuốc (hoặc tiếp xúc với tác nhân nghiên cứu) để đánh giá tác dụng của các chất ngoại sinh tối thiểu là 7 tuần (khoảng 1 chu kỳ sinh tinh); thời gian dùng thuốc có thể dài hơn tùy thuộc vào tác dụng của thuốc và mục tiêu nghiên cứu.

Một số nghiên cứu được công bố cho thấy, thời gian dùng thuốc thường từ 7- 12 tuần:

Zakaria và cộng sự nghiên cứu ảnh hưởng của tamoxifen và fadrozol lên các chỉ số sinh sản ở thỏ, thuốc nghiên cứu được dùng trong 60 ngày (khoảng 7- 8 tuần) [155].

Ahemen và Orakaanya (2013), nghiên cứu ảnh hưởng đến chất lượng tinh trùng thỏ khi nuôi bằng lá rau muống, thời gian sử dụng thức ăn đến khi đánh giá là 8 tuần [156]. Amao O. A. và Showunmi K. A. (2016), trong nghiên cứu của mình đã đánh giá chất lượng tinh dịch sau 9 tuần [157].

Hoặc cũng có trường hợp thời gian dùng thuốc ngắn hơn như A Walaa H Khalifa nghiên cứu tác dụng của dịch chiết nước cây chà là (*Phoenix dactylifera*) lên đặc điểm tinh dịch thỏ và chỉ số oxi hóa trong máu trên thỏ bị stress bởi nhiệt, thời gian uống thuốc là trong 5 tuần [72].

Căn cứ vào chu kỳ sinh tinh của thỏ, luận án đã lựa chọn thời gian uống chế phẩm nghiên cứu là 60 ngày (khoảng 8 tuần). Thời gian này đủ để có thể đánh giá được tác dụng của TXCB lên sự sinh tinh trên thỏ.

4.2.3.2. Về tác dụng của viên nang TXCB trên mô hình gây suy giảm sinh sản bằng fluconazol

*** Tác dụng trên khối lượng cơ thể và thể trạng chung:**

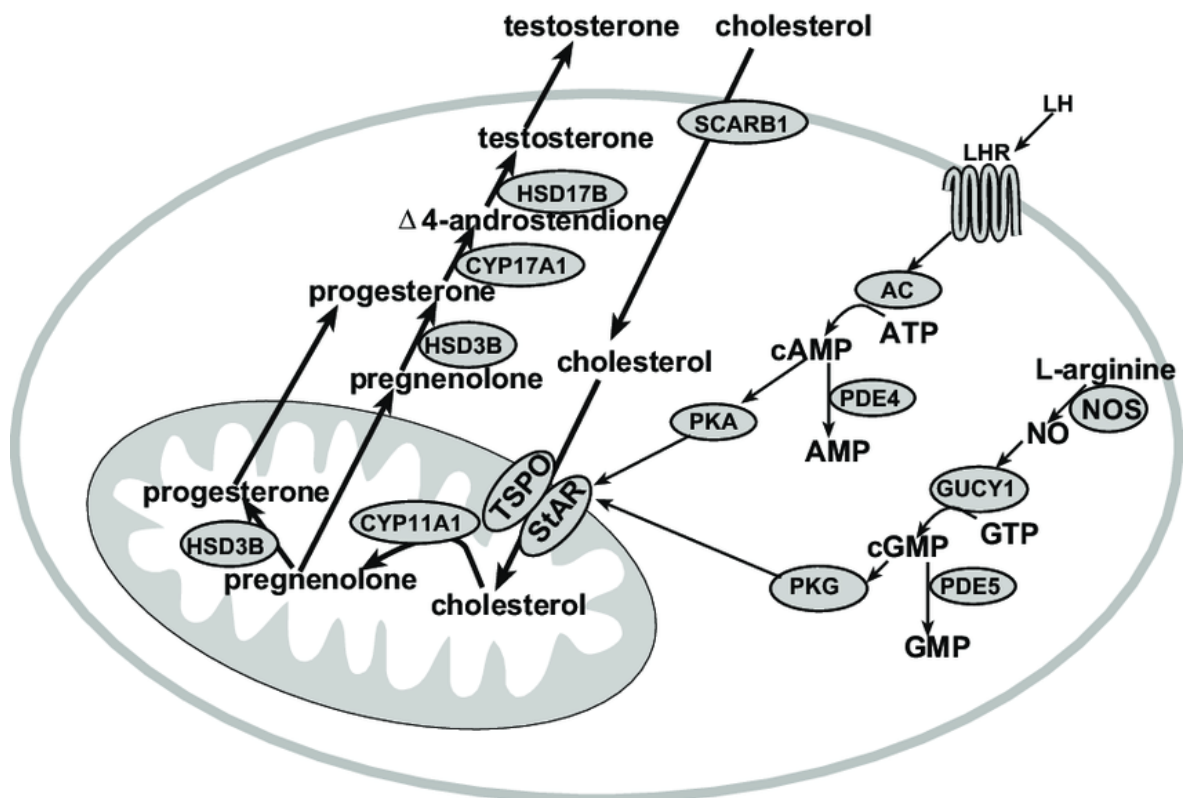
Kết quả nghiên cứu cho thấy: FLZ liều 50 mg/kg/ngày và viên nang TXCB ở 2 mức liều 180 mg/kg/ngày và 360 mg/kg/ngày không ảnh hưởng tới sự tăng trọng lượng bình thường của thỏ, không ảnh hưởng tới thể trạng chung và không thấy có bất kỳ dấu hiệu ngộ độc nào khác được quan sát thấy. Điều này là phù hợp với kết quả của nghiên cứu độc tính bán trường diễn của chế phẩm trên chuột cống trắng trước đó. Theo kết quả này, viên nang TXCB an toàn khi uống liên tục trong 90 ngày.

*** Tác dụng của TXCB lên nồng độ TES huyết thanh:**

- Ở lô mô hình (chỉ uống FLZ), nồng độ TES huyết thanh ở các thời điểm sau 30 ngày và sau 60 ngày đều giảm có ý nghĩa so với thời điểm ban đầu (p lần lượt là 0,002 và 0,020); ngoài ra cũng thấp hơn có ý nghĩa khi so sánh với lô chứng ở cùng thời điểm (p lần lượt là < 0,001 và 0,025). Như vậy FLZ đã làm giảm nồng độ TES huyết thanh khi nghiên cứu trên thỏ. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của tác giả Azza H. El-Medany và cộng sự [102]. FLZ

không gây lên sự oxi hóa trong các tế bào Leydig khi nghiên cứu *in vitro* [158] nên sự giảm nồng độ TES huyết thanh của FLZ có thể được giải thích do sự ức chế sinh tổng hợp TES ở tế bào Leydig; ngoài ra còn làm giảm nồng độ cortisol thông qua việc ức chế các enzym thuộc hệ thống cytochrom P₄₅₀ như: C17-20 lyase, 11- μ -hydroxylase, 17- μ -hydroxylase và steroid aromatase.

Quá trình sinh tổng hợp TES được trình bày trong hình sau:



Hình 4.1. Sơ đồ sinh tổng hợp TES ở tế bào Leydig

Ghi chú: TSPO: translocator protein; StAR: steroidogenic acute regulatory protein; CYP11A1: một enzym của hệ thống cytochrom P₄₅₀ (P450_{scc}); HSD3B: 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases; CYP17A1: 17-hydroxylase/C17-20-lyase; HSD17B: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase; AC: adenylyl cyclase; PKA: protein kinase A.

Nguồn: theo Natasa J. Stojkov và cs (2013) [159]

Cholesterol được vận chuyển từ các nguồn nội bào vào ti thể bởi phức hợp vận chuyển protein đặc biệt bao gồm protein dịch mã (TSPO) và StAR (một protein điều hòa việc vận chuyển tất cả các hormon steroid, cholesterol từ

bên ngoài vào màng trong ti thể). Trên màng trong ti thể, cholesterol được chuyển thành pregnenolon bởi CYP11A1 rồi sau đó thành progesteron bởi HSD3B. Trong tế bào Leydig, sự trưởng thành của progesteron thành androstenedion được xúc tác bởi 17- hydroxylase/C17-20- lyase (CYP17A1) và sau đó chuyển thành TES dưới xúc tác của HSD17B. TES sau đó thoái biến theo 2 con đường: chuyển thành dihydrotestosteron dưới sự xúc tác của 5 α -reductase và chuyển thành estradiol dưới sự xúc tác của aromatase.

- Ở các lô uống FLZ và TXCB, tại các thời điểm sau 30 ngày và sau 60 ngày nồng độ TES huyết thanh đều cao hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với lô chỉ uống FLZ với cùng thời điểm. Ngoài ra, với liều TXCB 180 mg/kg, ở thời điểm 30 ngày nồng độ TES giảm so với thời điểm ban đầu ($p = 0,015$) và thấp hơn có ý nghĩa so với lô chứng ($p = 0,017$) nhưng ở thời điểm 60 ngày, nồng độ TES huyết thanh đã tăng và cao hơn có ý nghĩa so với thời điểm ban đầu ($p = 0,006$). Với TXCB liều 360 mg/kg, ở thời điểm 30 ngày nồng độ TES khác nhau không ý nghĩa ($p > 0,05$) so với thời điểm ban đầu và lô chứng cùng thời điểm; ở thời điểm 60 ngày, nồng độ TES tăng và cao hơn có ý nghĩa so với thời điểm ban đầu và lô chứng cùng thời điểm. Như vậy TXCB đã làm tăng nồng độ TES huyết thanh phụ thuộc liều ở thỏ gây suy giảm bằng FLZ.

Vì TES chủ yếu được sản xuất từ tinh hoàn ($> 95\%$), một phần nhỏ được sản xuất từ tuyến thượng thận (khoảng 4%) nên có thể nhận xét rằng một chế phẩm làm tăng nồng độ TES trong máu có thể tác động dựa theo 2 cơ chế chính: (1) làm tăng quá trình tổng hợp TES ở tinh hoàn và (2) bản thân chế phẩm nghiên cứu đóng vai trò là TES ngoại sinh. Nhận định này là có cơ sở đối với trường hợp tăng nồng độ TES huyết thanh có ý nghĩa ở các lô dùng TXCB.

Về cơ chế thứ nhất: Vì sinh tổng hợp TES ở tinh hoàn là một quá trình phức tạp, có sự tham gia của nhiều cơ chất và nhiều enzym nên chế phẩm nghiên cứu có thể tác động vào nhiều khâu của quá trình này.

+ Tác động lên trục dưới đồi- tuyến yên- tinh hoàn thông qua LH:

LH được giải phóng từ tuyến yên dưới tác động của GnRH. LH thông qua LH receptor (LHR) làm hoạt hóa AC để chuyển ATP thành AMP vòng (cAMP) từ đó làm tăng cholesterol được chuyển vào màng trong ti thể thông qua StAR [160] dẫn đến tăng tổng hợp TES. Trong thành phần của TXCB có chứa ba kích, polysaccharid từ dịch chiết nước của dược liệu này đã được Zhu Zhu và cs (2017) chứng minh là kích thích tổng hợp và giải phóng GnRH từ vùng dưới đồi, có thể bằng cách thông qua con đường Kiss1/GPR54 [93]. Như vậy cũng có thể đây là một trong những cơ chế làm tăng nồng độ TES huyết thanh của chế phẩm TXCB.

+ Tác động bằng cách chống oxy hóa; tác động lên số lượng tế bào Leydig, đường kính ống sinh tinh...

Nói chung, sự tích tụ của các gốc tự do, đặc biệt là các loại gốc tự do oxy hóa (ROS) trong các tế bào sống vượt quá khả năng chống oxy hóa của các chất chống oxy hóa dẫn đến sự hình thành trạng thái stress oxy hóa. Người ta biết rằng trạng thái stress oxy hóa làm giảm chức năng của tế bào, có thể làm ảnh hưởng tới chức năng chính của những phân tử sinh học (ví dụ như protein) [161]. Đặc biệt, trạng thái stress oxy hóa như vậy, khi xảy ra trong các tế bào Leydig, có thể làm giảm tổng hợp TES và do đó làm giảm nồng độ TES huyết thanh. Ngoài ra, stress oxy hóa còn làm giảm hoạt tính cả những chất chống oxy hóa có nguồn gốc enzym và không có nguồn gốc enzym trong các tế bào Leydig. Faraji Tayebe và các cs (2019) thấy rằng, các chất làm giảm hoạt tính của các enzym chống oxy hóa có khả năng làm tổn thương tinh hoàn, làm giảm bề dày thành ống sinh tinh, giảm đường kính ống sinh tinh và làm giảm nồng độ TES huyết thanh, đồng thời các chất có hoạt tính chống oxy hóa đã được chứng minh làm hồi phục bề dày thành ống sinh tinh, đường kính ống sinh tinh dẫn đến phục hồi được nồng độ TES huyết thanh [162].

Các chất oxy hóa còn có thể gây lên stress oxy hóa ở lưới nội chất trong tinh hoàn, bao gồm việc làm lưới nội chất bị giãn ra, như là một thay đổi bệnh

lý rõ rệt trong siêu cấu trúc của tế bào Leydig dẫn đến giảm tổng hợp TES [163]. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy: ở các lô uống TXCB nồng độ MDA tinh dịch và huyết thanh thấp hơn đáng kể so với lô mô hình, như vậy TXCB đã thể hiện hoạt tính chống oxy hóa. Hơn nữa, trong thành phần của TXCB có 8/8 dược liệu đã được chứng minh có tác dụng chống oxy hóa, trong đó có một số dược liệu có hoạt tính chống oxy hóa mạnh. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Mun-Seog Chang và các cs (2008), dịch chiết nước của ba kích thể hiện tác dụng bảo vệ tế bào TM3 (tế bào Leydig chuột) dưới tác động gây tổn thương của các tác nhân oxy hóa [94]. Do vậy đây cũng có thể là một cơ chế làm tăng nồng độ TES huyết thanh của viên nang TXCB.

+ Tác dụng trên các phân tử sinh học có hoạt tính trong quá trình tổng hợp TES: Như đã đề cập ở trên, sinh tổng hợp TES là một quá trình phức tạp với các enzym chủ chốt là StAR, P450_{scc}, HSD3B, CYP17A1 và HSD17B. Thuốc hoặc những chất ngoại sinh khác có thể tác động vào các enzym này để thay đổi quá trình sinh tổng hợp TES. Trong nghiên cứu này chưa có đánh giá trên các phân tử sinh học trên nên chưa có cơ sở để kết luận TXCB làm tăng nồng độ TES theo cơ chế này.

+ Ngoài ra, theo kết quả đánh giá trên chức năng cương dương, TXCB làm cải thiện khả năng cương dương trên chuột cống gây ĐTD, tác dụng này có thể do làm tăng NO nên sẽ tác động làm tăng vận chuyển cholesterol vào màng trong ti thể thông qua PKG (protein kinase G) và StAR điều này sẽ góp phần làm tăng tổng hợp TES tại tinh hoàn. Như vậy đây cũng có thể là nguyên nhân làm tăng TES huyết thanh ở các lô uống TXCB.

Trong nghiên cứu này chưa định lượng hoạt độ các enzym 5 α - reductase, aromatase hay nồng độ dihydrotestosteron và estradiol nên chưa có cơ sở xem xét thuốc nghiên cứu có ảnh hưởng đến sự thoái biến của TES hay không. Tức có liên quan đến tác dụng ức chế các enzym 5 α - reductase và aromatase hay không.

Về cơ chế thứ hai: TXCB đóng vai trò như một TES ngoại sinh.

Một số tác giả đã chỉ ra rằng trong lộc nhung có chứa các hormon giới tính như: 17 α - ethinylestradiol, 17 α - estradiol, 19- nortestosteron, testosteron, androsteron... [164]. Tác giả Lu Chun-mei và cs (2012) khi định lượng các hormon giới tính trong lộc nhung bằng sắc ký lỏng khối phổ đã thấy lộc nhung có chứa TES với hàm lượng từ 0,2 μ g/kg đến 1,2 μ g/kg [165].

Trong công thức bào chế của viên nang TXCB, khối lượng bột cao khô lộc nhung là 15 mg (trong tổng số 400 mg khối lượng của cao dược liệu trong viên nang). Tuy tỉ lệ này không cao và chưa có nghiên cứu để định lượng TES trong chế phẩm nhưng có cơ sở khi cho rằng TXCB là một TES ngoại sinh.

Ngoài ra, lộc nhung là một trong 4 dược liệu đứng đầu bảng theo quan điểm của YHCT (sâm, nhung, quế, phụ). Với tác dụng chống lão hóa, tăng cường thể lực, bổ sung năng lượng cho cơ thể, cao khô lộc nhung trong viên nang TXCB làm bồi bổ sức khỏe, tăng cường thể lực, nâng cao sức khỏe toàn thân từ đó có thể là nguyên nhân có lợi cho chức năng sinh sản, sinh dục dục của viên nang TXCB.

*** Tác dụng trên thời gian tiếp cận:**

Thời gian tiếp cận được coi là dấu hiệu của ham muốn tình dục (libido). Thời gian tiếp cận có thể được tính từ khi đưa con cái vào chuồng con đực tới khi con đực xuất tinh [166]. Tuy nhiên với cách tính này sẽ có thể chưa hoàn toàn chính xác bởi sự xuất tinh của thỏ đực còn phụ thuộc nhiều vào thao tác, kỹ thuật lấy tinh của nghiên cứu viên. Nếu nghiên cứu viên thực hiện kỹ thuật thành thạo, thời gian lấy tinh sẽ ngắn còn nghiên cứu viên thực hiện chưa thành thạo hay có sự cố trong quá trình lấy tinh thì thời gian lấy tinh sẽ dài. Do đó đối với cùng một động vật cũng có thể có sự khác nhau nhiều về thời gian tiếp cận. Vì vậy, tác giả đã lựa chọn cách tính thời gian tiếp cận là khoảng thời gian tính từ khi đưa thỏ cái vào chuồng thỏ đực tới khi con đực nhảy lên lưng con cái để

thực hiện hành vi giao phối. Một số tác giả cũng đã dùng cách này để tính thời gian tiếp cận của thỏ đực [72], [155].

Hiện tại, các cơ chế của việc mất hoặc thay đổi ham muốn tình dục vẫn chưa được biết đến rõ ràng. Tuy nhiên, có sự kết hợp phức tạp của các yếu tố như: yếu tố sinh lý, tâm lý và xã hội góp phần vào ham muốn tình dục và nồng độ androgen có ảnh hưởng quan trọng nhất đối với ham muốn tình dục. Việc giảm ham muốn tình dục có thể chỉ ra sự thiếu hụt androgen phát sinh từ rối loạn chức năng tuyến yên hoặc tinh hoàn. Đồng thời khi có sự suy giảm nồng độ TES huyết thanh thì chắc chắn sẽ có sự suy giảm ham muốn tình dục [167]. Ngoài ra, hoạt động tình dục của nam giới phụ thuộc vào hệ thống dopaminergic, sự thiếu hụt dopamin cũng có thể làm giảm ham muốn tình dục [168].

Ở lô mô hình (chỉ uống FLZ) tại các thời điểm 30 ngày và 60 ngày có thời gian tiếp cận cao hơn đáng kể so với lô chứng và tăng cao hơn đáng kể so với thời điểm ban đầu (so sánh trong cùng lô). Như vậy FLZ liều 50 mg/kg đã làm giảm ham muốn tình dục. Cơ chế của việc giảm ham muốn tình dục của FLZ có thể được giải thích là do FLZ có tác dụng kháng androgen, ức chế tổng hợp TES ở tế bào Leydig dẫn đến làm giảm nồng độ TES huyết thanh.

Ở các lô uống chế phẩm nghiên cứu (uống FLZ và uống chế phẩm nghiên cứu), thời gian tiếp cận có sự thay đổi không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và thấp hơn đáng kể so với lô mô hình chỉ uống FLZ. Như vậy, viên nang TXCB đã làm giảm tác dụng gây tăng thời gian tiếp cận của FLZ hay viên nang TXCB có tác dụng chống lại sự suy giảm ham muốn tình dục gây ra bởi FLZ. Điều này cũng có thể được giải thích thông qua việc TXCB làm tăng nồng độ TES huyết tương.

*** Tác dụng trên các thông số về số lượng và chất lượng tinh trùng:**

Quá trình sinh tinh là một chuỗi các sự kiện phức tạp và có trật tự, trước hết phụ thuộc vào sự hình thành và phát triển của tinh hoàn trong thời kỳ bào

thai. Từ thời kỳ bào thai đến 6 tháng tuổi, các chức năng sinh sản nam dần hình thành bằng cách biệt hóa thành tinh nguyên bào. Đến tuổi dậy thì các tinh nguyên bào bắt đầu nhiều lần phân chia tế bào và biệt hóa để tạo ra các tinh bào. Tinh trùng được sinh ra từ các tinh bào trong các ống sinh tinh, sau đó chúng di chuyển vào mào tinh để trải qua giai đoạn trưởng thành cuối cùng trước khi xuất tinh [169]. Các tinh nguyên bào, tinh bào thường xuyên ở trong trạng thái phân chia tế bào nên chúng rất nhạy cảm với những thay đổi về vật lý, hóa học và sinh học ở bên trong cũng như ở bên ngoài cơ thể.

Sự sinh tinh được kiểm soát bởi hệ thống hormon của trục dưới đồi-tuyến yên- tuyến sinh dục (HPG). Ở nam giới, sự sản xuất TES của tinh hoàn và sự sinh tinh được điều khiển bởi hai hormon của tuyến yên là LH và FSH. Tế bào đích trên tinh hoàn của LH là các tế bào Leydig có mặt ở các khoảng kẽ và của FSH là các tế bào Sertoli có mặt ở các ống sinh tinh. LH kích thích tế bào Leydig sản xuất TES và FSH kích thích các tế bào Sertoli, kết hợp với TES, sản xuất các phân tử điều hòa và các chất dinh dưỡng cần thiết cho việc duy trì sự sinh tinh trùng. Do đó, cả TES và FSH điều hòa sinh tinh trùng gián tiếp thông qua các tế bào Sertoli [170]. Tuy nhiên nồng độ TES trong tinh hoàn cao không phải là điều kiện tiên quyết để hoàn thành quá trình sinh tinh mặc dù nó rõ ràng làm tăng sản xuất tinh trùng và khả năng sinh sản [170].

Các thông số về số lượng và chất lượng tinh trùng (tinh dịch đồ) cung cấp những thông số có ý nghĩa trong việc chẩn đoán và điều trị vô sinh hiếm muộn nam. Ngoài ra, tinh dịch đồ còn giúp chẩn đoán xác định tình trạng xuất tinh ra máu, viêm nhiễm đường dẫn tinh, đánh giá hiệu quả của phẫu thuật triệt sản thắt ống dẫn tinh cũng như đánh giá hiệu quả của phẫu thuật phục hồi lưu thông đường dẫn tinh. Các bất thường về số lượng tinh trùng, độ di động và hình thái tinh trùng là nguyên nhân chủ yếu của vô sinh nam, chiếm tỉ lệ trên 90% vô sinh nam [34]. Trong đó bất thường về độ di động của tinh trùng chiếm tỷ lệ cao nhất, có thể tới 47,8% [171].

- Các thông số về số lượng tinh trùng bao gồm: thể tích tinh dịch, mật độ tinh trùng và tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh. Qua các kết quả nghiên cứu trên thấy rằng:

+ Ở lô chỉ dùng FLZ, thể tích tinh dịch ở thời điểm 30 ngày và 60 ngày thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với thời điểm ban đầu và so với lô chứng cùng thời điểm. Mật độ tinh trùng ở thời điểm sau 30 ngày và sau 60 này đều giảm có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với thời điểm ban đầu; đồng thời cũng thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với lô chứng. Tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh tại các thời điểm 30 ngày và 60 ngày thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với thời điểm ban đầu đồng thời cũng thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với lô chứng ở cùng thời điểm. Như vậy, FLZ liều 50 mg/kg đã làm giảm thể tích tinh dịch, giảm mật độ tinh trùng và giảm tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh khi nghiên cứu trên thỏ. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của tác giả Azza H. El-Medany và cs [102].

Tinh trùng ít hoặc ít tinh dịch có thể do nguyên nhân tổn thương tinh hoàn hoặc do tác động của các hormon kích thích sự sinh tinh trong đó có TES [172]. Ở nghiên cứu này, việc tổn thương tinh hoàn do các nguyên nhân cơ học, nhiệt, bức xạ... đã được loại bỏ. Hơn nữa FLZ đã làm giảm nồng độ TES huyết thanh do đó đây có thể là cơ chế giải thích cho việc làm giảm thể tích tinh dịch, giảm mật độ tinh trùng và giảm tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh của FLZ.

+ Ở các lô dùng FLZ và TXCB:

Thể tích tinh dịch không có sự giảm có ý nghĩa như với lô chỉ dùng FLZ, hơn nữa với lô dùng TXCB liều 360 mg/kg (lô trị 2) ở thời điểm sau 60 ngày thể tích tinh dịch còn tăng cao hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với lô chứng.

Mật độ tinh trùng tại thời điểm 30 ngày giảm có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với thời điểm ban đầu tuy nhiên khi so sánh với lô chứng ở cùng thời điểm thì

sự suy giảm này không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Mặt khác, sau đó mật độ tinh trùng có xu hướng tăng lên ở thời điểm 60 ngày.

Tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh ở lô dùng TXCB liều 180 mg/kg tại thời điểm 30 ngày giảm có ý nghĩa so với thời điểm ban đầu ($p = 0,006$) và thấp hơn đáng kể so với lô chứng ($p = 0,013$). Tuy nhiên ở thời điểm 60 ngày lại tăng rõ rệt so với thời điểm 30 ngày ($p = 0,002$), cao hơn có ý nghĩa so với lô chỉ dùng FLZ ($p = 0,004$). Với liều 360 mg/kg, tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh tại thời điểm 30 ngày giảm không có ý nghĩa so với thời điểm ban đầu ($p = 0,093$) đồng thời cũng thấp hơn không có ý nghĩa so với lô chứng ($p = 0,152$) nhưng cao hơn có ý nghĩa so với lô mô hình ($p = 0,004$). Tại thời điểm 60 ngày, tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh tăng cao hơn đáng kể so với thời điểm 30 ngày ($p = 0,001$), cao hơn có ý nghĩa so với lô chỉ dùng FLZ ($p = 0,001$) và lô TXCB liều 180 mg/kg ($p = 0,041$) đồng thời không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng ($p = 0,163$).

Như vậy TXCB đã làm tăng thể tích tinh dịch, tăng mật độ tinh trùng, tăng tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh khi gây suy giảm bởi FLZ và tác dụng này có xu hướng phụ thuộc liều. Điều này được chứng minh bởi hình ảnh vi thể tinh hoàn. Ở các lô chứng và lô dùng TXCB liều 180 mg/kg có hình ảnh tinh hoàn bình thường; ở lô chỉ dùng FLZ có hình ảnh của sự suy giảm sinh tinh còn ở lô dùng TXCB liều 360 mg/kg có hình ảnh tăng sản tinh trùng.

Do sự sinh tinh là một quá trình từ tinh nguyên bào, tinh bào sơ cấp, tinh bào thứ cấp, tinh tử rồi đến tinh trùng. Ở thỏ, quá trình này có thể từ 52- 60 ngày, do đó khi thuốc tác động vào quá trình sinh tinh có thể gây ra biểu hiện sớm lên đặc điểm tinh dịch (biểu hiện sự thay đổi tại thời điểm 30 ngày) khi tác động vào giai đoạn cuối của quá trình sinh tinh nhưng cũng có thể chưa gây ra biểu hiện ngay lập tức nếu tác động vào giai đoạn đầu của quá trình sinh tinh. Vì vậy, có thể TXCB đã tác động đến nhiều giai đoạn của quá trình sinh tinh.

Một thuốc điều trị có thể ảnh hưởng đến sự sản xuất tinh trùng bằng cách:

(1): Can thiệp vào chức năng ngoại tiết của tinh hoàn bằng cách thay đổi các tế bào mầm và/hoặc các tế bào Sertoli. Tế bào Sertoli đóng vai trò hỗ trợ cho sự sống sót và biệt hóa của tế bào mầm. Khi các tế bào Sertoli được mở rộng cao hơn, to hơn về kích thước và giàu chất dinh dưỡng hơn sẽ là dấu hiệu cho việc tăng sự sinh tinh. Đó là phản ứng bình thường của các tế bào Sertoli khi chúng sẵn sàng cung cấp bổ sung dinh dưỡng cho số lượng lớn tinh trùng.

(2): Can thiệp vào chức năng nội tiết của tinh hoàn bằng cách thay đổi tế bào Leydig hoặc phá vỡ hệ thống điều hòa hormon (của trục dưới đồi- tuyến yên), hoặc việc làm thay đổi nồng độ TES cũng có thể ảnh hưởng đến việc sản xuất tinh trùng [14]. Ngoài ra việc tăng trọng lượng tinh hoàn, tăng đường kính ống sinh tinh cũng có lợi cho việc sinh tinh. Việc có lợi cho sự sinh tinh này cũng sẽ thuộc 2 cơ chế trên bởi việc tăng trọng lượng tinh hoàn, tăng đường kính ống sinh tinh chủ yếu là do việc tăng kích thước hoặc số lượng của các tế bào Sertoli và tế bào Leydig.

Trong nghiên cứu này, ở lô dùng TXCB liều 360 mg/kg thấy có hình ảnh tăng sinh sản tinh trùng: các ống sinh tinh khá đều nhau, các ống sinh tinh trong lòng có chứa nhiều tinh trùng có đuôi rõ. Thành ống sinh tinh có đầy đủ các tế bào dòng tinh: tế bào Sertoli, tinh nguyên bào, tinh bào 1, tinh bào 2 và tiền tinh trùng. Rải rác một số nhân chia. Mô đệm các mao mạch máu sung huyết.

Ngoài ra, TXCB đã làm tăng nồng độ TES huyết thanh điều này có thể cũng có lợi cho việc sản xuất tinh trùng, làm tăng số lượng tinh trùng. TES được coi là điều kiện tiên quyết cho sự sản xuất và trưởng thành của tinh trùng, các đặc tính và chức năng sinh dục thứ cấp. TES kích hoạt các receptor của androgen (AR) trong các tế bào Sertoli để bắt đầu các đáp ứng chức năng cần thiết cho sự sinh tinh trùng [173]. Mặt khác TES phối hợp với FSH để kích thích tăng sinh tế bào Sertoli và tạo ra các phân tử tín hiệu và chất dinh dưỡng để hỗ trợ sự trưởng thành của tinh trùng.

Như vậy có thể TXCB đã làm tăng sản xuất tinh trùng theo cả hai cơ chế trên. Một số nghiên cứu đã công bố về các dược liệu trong TXCB cũng đã cho thấy giả thuyết này: nghiên cứu của Chauhan NS và cs (2008) cho thấy dịch chiết ethanol của sâm cau liều 100 mg/kg làm tăng khả năng sinh tinh thông qua cả 2 cơ chế trên. Dịch chiết sâm cau đã làm tăng kích thước ống sinh tinh, làm tăng số lượng tinh bào thứ cấp và tinh tử. Đồng thời nhóm động vật được điều trị bằng dịch chiết sâm cau cho thấy sự tăng trọng lượng của tinh hoàn và thay đổi mô học của tinh hoàn có lợi cho sự sinh tinh [174]. Trên hình ảnh mô học thấy một số lượng lớn các tế bào khác nhau ở các giai đoạn sinh tinh khác nhau. Trong mỗi ống sinh tinh thấy có số lượng tinh trùng khổng lồ. Các tế bào Sertoli to hơn về kích thước và giàu chất dinh dưỡng hơn được chứng minh bằng lượng cao của tế bào chất. Hầu như tất cả các tế bào Leydig cho thấy phì đại với nhân mở rộng và tế bào chất nhuộm màu tối. Sự gia tăng về thể tích của tế bào và nhân được gợi ý mạnh mẽ cho sự tổng hợp steroid dưới ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp của thuốc. Hầu như tất cả các ống dẫn tinh chứa rất nhiều tinh trùng. Trong một số ống, các tinh tử được tìm thấy rải rác giữa các tinh trùng.

- Về pH tinh dịch:

Tinh trùng là tế bào duy nhất của con người có thể thực hiện chức năng ngoài cơ thể nam giới. Vi môi trường của tinh trùng là tinh dịch có ý nghĩa rất lớn tới sự sống và chức năng của tinh trùng. Tinh dịch là một hỗn hợp được tiết ra từ tinh hoàn, mào tinh hoàn (60%) và các tuyến sinh dục phụ (tuyến tiền liệt- 30%, các tuyến hành niệu đạo- 10%). Tinh dịch có chứa $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, các ion vô cơ, các acid hữu cơ, đường, lipid, acid amin, steroid, polyamin, các base nitơ và các protein. Do đó, tinh dịch có khả năng đệm rất cao, cao hơn so với hầu hết các chất lỏng khác của cơ thể. Do đó, độ pH của tinh dịch có thể đóng một vai trò quan trọng không chỉ trong việc duy trì khả năng sống và chất lượng của tinh trùng, mà còn trong việc đảm bảo khả năng thụ tinh. Sự suy giảm của kênh

Na^+/K^+ -ATPase và pH acid làm giảm độ di động của tinh trùng và chức năng của tinh trùng, đó cũng là một trong những nguyên nhân gây vô sinh, thực tế ở những bệnh nhân có số lượng tinh trùng ít (oligospermia) và/hoặc tinh trùng yếu (asthenospermia) đều có pH tinh dịch nhỏ hơn 7,2 [175]. Qua các kết quả nghiên cứu ở trên thì FLZ và TXCB không ảnh hưởng tới pH tinh dịch.

- *Các thông số về độ di động của tinh trùng gồm:* % tinh trùng di động tiến tới, % tinh trùng di động không tiến tới và % tinh trùng không di động.

Nghiên cứu đã thấy rằng, ty thể là bộ phận của tinh trùng có vai trò chính đối với sự cân bằng nội môi tế bào và khả năng vận động của tinh trùng, ngoài ra ty thể còn có vai trò cho quá trình tăng hoạt động của tinh trùng, phản ứng acrosome và quá trình thụ tinh [176]. Rối loạn chức năng ty thể tinh trùng cũng có liên quan đến cơ chế bệnh sinh của stress oxy hóa trong tinh dịch, là nguyên nhân cơ bản của tinh trùng yếu vô căn đồng thời là một yếu tố chính gây ra nhiều trường hợp của vô sinh nam [177]. Hiện nay, cơ chế của việc cung cấp năng lượng cho sự vận động của tinh trùng vẫn chưa được biết rõ hoàn toàn, có thể thông qua con đường glycolysis hóa hoặc qua quá trình phosphoryl oxy hóa trong ty thể hoặc kết hợp cả hai con đường [178]. Cụ thể, Zhu và các cs gần đây đã chỉ ra rằng phosphoryl oxy hóa ty thể được kích hoạt để tạo ATP trong điều kiện glucose thấp. Tác giả đã ủ tinh trùng lợn với các mức nồng độ glucose khác nhau và họ thấy rằng sự di động tiến tới của tinh trùng đã tăng đáng kể khi giảm nồng độ glucose trong môi trường ủ. Đồng thời tác giả cũng chỉ ra rằng, với sự có mặt của chất ức chế ty lập thể như d-cloramphenicol đã làm tổng hợp protein ở ty lập thể, hoạt động của ty thể và hàm lượng ATP đã bị giảm, và do đó khả năng vận động của tinh trùng giảm [179]. Như vậy sự vận động của tinh trùng phụ thuộc vào chất nền có sẵn và sự kích hoạt của các con đường sinh hóa [180]. Ty thể có vai trò chính trong chuyển hóa của tinh trùng và sản xuất năng lượng cho tinh trùng, tuy nhiên chúng là tác nhân tạo ra ROS, vì chúng chuyển khoảng 1- 2% oxy tiêu thụ thành anion superoxyd (chủ yếu ở

phức hợp I và phức hợp III của ty thể) [181]. Sự mất cân bằng giữa sản xuất ROS và các cơ chế chống oxy hóa có thể vô cùng có hại cho tinh trùng. Những tế bào này đặc biệt dễ bị tổn thương bởi stress oxy hóa vì chúng không thể phục hồi những tổn thương gây ra bởi stress oxy hóa do thiếu các enzym sửa chữa của bào tương [182]. Một số thông số có thể được dùng để đánh giá chức năng của ty thể như: hoạt tính của ty thể, cường độ điện thế màng ty thể (MMP-mitochondrial membrane potential) và nồng độ của calci trong ty thể. Hiện nay, việc sử dụng các đầu dò huỳnh quang để phát hiện các thay đổi trong màng ty thể là công cụ phổ biến nhất để đánh giá chức năng của ty thể [180].

Các kết quả của nghiên cứu này cho thấy, FLZ liều 50 mg/kg làm giảm tỉ lệ tinh trùng di động và tỉ lệ tinh trùng di động tiến tới do đó làm tăng tỉ lệ tinh trùng không di động khi nghiên cứu trên thỏ. Ngoài ra, TXCB liều 180 mg/kg và 360 mg/kg đã làm tăng tỉ lệ tinh trùng di động, tỉ lệ tinh trùng di động tiến tới và giảm tỉ lệ tinh trùng không di động trên thỏ bị suy giảm bởi FLZ. Đồng thời, FLZ và TXCB đều không ảnh hưởng tới tỉ lệ tinh trùng di động không tiến tới. Trong nghiên cứu này, tác giả không đánh giá chức năng của ty thể nên chưa thể khẳng định chắc chắn về cơ chế phân tử của TXCB trên sự tăng sự di động của tinh trùng, tuy nhiên tác dụng này có thể được giải thích thông qua cơ chế chống oxy hóa của TXCB. Như đã mô tả ở trên, ROS thường được tạo ra trong quá trình phosphoryl oxy hóa ty thể nhưng nồng độ cao của các hợp chất này có thể làm giảm hoạt động của ty thể và do đó làm giảm khả năng vận động của tinh trùng. Để đánh giá khả năng chống oxy hóa *in vivo* có thể dựa vào nồng độ các chất chống oxy hóa của cơ thể (glutathion (GSH), glutathion peroxidase (GSHPx), glutathion-S-transferase (GSt), catalase (CAT)...) hay sự có mặt của nồng độ các chất tạo ra do ROS (như malondialdehyd) [183]. Malondialdehyd (MDA) là một trong những sản phẩm cuối cùng trong quá trình peroxyd hóa lipid, là một sản phẩm của các gốc oxy tự do. Việc đánh giá nồng độ của MDA cho phép gián tiếp đánh giá sự có mặt

hay hoạt động của các ROS. Khi nồng độ MDA càng cao thì sự có mặt hay hoạt tính của các ROS càng lớn và ngược lại. Heidar Tavilani và cs đã thấy rằng sự peroxyd hóa lipid có ảnh hưởng xấu đến chất lượng tinh dịch và nồng độ MDA trong tinh dịch ở những bệnh nhân tinh trùng yếu cao hơn đáng kể so với người có tinh dịch đồ bình thường [184]. Trong nghiên cứu này, nồng độ MDA trong tinh dịch và trong huyết thanh của các lô dùng TXCB thấp hơn đáng kể so với lô chứng và lô mô hình. Kết quả này đã khẳng định hoạt tính chống oxi hóa của TXCB và có thể là lý do cho việc tăng khả năng di động trên tinh trùng của TXCB. Đồng thời, do nồng độ MDA trong huyết thanh và trong tinh dịch giảm ở ngay thời điểm 30 ngày nên có thể hoạt tính chống oxi hóa của TXCB đã tác động tới khả năng di động của tinh trùng. Tuy nhiên với sự sinh tinh, tác động của TXCB chưa gây lên biểu hiện trên số lượng tinh trùng, điều này có thể là lý do giải thích tại sao ở thời điểm 30 ngày có sự giảm mật độ tinh trùng và tổng số tinh trùng mà lại tăng tỉ lệ tinh trùng di động và tỉ lệ tinh trùng di động tiến tới.

- Về tỉ lệ tinh trùng chết và hình thái tinh trùng:

Tỉ lệ sống- chết và hình thái của tinh trùng là một trong những yếu tố tác động, ảnh hưởng tới khả năng thụ thai. Các nghiên cứu được công bố đã chỉ ra rằng nam giới có tỉ lệ tinh trùng có hình thái bất thường cao thì có khả năng thụ thai thấp, điều này đúng cả đối với thụ thai tự nhiên và hỗ trợ sinh sản [185]. Tương tự như vậy, người ta đã phát hiện ra rằng những người đàn ông là một phần của cặp vợ chồng hiếm muộn có tỷ lệ tinh trùng bình thường thấp hơn so với những người đàn ông có khả năng sinh sản bình thường [186]. Trong quá trình sinh tinh, tinh trùng có thể chịu tác động của nhiều yếu tố, trong đó ROS là một yếu tố cần quan tâm. ROS có thể tấn công các liên kết không bão hòa của lipid màng trong quá trình tự xúc tác, hình thành các peroxyd, rượu và aldehyd như là sản phẩm của phản ứng. Do đó, sự gia tăng của các gốc tự do trong các tế bào có thể gây ra sự peroxyd hóa lipid bằng cách phân hủy oxy hóa

các acid béo không bão hòa trong màng tế bào. Rõ ràng, peroxyd hóa lipid tinh trùng làm phá hủy cấu trúc của lipid trong màng của tinh trùng, và nó có liên quan đến việc mất ATP nội bào nhanh chóng dẫn đến tổn thương axonem, giảm khả năng sống của tinh trùng và tăng các khiếm khuyết hình thái, và thậm chí nó có thể ức chế hoàn toàn sự sinh tinh [187]. Kết quả từ nghiên cứu này chỉ ra rằng tỉ lệ tinh trùng chết và có hình thái bất thường ở lô chỉ uống FLZ cao hơn có ý nghĩa so với thời điểm ban đầu và cao hơn so với lô chứng ở cùng thời điểm. Như vậy FLZ liều 50 mg/kg trong 30 ngày đã làm tăng tỉ lệ tinh trùng chết và tỉ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường trên thỏ, điều này phù hợp với nghiên cứu của Tully Douglas và cs (2006) [188]. Cơ chế của tác dụng này chưa rõ ràng nhưng có thể là do FLZ đã làm tăng nồng độ MDA do tăng phản ứng peroxyd hóa lipid.

Ở các lô uống FLZ và TXCB, tỉ lệ tinh trùng chết và có hình thái bất thường đều thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với lô chỉ uống FLZ ở cùng thời điểm. Như vậy, TXCB đã ngăn ngừa được sự tăng tỉ lệ tinh trùng chết và tỉ lệ tinh trùng có hình thái cấu trúc bất thường gây ra bởi FLZ.

*** Về thụ tinh nhân tạo cho thỏ cái:**

Do tính không đồng nhất của tinh trùng người nên rất khó tìm ra một dấu ấn sinh học có thể phân biệt đàn ông vô sinh với những người đàn ông có khả năng sinh sản bình thường. Tuy nhiên xét nghiệm tinh dịch đồ vẫn là phương pháp đơn giản nhất và có nhiều ý nghĩa trong chẩn đoán vô sinh nam. Mặc dù vậy, tinh dịch đồ chỉ có giá trị đánh giá và tiên lượng về khả năng sinh sản của nam giới, chứ không giúp xác định hay khẳng định khả năng sinh sản của người đàn ông vì khả năng sinh sản còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác [34].

Ở nghiên cứu này, đã tiến hành lấy tinh dịch thỏ ở các lô và thụ tinh nhân tạo cho thỏ cái. Qua thụ tinh cho thỏ cái sẽ đánh giá được tỷ lệ thụ thai của thỏ cái và số con sinh ra của một thỏ cái. Do đó, việc đánh giá khả năng thụ thai khi thụ tinh cho con cái sẽ đánh giá được kết quả hay hiệu quả cuối cùng của

sự tác động lên quá trình sinh sản. Điều này có thể có ý nghĩa trong việc ngoại suy khi nghiên cứu trên động vật qua người. Bởi việc thụ thai ngoài phụ thuộc vào số lượng và chất lượng tinh trùng thì còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác.

Trước khi thụ tinh (kể cả tự nhiên và nhân tạo) phải đảm bảo thỏ cái đang trong thời kỳ động dục. Thỏ cái có thể được đẻ động dục tự nhiên hoặc được gây động dục. Trong trường hợp đẻ động dục tự nhiên: vì có thể mỗi thỏ cái có chu kỳ động dục khác nhau, không đồng thời cùng một thời điểm. Do đó, trong trường hợp muốn thụ thai hàng loạt hoặc trong trường hợp nghiên cứu cần cùng một lúc một số lượng thỏ cái đã động dục thì có thể khó chọn đủ thỏ cái đáp ứng yêu cầu. Do vậy thỏ cái thường được gây động dục bằng cách tiêm dưới da huyết thanh ngựa chửa (PMSG) 20 UI 48- 56 giờ trước khi thụ tinh [189]. Để đảm bảo chắc chắn thỏ cái đã động dục, trước khi thụ tinh có thể kiểm tra sự chấp nhận của thỏ cái bằng thỏ đực đã cắt bỏ ống dẫn tinh.

Ngay sau khi thụ tinh (thường với thụ tinh nhân tạo) thỏ cái được gây rụng trứng bằng cách tiêm bắp 0,02 mg GnRH [189] hoặc tiêm bắp 0,2 mL buserelin 0,004 mg/mL [73].

Trong nghiên cứu này, đã tiến hành AI cho thỏ cái để đánh giá khả năng thụ thai. Đây là nghiên cứu đầu tiên trong nước sử dụng phương pháp này. Đồng thời tác giả không thể kiểm được PMSG và buserelin ở thị trường trong nước nên đã sử dụng cloprostenol và gonadorelin acetat sẵn có để thay thế. Tuy chưa có nghiên cứu so sánh sự thay thế này nhưng tác giả đã thực hiện quy trình giống nhau ở lô chứng sinh lý, mô hình và các lô dùng thuốc. Do đó tác động của cloprostenol và gonadorelin acetat đến kết quả thụ tinh nhân tạo của các lô là như nhau. Kết quả thu được, ở lô mô hình, tỉ lệ thụ thai và số con sinh ra thấp hơn so với lô chứng, kết quả này là phù hợp với việc FLZ đã làm giảm số lượng tinh trùng, giảm khả năng di động và tăng tỉ lệ tinh trùng chết, tăng tỉ lệ tinh trùng có hình thái bất thường. Với các lô dùng TXCB, tỉ lệ thụ thai và số con sinh ra cao hơn đáng kể so với lô mô hình như vậy kết quả của

việc cải thiện số lượng và chất lượng tinh trùng của TXCB đã được thể hiện thông qua khả năng thụ thai.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu về tính an toàn và tác dụng trên chức năng sinh dục, sinh sản nam giới của viên nang TXCB trên, rút ra một số kết luận sau:

1. Độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của viên nang TXCB

1.1. Độc tính cấp

Chưa tìm thấy LD₅₀ của viên nang TXCB theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong 24 giờ là 15,0 g/kg thể trọng đã không xuất hiện độc tính cấp.

1.2. Độc tính bán trường diễn

Khi cho chuột cống trắng uống viên nang TXCB với 2 mức liều là 0,42 g/kg và 1,26 g/kg trọng lượng cơ thể liên tục trong 90 ngày đã không ảnh hưởng tới sự phát triển bình thường của chuột, không ảnh hưởng tới sự tăng trọng lượng bình thường của chuột. Ngoài ra cũng không ảnh hưởng tới một số chỉ số huyết học (số lượng hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu); một số chỉ số sinh hóa (AST, ALT, creatinin, albumin và cholesterol) và hình ảnh đại thể cũng như vi thể gan, lách và thận.

2. Tác dụng của viên nang TXCB lên một số chức năng sinh sản, sinh dục nam

2.1. Hoạt tính androgen của viên nang TXCB

Viên nang TXCB đã thể hiện hoạt tính androgen ở cả 2 mức liều là 0,42 g/kg và 0,84 g/kg khi đánh giá trên mô hình chuột cống đực non thiếu. Cụ thể, viên nang TXCB đã làm tăng trọng lượng tương đối của 3/5 cơ quan sinh dục phụ là túi tinh, tuyến Cowper và cơ nâng hậu môn- hành hang; tuy nhiên không làm tăng trọng lượng tương đối tuyến tiền liệt và đầu dương vật.

2.2. Tác dụng của TXCB lên chức năng cương dương ở chuột cống gây đái tháo đường bằng streptozotocin

Viên nang TXCB liều 0,84 g/kg trọng lượng cơ thể liên tục trong 8 tuần đã làm giảm nồng độ glucose máu khi nghiên cứu trên chuột cống gây ĐTD bằng STZ. Ngoài ra làm phục hồi một số chỉ số đánh giá chức năng cương dương như: ICPmax, AUC và tỉ số ICPmax/MAP; đồng thời làm tăng nồng độ TES trong huyết thanh.

2.3. Tác dụng của TXCB lên khả năng sinh sản khi nghiên cứu trên thỏ gây suy giảm sinh sản bằng FLZ

Trên mô hình thỏ đực gây suy giảm sinh sản bằng FLZ, viên nang TXCB liều 180 mg/kg và 360 mg/kg đã làm giảm thời gian phản ứng (một dấu hiệu thể hiện sự tăng ham muốn tình dục), làm tăng số lượng và chất lượng tinh trùng (tăng thể tích tinh dịch, tăng số lượng tinh trùng, tăng tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh, tăng tỉ lệ tinh trùng di động và tỉ lệ tinh trùng di động tiến tới, giảm tỉ lệ tinh trùng chết và giảm tỉ lệ tinh trùng có hình thái bất thường).

Đồng thời, khi thụ tinh nhân tạo cho thỏ cái, viên nang TXCB đã làm tăng tỉ lệ thụ thai và số con sinh ra trong một lứa đẻ.

KIẾN NGHỊ

Từ những kết quả nghiên cứu thu được về tính an toàn và tác dụng trên sinh dục, sinh sản nam của viên nang TXCB; chúng tôi đưa ra một số kiến nghị như sau:

1. Cần đánh giá sâu hơn về tính an toàn của viên nang TXCB như độc tính trên di truyền và độc tính trên quá trình sinh sản và phát triển.
2. Thực hiện các thử nghiệm lâm sàng để đánh giá tác dụng của viên nang TXCB trên người.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ
ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Vu Ngoc Thang, Nguyen Hoang Ngan, Nguyen Minh Phuong (2020), Evaluation of acute toxicity, androgenic activity and effect on exercise performance of Truong Xuan CB capsules in experimental animals. *Journal of Military pharmaco-medicine*, 6, 91-96.
2. Vu Ngoc Thang, Nguyen Thanh Ha Tuan, Pham Quoc Binh, Nguyen Minh Phuong, Thai Danh Tuyen, Doan Minh Thuy, Manh Hung Tran, and Nguyen Hoang Ngan (2020) *In Vivo* Efficacy of TXCB, a Vietnamese Herbal Medicine Prescription, on Seminal Quality, Serum Testosterone, and Malondialdehyde Concentration in Rabbits. *Natural Product Communications*, volume 15(12): 1- 9. DOI: 10.1177/1934578X20983144.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ronald W. L., Kerstin S. F. M., Giovanni C., et al. (2010). Definitions/epidemiology/risk factors for sexual dysfunction. *The journal of sexual medicine.*, 7: 1598-1607.
2. Shehzad B. (2014). Male hypogonadism. *The Lancet.*, 383(9924): 1250-1263.
3. Nguyễn Thanh Hương, Trương Văn Hương, Phan Anh Tuấn và cs. (2016). Đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết nước tủa dương (*Balanophora laxiflora*) lên hành vi tình dục chuột cống đực trưởng thành. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 100(2): 50-57.
4. Thakur M., Chauhan N. S., Sharma V., et al. (2012). Effect of *Curculigo orchoides* on hyperglycemia-induced oligospermia and sexual dysfunction in male rats. *International Journal of Impotence Research.*, 24(2012): 31-37.
5. Rodolfo A. R., Grinspon R. P., Gottlieb S., et al. (2013). Male hypogonadism: an extended classification based on a developmental, endocrine physiology-based approach. *Andrology.*, 1(1): 3-16.
6. Dohle G. R., Arver S., Bettocchi C., et al. (2012). Guidelines on male hypogonadism. *European Association of Urology.*, 4: 1-28.
7. Lê Hùng (2013). Mãn dục nam dưới góc nhìn của y học cổ truyền. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 403(3): 143-147.
8. Liu P. Y., Veldhuis J. D. (2019). Hypothalamo-pituitary unit, testis, and male accessory organs, In: *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*, Eighth Edition, Elsevier, 285-300.
9. James A., Kent J. D., William W., et al. (2017). Testosterone deficiency in adults and corresponding treatment patterns across the globe. *Translational andrology and urology.*, 6(2): 183-191.

10. Mahinda Y. (2019). Epilepsy and sexual dysfunction, In: *The Comorbidities of Epilepsy*, Elsevier, 51-76.
11. Trần Quán Anh (2013). Mãn dục nam giới (Andropause). *Tạp chí Y học Việt Nam*, 403(3): 7-17.
12. Comhaire F. H. (2000). Andropause: hormone replacement therapy in the ageing male. *European Urology.*, 38(6): 655-662.
13. Rabih A. H., Glenn R. C. (2005). Andropause: is androgen replacement therapy indicated for the aging male? *Annual Review of Medicine.*, 56: 117-137.
14. Semet. M., Paci M., Saias-Magnan J., et al. (2017). The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology.*, 5(4): 640-663.
15. Hafez B., Hafez E. S. E. (2004). Andropause: endocrinology, erectile dysfunction, and prostate pathophysiology. *Archives of Andrology.*, 50(2): 45-68.
16. Nandy P. R., Singh D. V., Madhusoodanan P., et al. (2008). Male andropause: A myth or reality. *Medical Journal Armed Forces India.*, 64(3): 244-249.
17. Marie D., Michel H., Jean-Jacques L. (2003). Andropause and psychopathology: minor symptoms rather than pathological ones. *Psychoneuroendocrinology.*, 28(7): 863-874.
18. Eric W., Schulman C. C. (2002). Male andropause: myth, reality, and treatment. *International Journal of Impotence Research.*, 14(1): S93-S98.
19. Faysal A. Y., Lawrence J., Maarten A., et al. (2016). Erectile dysfunction. *Nature reviews Disease primers.*, 2(1): 1-20.
20. Trần Quán Anh, Nguyễn Phương Hồng (2013). Rối loạn cương dương. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 403(3): 151-171.

21. Anthony J. B., Jay C. L., Serge C., et al. (2015). 2015 CUA Practice guidelines for erectile dysfunction. *Canadian Urological Association Journal.*, 9(1-2): 23-29.
22. Elizabeth S., Arthur L. B., Elizabeth A. P. (2007). Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in the US. *The American journal of medicine.*, 120(2): 151-157.
23. Francesco L., Giulia R., Elisa M., et al. (2019). Impact of metabolically healthy obesity in patients with andrological problems. *The journal of sexual medicine.*, 16(6): 821-832.
24. Paolo C., Michele C., Eugenio V., et al. (2013). One patient out of four with newly diagnosed erectile dysfunction is a young man-worrisome picture from the everyday clinical practice. *The journal of sexual medicine.*, 10(7): 1833-1841.
25. Nguyen Hoang Minh Tue, Gabrielson A. T., Hellstrom W. J. G. (2017). Erectile dysfunction in young men-a review of the prevalence and risk factors. *Sexual medicine reviews.*, 5(4): 508-520.
26. Hsieh C. H., Huang Y. P., Tsai M. H., et al. (2015). Tunical outer layer plays an essential role in penile veno-occlusive mechanism evidenced from electrocautery effects to the corpora cavernosa in defrosted human cadavers. *Urology.*, 86(6): 1129-1136.
27. Rany S., Hussein G. (2013). Erectile dysfunction. *The Lancet.*, 381(9861): 153-165.
28. Jeremy J. Y., Angelini G. D., Khan M., et al. (2000). Platelets, oxidant stress and erectile dysfunction: an hypothesis. *Cardiovascular Research.*, 46(1): 50-54.
29. Arslan D., Aslan G., Sifil A., et al. (2002). Sexual dysfunction in male patients on hemodialysis: assessment with the International Index of

- Erectile Function (IIEF). *International Journal of Impotence Research.*, 14(6): 539-542.
30. El-Wakeel L. M., Fouad F. A., Saleem M. D., et al. (2019). Efficacy and tolerability of sildenafil/l-arginine combination relative to sildenafil alone in patients with organic erectile dysfunction. *Andrology.*, 2019(2): 1-5.
 31. Catriona D., Ghadir J. O., Jiasian T., et al. (2019). Erectile dysfunction: a global review of intracavernosal injectables. *World journal of urology.*, 2019: 1-8.
 32. Konstantinos K., Andrea S., Ganesan A., et al. (2016). Pharmacotherapy for erectile dysfunction: recommendations from the Fourth International Consultation for Sexual Medicine (ICSM 2015). *The journal of sexual medicine.*, 13(4): 465-488.
 33. Trương Việt Bình, Đoàn Minh Thụy (2013). Đánh giá tác dụng của bài thuốc bát vị hoàn trong điều trị rối loạn cương dương. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 403(3): 573-576.
 34. Nguyễn Thị Thu Hồng (2013). Nam khoa và vấn đề vô sinh nam giới. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 403(3): 197-207.
 35. Jacky B., Laura B., John A. C., et al. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction.*, 22(6): 1506-1512.
 36. Maya N. M., Seth R. F., Ties B., et al. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine.*, 9(12): e1001356.
 37. Jungwirth A., Diemer T., Dohle G. R., et al. (2015). Guidelines on Male Infertility, update 2014. *European Association of Urology.*

38. Huang I. S., Wren J., Nelson E. B., et al. (2018). Clinical Consultation Guide on Imaging in Male Infertility and Sexual dysfunction. *European urology focus.*, 4(3): 338-347.
39. Francesco L., Mario M. (2018). Sexual dysfunction and male infertility. *Nature Reviews Urology.*, Advance online publication: 1-21.
40. World Health Organization (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, fifth edition, Geneva.
41. Ali A. D., Peter N. S. (2014). Medical treatment of male infertility. *Translational andrology and urology.*, 3(1): 9-16.
42. Dorothee B., Hermann M. B., Sabine K., et al. (1998). Pulsatile GnRH or human chorionic gonadotropin/human menopausal gonadotropin as effective treatment for men with hypogonadotropic hypogonadism: a review of 42 cases. *European Journal of Endocrinology.*, 139(3): 298-303.
43. Bharti S., Misro M. M., Rai U. (2013). Clomiphene citrate potentiates the adverse effects of estrogen on rat testis and down-regulates the expression of steroidogenic enzyme genes. *Fertility and sterility.*, 99(1): 140-148.
44. Scott J. W., Ajay K. N., Peter N. K. (2006). Select patients with hypogonadotropic hypogonadism may respond to treatment with clomiphene citrate. *Fertility and sterility.*, 86(6): 1664-1668.
45. Aldo I., Maurizio L., Francesco R. (2005). Treatment of male infertility. *Contraception.*, 72(4): 314-318.
46. Vogel H. G., Vogel W. H. (1997). Endocrinology- Testicular Steroid Hormones, Androgenic and Anabolic Activity, Chicken Comb Method for Androgen Activity, In: *Drug discovery and evaluation*, Springer Science & Business Media, New York, 3483-3484.

47. OECD (2009). *Hershberger Bioassay in Rats: A Short-term Screening Assay for (Anti) Androgenic Properties*. Test No. 441, OECD Guideline for Testing of Chemicals, Paris.
48. Earl G. L., Johnathan F., Joseph S. O. (2005). Hershberger Assay to Investigate the Effects of Endocrine-Disrupting Compounds with Androgenic or Antiandrogenic Activity in Castrate-Immature Male Rats. *Current Protocols in Toxicology.*, 26(1): 16.9.1-16.9.15.
49. Nguyễn Thanh Hương, Nguyễn Trần Thị Giáng Hương, Phan Anh Tuấn và cs. (2015). Nghiên cứu hoạt tính androgen của cao lỏng tảo dương (*Balanophora laxiflora*) trên chuột đực. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 96(4): 31-40.
50. Ågmo A. (1997). Male rat sexual behavior. *Brain Research Protocols.*, 1(2): 203-209.
51. Hedlund P., Matsumoto K., Andersson K. E. (2005). Animal Models of Erectile Dysfunction, In: *Current Protocols in Pharmacology*, Wiley, Lund, 5.41.1-5.41.22.
52. Kilic S., Kolukcu E., Erdemir F., et al. (2019). The Effects of Oral 5-alpha Reductase Inhibitors on Penile Intracavernosal Pressures and Penile Morphology in Rat Model. *Urology Journal.*, 16(2): 205-211.
53. Podlasek C. A. (2016). Animal Models for the Study of Erectile Function and Dysfunction, In: *Contemporary Treatment of Erectile Dysfunction: A Clinical Guide*, second edition, Springer, 1-15.
54. Arthur L. B., Sena F. S., Ahmet H., et al. (2015). GGF2 is neuroprotective in a rat model of cavernous nerve injury-induced erectile dysfunction. *The journal of sexual medicine.*, 12(4): 897-905.
55. Lawrence S. H., Irwin G. (1996). Diabetic sexual dysfunction. *Endocrinology and Metabolism Clinics.*, 25(2): 379-400.

56. Perimenis P., Markou S., Gyftopoulos K., et al. (2002). Switching from long-term treatment with self-injections to oral sildenafil in diabetic patients with severe erectile dysfunction. *European urology.*, 41(4): 387-391.
57. Akbarzadeh A., Norouzian D., Mehrabi M. R., et al. (2007). Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.*, 22(2): 60-64.
58. Carol A. P., David J. Z., Joseph D. H., et al. (2003). Altered Sonic hedgehog signaling is associated with morphological abnormalities in the penis of the BB/WOR diabetic rat. *Biology of reproduction.*, 69(3): 816-827.
59. Anders A. F. S., David M. R. (1978). Peripheral neuropathy in mutant diabetic mouse [C57BL/Ks (db/db)]. *Acta neuropathologica.*, 41(2): 85-89.
60. Pan L. H., Li X. F., Wang M. N., et al. (2014). Comparison of hypoglycemic and antioxidative effects of polysaccharides from four different *Dendrobium* species. *International Journal of Biological Macromolecules.*, 64: 420-427.
61. Masaki Y., Masato S., Hiroaki S., et al. (2002). Loss of anti-apoptotic genes in aging rat crura. *The Journal of urology.*, 168(5): 2296-2300.
62. David A. G., Michael A. N., David L. H., et al. (1994). The Brown Norway rat as a model of male reproductive aging: evidence for both primary and secondary testicular failure. *Journal of gerontology.*, 49(2): B42-B50.
63. Con M., Agnieszka C., Sandra F., et al. (2011). Spermatogenic and sperm quality differences in an experimental model of metabolic syndrome and hypogonadal hypogonadism. *Reproduction.*, 142(1): 63-71.
64. Roumeguere T. H., Eric W., Carpentier Y., et al. (2003). Erectile dysfunction is associated with a high prevalence of hyperlipidemia and coronary heart disease risk. *European urology.*, 44(3): 355-359.

65. Donghua X., Christopher D. K., Craig F. D., et al. (2005). Cholesterol feeding reduces vascular endothelial growth factor signaling in rabbit corporal tissues. *The journal of sexual medicine.*, 2(5): 634-640.
66. Huang Y. C., Ning H., Shindel A. W., et al. (2010). The effect of intracavernous injection of adipose tissue-derived stem cells on hyperlipidemia-associated erectile dysfunction in a rat model. *The journal of sexual medicine.*, 7(1): 1391-1400.
67. Dương Thị Ly Hương, Lê Thị Hoa, Nguyễn Thị Thùy và cs. (2013). Bước đầu đánh giá tác dụng của rễ bá bệnh thu hái tại Việt Nam trên sự suy giảm sinh dục gây ra bởi natri valproat trên chuột nhắt thực nghiệm. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 403(3): 431-437.
68. Razak R. N. H. A., Ismail F., Muhammad L. M. I., et al. (2019). Ameliorative Effects of *Aquilaria malaccensis* Leaves Aqueous Extract on Reproductive Toxicity Induced by Cyclophosphamide in Male Rats. *The Malaysian journal of medical sciences.*, 26(1): 44-57.
69. Luo Q., Li Z., Huang X., et al. (2006). *Lycium barbarum* polysaccharides: Protective effects against heat-induced damage of rat testes and H₂O₂-induced DNA damage in mouse testicular cells and beneficial effect on sexual behavior and reproductive function of hemicastrated rats. *Life sciences.*, 79(7): 613-621.
70. Sekar S., Elumalai P., Seppan P. (2010). Effect of *Mucuna pruriens* on oxidative stress mediated damage in aged rat sperm. *International journal of andrology.*, 33(1): 22-32.
71. Dan G., Laurent D., Manolo G. (1996). Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature.*, 379(6563): 333-335.
72. Khalifa A. W. H., El-Sisy G. A., El-Nattat W. S., et al. (2018). Effect of water extract of dates palm (*Phoenix dactylifera*) on semen characteristics and oxidative status in serum of male New Zealand

- rabbits under heat stress. *Asian Pacific Journal of Reproduction.*, 7(1): 22-26.
73. Marco-Jiménez F., Vicente J. S. (2017). Overweight in young males reduce fertility in rabbit model. *PLoS One.*, 12(7): 1-11.
74. Dương Thị Ly Hương (2012). *Nghiên cứu tác dụng lên chức năng sinh sản và độc tính của rễ Bá bệnh (Euricoma Longifolia J.) thu hái tại Việt Nam trên động vật thực nghiệm*, Luận án Tiến sĩ Y học, Đại học Y Hà Nội.
75. Nguyễn Thanh Hương (2017). *Nghiên cứu tính an toàn và tác dụng của dịch chiết nước Tỏa dương (Balanophora laxiflora) lên một số chỉ tiêu sinh sản ở chuột đực*, Luận án Tiến sĩ Y học Cổ truyền, Viện Y học Cổ truyền Quân đội.
76. Đậu Thùy Dương (2018). *Nghiên cứu độc tính và tác dụng lên chức năng sinh sản của OS 35 trong thực nghiệm*, Luận án Tiến sĩ y học, Đại học Y Hà Nội.
77. Mai Phương Thanh (2019). *Nghiên cứu độc tính và tác dụng điều trị suy giảm sinh dục đực của viên hoàn cứng TD0014 trên thực nghiệm*, Luận án Tiến sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
78. Nguyễn Thị Phương Thảo (2021). *Nghiên cứu tính an toàn và tác dụng tăng cường khả năng sinh tinh của cao đặc Testin CT3 trên động vật thực nghiệm*, Luận án Tiến sĩ y học, Học viện Quân y.
79. She G. M., Zhang Y. J., Yang C. R. (2009). Phenolic Constituents from *Balanophora laxiflora* with DPPH Radical Scavenging Activity. *Chemistry & Biodiversity.*, 6: 875-880.
80. Zhu W. (2014). *Comparative Study On Antioxidant Properties Of Dendrobium officinale (tiệpishihu)*, Master of science, Wayne State University.

81. Hou S. Z., Liang C. Y., Liu H. Z., et al. (2016). *Dendrobium officinale* Prevents Early Complications in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, 2016: 1-11.
82. Bộ y tế (2017). *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
83. Sui Z., Zhang L., Huo Y., et al. (2014). Bioactive components of velvet antlers and their pharmacological properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, 87: 229-240.
84. Zhao X. N., Wang X. F., Liao J. B., et al. (2015). Antifatigue Effect of *Millettiae speciosae* champ (Leguminosae) Extract in Mice *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.*, 14(3): 479-485.
85. Zhao Z., Liu P., Ma S., et al. (2017). Botanical characteristics, chemical and nutritional composition and pharmacological and toxicological effects of medicinal and edible plant *Millettia speciosa* Champ. *Food Science.*, 38(9): 293-306.
86. Chauhan N. S., Rao C. V., Dixit V. K. (2007). Effect of *Curculigo orchioides* rhizomes on sexual behaviour of male rats. *Fitoterapia.*, 78: 530–534.
87. Iram I. H., Rashmin K., Hassan M. S., et al. (2018). Antioxidative and anti-proliferative potential of *Curculigo orchioides* Gaertn in oxidative stress induced cytotoxicity: *In vitro*, *ex vivo* and *in silico* studies. *Food and Chemical Toxicology.*, 115: 244-259.
88. Gu S., Zhou R., Wang X. (2018). Comparison of enhanced male mice sexual function among three medicinal materials. *Andrologia.*, 50(9): 1-7.
89. Zhao H., Song L., Huang W., et al. (2017). Total flavonoids of *Epimedium* reduce ageing- related oxidative DNA damage in testis of rats via p53-dependent pathway. *Andrologia.*, 49(10): 1-7.

90. Liu W. J., Xin Z. C., Xin H., et al. (2005). Effects of icariin on erectile function and expression of nitric oxide synthase isoforms in castrated rats. *Asian Journal of Andrology.*, 7(4): 381-388.
91. Zhao Y., Chen S., Wang Y., et al. (2018). Effect of drying processes on prenylflavonoid content and antioxidant activity of *Epimedium koreanum* Nakai. *Journal of Food and Drug Analysis.*, 26(2): 796-806.
92. Song B., Wang F., Wang W. (2015). Effect of Aqueous Extract from *Morinda officinalis* F. C. How on Microwave-Induced Hypothalamic-Pituitary-Testis Axis Impairment in Male Sprague-Dawley Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, 2015: 1-10.
93. Zhu Z., Huang F., Wang F., et al. (2017). *Morinda Officinalis* Polysaccharides Stimulate Hypothalamic GnRH Secretion in Varicocele Progression. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, 2017: 1-12.
94. Chang M. S., Kim W. N., Yang W. M., et al. (2008). Cytoprotective effects of *Morinda officinalis* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in Leydig TM3 cells. *Asian Journal of Andrology.*, 10(4): 667-674.
95. Đỗ Thị Nguyệt Quế, Nguyễn Trần Thị Giáng Hương, Vũ Thị Trâm và cs. (2011). Sàng lọc tác dụng hạ glucose huyết của các phân đoạn dịch chiết câu kỷ tử và bước đầu đánh giá tác dụng hạ glucose huyết của phân đoạn dịch chiết có tác dụng rõ nhất. *Tạp chí Dược học*, 418(2): 28-31.
96. Zhou Z., Jing L., Cui G., et al. (2009). Effects of polysaccharide from *Lycium barbarum* in alloxan-induced diabetic mice. *African Journal of Biotechnology.*, 8(23): 6634-6637.
97. Wang C. C., Chang S. C., Stephen I. B., et al. (2010). Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *Food chemistry.*, 120(1): 184-192.

98. OECD (2002). *Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure*, Test No. 420, OECD Guideline for Testing of Chemicals, Paris.
99. OECD (2018). *Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents*, Test No. 408, OECD Guideline for Testing of Chemicals, Paris.
100. Ottani A., Daniela G., Francesca F. (2002). Modulatory activity of sildenafil on copulatory behaviour of both intact and castrated male rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.*, 72(3): 717-722.
101. Brian L. F. (2015). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology.*, 70(1): 5.47.1-5.47.20.
102. El-Medany H. A., Hagar H. H. (2002). Effect of fluconazole on the fertility of male rabbits. *Arzneimittel Forschun/Drug Research.*, 52(8): 636-640.
103. Đỗ Trung Đàm (2014). *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
104. Tran Thi Hang, Tran Thi Quyen, Nguyen Quang Huy, et al. (2016). Second Metabolite Composition, Antioxidative, Tyrosinase Inhibitory, Antibacterial and Anticancer Activity of *Balanophora laxiflora* Extract *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology.*, 32(2): 6-14.
105. Tang H., Zhao T., Sheng Y., et al. (2017). *Dendrobium officinale* Kimura et Migo: A Review on Its Ethnopharmacology, Phytochemistry, Pharmacology, and Industrialization. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, 2017: 1-19.
106. Yang Z., Zhou H., Zhao X., et al. (2014). Acute Toxicity Study of Water and Ethanol Extracts of Radix Millettiae Speciosae. *Herald of Medicine.*, 6: 721-722.
107. Elumalai A., Chandiran I. S., Balamuthu K. (2013). An investigation on preliminary phytochemical and safety profiles of methanolic root extract of *Curculigo orchioides*. *Journal of pharmacy research.*, 7(8): 692-696.

108. Madhavan V., Richa J., Anita M., et al. (2007). Antidiabetic activity of *Curculigo orchoides* Root tuber. *Pharmaceutical Biology.*, 45(1): 18-21.
109. Phạm Thị Nguyệt Hằng, Nguyễn Văn Khiêm, Nguyễn Văn Khởi (2017). Nghiên cứu độc tính cấp, bán trường diễn và tác dụng tăng lực của cao chiết còn sâm cau. *Tạp chí Dược liệu.*, 4(22): 239-247.
110. Nie Y., Dong X., He Y., et al. (2013). Medicinal plants of genus *Curculigo*: traditional uses and a phytochemical and ethnopharmacological review. *Journal of ethnopharmacology.*, 147(3): 547-563.
111. Sui H. X., Gao P., Xu H. B. (2006). The safety evaluation of herba epimedii water extract. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis.*, 18: 439-442.
112. Zhang J. H., Xin H. L., Xu Y. M., et al. (2018). *Morinda officinalis* How.- A comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology.*, 213: 230-255.
113. Kwan Y. P., Ibrahim D., Chen Y., et al. (2013). Acute and subchronic toxicity study of *Euphorbia hirta* L. methanol extract in rats. *BioMed research international.*, 2013: 1-15.
114. Harry O., Graham B., Denise R., et al. (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.*, 32(1): 56-67.
115. Norbert L., Wim V. B., Raymond V. (2006). The changing epidemiology of acute renal failure. *Nature Clinical Practice Nephrology.*, 2(7): 364-377.
116. Nguyễn Thanh Hương, Triệu Văn Túy, Phan Anh Tuấn và cs. (2017). Khảo sát độc tính sinh sản của dịch chiết nước tủa dương (*Balanophora laxiflora*) trên chuột nhắt trắng. *Tạp chí Y dược học cổ truyền Quân sự.*, 2(7): 6-9.

117. Ma H., He X., Yang Y., et al. (2011). The genus *Epimedium*: an ethnopharmacological and phytochemical review. *Journal of ethnopharmacology.*, 134(3): 519-541.
118. Harunobu A., Norman R. F. (2011). A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food research international.*, 44(7): 1702-1717.
119. William O., Earl G. Jr. L., Errol Z., et al. (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose–response studies. *Environmental health perspectives.*, 115(5): 671-678.
120. Kanji Y., Masakuni S., Shoji N., et al. (2004). Comparison of the Hershberger assay and androgen receptor binding assay of twelve chemicals. *Toxicology.*, 195(2-3): 177-186.
121. Nguyễn Thị Liên, Trần Thị Thu Trang, Hoàng Thị Thanh Thảo và cs. (2020). Nghiên cứu tác dụng hướng sinh dục nam của cao ba kích trên thực nghiệm. *Tạp chí Dược học*, 3(60): 33-38.
122. Browne P., Kleinstreuer N. C., Ceger P., et al. (2018). Development of a curated Hershberger database. *Reproductive Toxicology.*, 81: 259-271.
123. Phạm Nam Việt, Vũ Hồng Thịnh (2011). Khảo sát tần suất và nhu cầu điều trị rối loạn cương dương trên bệnh nhân đái tháo đường typ 2. *Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 15(3): 31-37.
124. Đàm Văn Cương (2013). Khảo sát tình trạng rối loạn cương dương và kết quả điều trị bằng pycalis qua 100 bệnh nhân. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 403(3): 630-634.
125. Đoàn Minh Thụy, Nguyễn Minh Phương (2013). Một số đặc điểm rối loạn cương dương ở bệnh nhân đái tháo đường tại bệnh viện nội tiết trung ương. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 403(3): 593-597.

126. Adeniyi A. F., Adeleye J. O., Adeniyi C. Y. (2010). Diabetes, sexual dysfunction and therapeutic exercise: a 20 year review. *Current diabetes reviews.*, 6(4): 201-206.
127. Andrew J. M. (2002). Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. *Nitric oxide.*, 6(2): 101-124.
128. Trinity J. B., Mustafa F. U., Muammer K., et al. (2005). Superoxide Anion Production in the Rat Penis Impairs Erectile Function in Diabetes: Influence of In Vivo Extracellular Superoxide Dismutase Gene Therapy. *The journal of sexual medicine.*, 2(2): 187-198.
129. Richard B., Adam M., Gerald B. (2018). Sexual dysfunction and hypogonadism in men with diabetes. *Canadian journal of diabetes.*, 42: S228-S233.
130. Choi W. S., Kwon O. S., Cho S. Y., et al. (2015). Effect of chronic administration of PDE5 combined with glycemic control on erectile function in streptozotocin-induced diabetic Rats. *The journal of sexual medicine.*, 12(3): 600-610.
131. June H. R., Allen D. S., Zuhayr T. M., et al. (2000). Sexual function in men with diabetes type 2: association with glycemic control. *The Journal of urology.*, 163(3): 788-791.
132. Liu Y., Yang L., Zhang Y., et al. (2020). *Dendrobium officinale* polysaccharide ameliorates diabetic hepatic glucose metabolism via glucagon-mediated signaling pathways and modifying liver-glycogen structure. *Journal of Ethnopharmacology.*, 248: 1-12.
133. Avinash P., Swapneel K., Darshana A. P., et al. (2013). Evaluation of effect of aqueous slurry of *Curculigo orchioides* Gaertn. rhizome in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of pharmacy research.*, 7(8): 747-753.

134. Castela Â., Costa C. (2016). Molecular mechanisms associated with diabetic endothelial–erectile dysfunction. *Nature Reviews Urology.*, 13(5): 266-274.
135. Zhao Z. K., Yu H. L., Liu B., et al. (2016). Antioxidative mechanism of *Lycium barbarum* polysaccharides promotes repair and regeneration following cavernous nerve injury. *Neural regeneration research.*, 11(8): 1312-1321.
136. Javier A., Rocío G. C., Pedro C., et al. (2010). Diabetes exacerbates the functional deficiency of NO/cGMP pathway associated with erectile dysfunction in human corpus cavernosum and penile arteries. *The journal of sexual medicine.*, 7(2): 758-768.
137. Cartledge J. J., Eardley I., Morrison J. F. B. (2001). Nitric oxide-mediated corpus cavernosal smooth muscle relaxation is impaired in ageing and diabetes. *British Journal of Urology.*, 87(4): 402-407.
138. Sohn D. W., Kim H. Y., Kim S. D., et al. (2008). Elevation of intracavernous pressure and NO-cGMP activity by a new herbal formula in penile tissues of spontaneous hypertensive male rats. *Journal of ethnopharmacology.*, 120(2): 176-180.
139. Corradi P. F., Corradi R. B., Greene L. W. (2016). Physiology of the hypothalamic pituitary gonadal axis in the male. *Urologic Clinics of North America.*, 43(2): 151-162.
140. Zhang J., Li X., Cai Z., et al. (2019). Association between testosterone with type 2 diabetes in adult males, a meta-analysis and trial sequential analysis. *The Aging Male.*, 23: 607-618.
141. Yu J., Masahiro A., Masato E., et al. (2010). Androgen receptor-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells: role of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway. *Endocrinology.*, 151(4): 1822-1828.

142. Nawras M., Jay S., Grace Y., et al. (2005). Hypogonadism and metabolic syndrome: implications for testosterone therapy. *The Journal of urology.*, 174(3): 827-834.
143. Phan Anh Tuấn, Trịnh Hoài Nam, Trần Thị Thơm (2013). Nghiên cứu tác dụng của sâu chít (*Brihasp atrostigmella* Moore) lên một số chỉ số chức năng sinh sản ở chuột cống đực. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 403(3): 676-681.
144. Morten I. L., Erik T., Petter M., et al. (2007). Reversible Effects of Antiepileptic Drugs on Reproductive Endocrine Function in Men and Women with Epilepsy-A Prospective Randomized Double-Blind Withdrawal Study. *Epilepsia.*, 48(10): 1875-1882.
145. Røste L. S., Taubøll E., Mørkrid L., et al. (2005). Antiepileptic drugs alter reproductive endocrine hormones in men with epilepsy. *European journal of neurology.*, 12(2): 118-124.
146. Isojärvi J. I. T., Eeva L., Juntunen K. S. T., et al. (2004). Effect of epilepsy and antiepileptic drugs on male reproductive health. *Neurology.*, 62(2): 247-253.
147. Bộ y tế (2015). *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
148. Millsop J. W., Heller M. M., Eliason M. J., et al. (2013). Dermatological medication effects on male fertility. *Dermatologic therapy.*, 26(4): 337-346.
149. Kamilia G., Hacene F., Aziez C., et al. (2013). Administering ketoconazole (25mg/kg) for 14 days in male wistar rat provokes testicular damage accompanied by changes in testosterone levels and immune function. *Synthese revue des sciences et de la technologie.*, 27(1): 82-88.

150. Bernd F., Pascale C. P., Christopher V., et al. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction.*, 144(1): 1-10.
151. OECD (2015). *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test No. 404, OECD Guideline for Testing of Chemicals, Paris.
152. Paula D. J., David G. B. (2002). Practical aspects of experimental design in animal research. *Institute for Laboratory Animal Research Journal.*, 43(4): 202-206.
153. Đậu Thùy Dương, Nguyễn Trần Thị Giáng Hương, Lê Minh Hà và cs. (2014). Tác dụng bảo vệ của chế phẩm OS35 trên cơ quan sinh sản của chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat. *Tạp chí Nghiên cứu y học*, 90(5): 51-58.
154. Mai Phương Thanh, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Trọng Thông và cs. (2019). Tác dụng phục hồi của TD0014 trên mô hình gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat. *Tạp chí Y Dược học- Trường Đại học Y Dược Huế*, 11: 266-275.
155. Zakaria A., Aida E. B., Sherief M. A. R., et al. (2017). Effect of inhibition of estrogen synthesis or blocking its receptors on male rabbit reproduction *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research.*, 5(1): 34-41.
156. Ahemen T., Abu A. H., Orakaanya T. T. (2013). Sperm quality and testicular morphometry of rabbits fed dietary levels of water spinach (*Ipomoea aquatica*) leaf meal. *Agriculture and Biology Journal of North America.*, 4(3): 352-357.
157. Amao O. A., Showunmi K. A. (2016). Reproductive characteristics of rabbit bucks fed diet containing raw or fermented cottonseed cake. *British Biotechnology Journal.*, 10(3): 1-7.

158. Maarke J. E. R., Roberto T. A., Aldert H. P., et al. (2014). Conazole fungicides inhibit Leydig cell testosterone secretion and androgen receptor activation in vitro. *Toxicology reports.*, 1: 271-283.
159. Natasa J. S., Marija M. J., Aleksandar Z. B., et al. (2013). Sustained in vivo blockade of α 1-adrenergic receptors prevented some of stress-triggered effects on steroidogenic machinery in Leydig cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.*, 305(2): E194-E204.
160. Zirkin B. R., Papadopoulos V. (2018). Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of reproduction.*, 99(1): 101-111.
161. Michael T. L., Flint B. M. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.*, 443(7113): 787-795.
162. Tayebe F., Hamid R. M., Mahdi M. (2019). Protective effects of silymarin on testis histopathology, oxidative stress indicators, antioxidant defence enzymes and serum testosterone in cadmium-treated mice. *Andrologia.*, 51(5): e13242.
163. Yu C., Jiang F., Zhang M., et al. (2019). HC diet inhibited testosterone synthesis by activating endoplasmic reticulum stress in testicular Leydig cells. *Journal of cellular and molecular medicine.*, 23(5): 3140-3150.
164. Lu C., Wang M., Mu J., et al. (2011). Simultaneous determination of eleven sex hormones in antler velvet health products by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese journal of chromatography.*, 29(6): 558-562.
165. Lu C. M., Wang M. T., Mu J., et al. (2012). Determination of Sex Hormones in Antler Velvet by High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Chemical Research in Chinese Universities.*, 28(2): 191-194.

166. Attia Y. A., El-Hamid A. E. A., El-Hanoun A. M., et al. (2015). Responses of the fertility, semen quality, blood constituents, immunity and antioxidant status of rabbit bucks to type and magnetizing of water. *Annals of animal science.*, 15(2): 387-407.
167. Raymond C. R., Claus G. R., Michael J. M., et al. (2019). Evaluation of the impact of dutasteride/tamsulosin combination therapy on libido in sexually active men with lower urinary tract symptoms (LUTS) secondary to benign prostatic hyperplasia (BPH): A post hoc analysis of a prospective randomised placebo-controlled study. *International journal of clinical practice.*, 73(9): 1-9.
168. Pankaj H. C., Pallavi D. R., Sharada L. D., et al. (2019). Comparative Aphrodisiac Activity of Formulated Tablet of Bombax Ceiba Linn. Extract with Sildenafil Citrate Tablet in Male Mice. *Research & Reviews: A Journal of Pharmacology.*, 5(3): 19-26.
169. Dolores D. M., Cheng. C. Y. (2015). The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation. *Endocrine reviews.*, 36(5): 564-591.
170. Oduwole O. O., Peltoketo H., Huhtaniemi I. T. (2018). Role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis. *Frontiers in endocrinology.*, 9: 763-773.
171. Trần Đức Phần, Đoàn Minh Thụy, Nguyễn Anh Thu (2013). Nghiên cứu tốc độ di chuyển và tính chất di chuyển tinh trùng trong các cặp vợ chồng thiếu năng sinh sản. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 403(3): 618-622.
172. Check J. H., Lurie D., Vetter B. H. (1995). Sera gonadotropins, testosterone, and prolactin levels in men with oligozoospermia or asthenozoospermia. *Archives of andrology.*, 35(1): 57-61.
173. Michelle W., Philippa T. K. S., Nina A., et al. (2009). Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *The*

Federation of American Societies for Experimental Biology Journal.,
23(12): 4218-4230.

174. Chauhan N. S., Dixit V. K. (2008). Spermatogenic activity of rhizomes of *Curculigo orchioides* Gaertn in male rats. *International journal of applied research in natural products.*, 1(2): 26-31.
175. Zhou J., Chen L., Li J., et al. (2015). The semen pH affects sperm motility and capacitation. *PloS one*, 10(7): 1-15.
176. Alexander J. T., James A. F., Nancy A. R., et al. (1998). Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Molecular biology of the cell.*, 9(2): 263-276.
177. Sandro L. V., Rosita A. C., Ylenia D., et al. (2019). FSH therapy for idiopathic male infertility: four schemes are better than one. *The Aging Male.*, 23: 750-755.
178. Eduardo R. P., Carmen D. S., Manuel J. L. P., et al. (2007). The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Current topics in developmental biology.*, 77: 3-19.
179. Zhu Z., Takashi U., Tetsuji O., et al. (2019). Gene expression and protein synthesis in mitochondria enhance the duration of high-speed linear motility in boar sperm. *Frontiers in physiology.*, 10: 1-13.
180. Barbagallo F., Vignera S. L., Cannarella R., et al. (2020). Evaluation of sperm mitochondrial function: A key organelle for sperm motility. *Journal of Clinical Medicine.*, 9(2): 363-375.
181. Adam J. K., Geoffry N. D. I., Jane M. F., et al. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.*, 93(8): 3199-3207.

182. Ashok A., Gurpriya V., Chloe O., et al. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health.*, 32(1): 1-17.
183. Alam M. N., Bristi N. J., Rafiquzzaman M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal.*, 21(2): 143-152.
184. Heidar T., Mahmoud D., Hojatollah S. (2005). Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. *Clinica chimica acta.*, 356(1-2): 199-203.
185. Rachel B. D., Mary K. S. (2019). Sperm morphology: History, challenges, and impact on natural and assisted fertility. *Current Urology Reports.*, 20(8): 1-8.
186. David S. G., James W. O., Pam F. L., et al. (2001). Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New England Journal of Medicine.*, 345(19): 1388-1393.
187. Gaffari T., Ahmet A., Mustafa S., et al. (2007). Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology.*, 67(4): 778-785.
188. Douglas B. T., Wenjun B., Amber K. G., et al. (2006). Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. *Toxicology and applied pharmacology.*, 215(3): 260-273.
189. Johnin D., De Graaf S. P., Bathgate R. (2014). Investigation of *in vitro* parameters and *in vivo* fertility of rabbit spermatozoa after chilled storage. *Animal Reproduction Science.*, 147(3): 135-143.

PHỤ LỤC

**TÓM TẮT QUY TRÌNH SẢN XUẤT
VIÊN NANG TRƯỜNG XUÂN CB**

HỌC VIỆN QUÂN Y
TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG SẢN XUẤT THUỐC

**QUY TRÌNH BẢO CHẾ VIÊN NANG
TRƯỜNG XUÂN CB**

HÀ NỘI - 2018

I. ĐẶC ĐIỂM THÀNH PHẨM

1.1. Tên thành phẩm: Viên nang cứng Trường Xuân CB (TXCB).

1.2 Chất lượng thành phẩm:

1.2.1. Tính chất:

Viên nang cứng bên trong chứa bột màu vàng nâu, khô toi, đồng nhất, có mùi thơm được liệu, vị hơi ngọt và đắng.

1.2.2. Độ rã: Không quá 15 phút.

1.2.3. Độ đồng đều khối lượng: Khối lượng trung bình thuốc trong nang $\pm 7,5\%$.

1.2.4. Giới hạn kim loại nặng: Cadimi $\leq 0,3$ mg/kg; Thủy ngân $\leq 0,1$ mg/kg; Chì $\leq 3,0$ mg/kg; Asen $\leq 1,0$ mg/kg.

1.2.5. Mất khối lượng do làm khô: Không quá 5%.

1.2.6. Định tính:

Chế phẩm phải thể hiện phép thử định tính của Tỏa dương, Thạch học tía, Ngu đại lực, Sâm cau, ba kích, Dâm dương hoắc, Câu kỷ tử và Lộc nhung.

1.2.7. Định lượng:

Hàm lượng polysaccharid trong một viên nang không được nhỏ hơn 150 mg.

Hàm lượng acid amin tổng trong một viên nang không được nhỏ hơn 4 mg.

Hàm lượng saponin tổng trong một viên nang không được nhỏ hơn 3 mg.

1.2.8. Giới hạn nhiễm khuẩn: Đạt mức 4, ĐĐVN IV - Phụ lục 13.6 - "Thử giới hạn nhiễm khuẩn" phương pháp đĩa thạch.

1.3. Trình bày, ghi nhãn và bảo quản:

- **Trình bày:** Lọ 60 viên.

- **Nhãn:** Đúng qui chế.

- **Bảo quản:** Nơi khô mát, tránh ánh sáng trực tiếp.

II. ĐẶC ĐIỂM NGUYÊN PHỤ LIỆU

Bảng 1. Đặc điểm nguyên phụ liệu

<i>Tên nguyên liệu</i>	<i>Tiêu chuẩn</i>
Bột cao khô Nấm ngọc cầu	TCCS
Bột cao khô hỗn hợp 6 dược liệu: Ba kích, Dâm dương hoắc, Câu kỷ tử, Sâm cau, Ngu ru đại lực, Thạch học tía	TCCS
Bột cao khô Lộc nhung	TCCS
Tinh bột ngô	BP 2014
Natri starchglycolat	BP 2014
Magnesi stearat	BP 2014
Aerosil	USP 38
Vỏ nang cứng số 0	TCCS

III. THIẾT BỊ

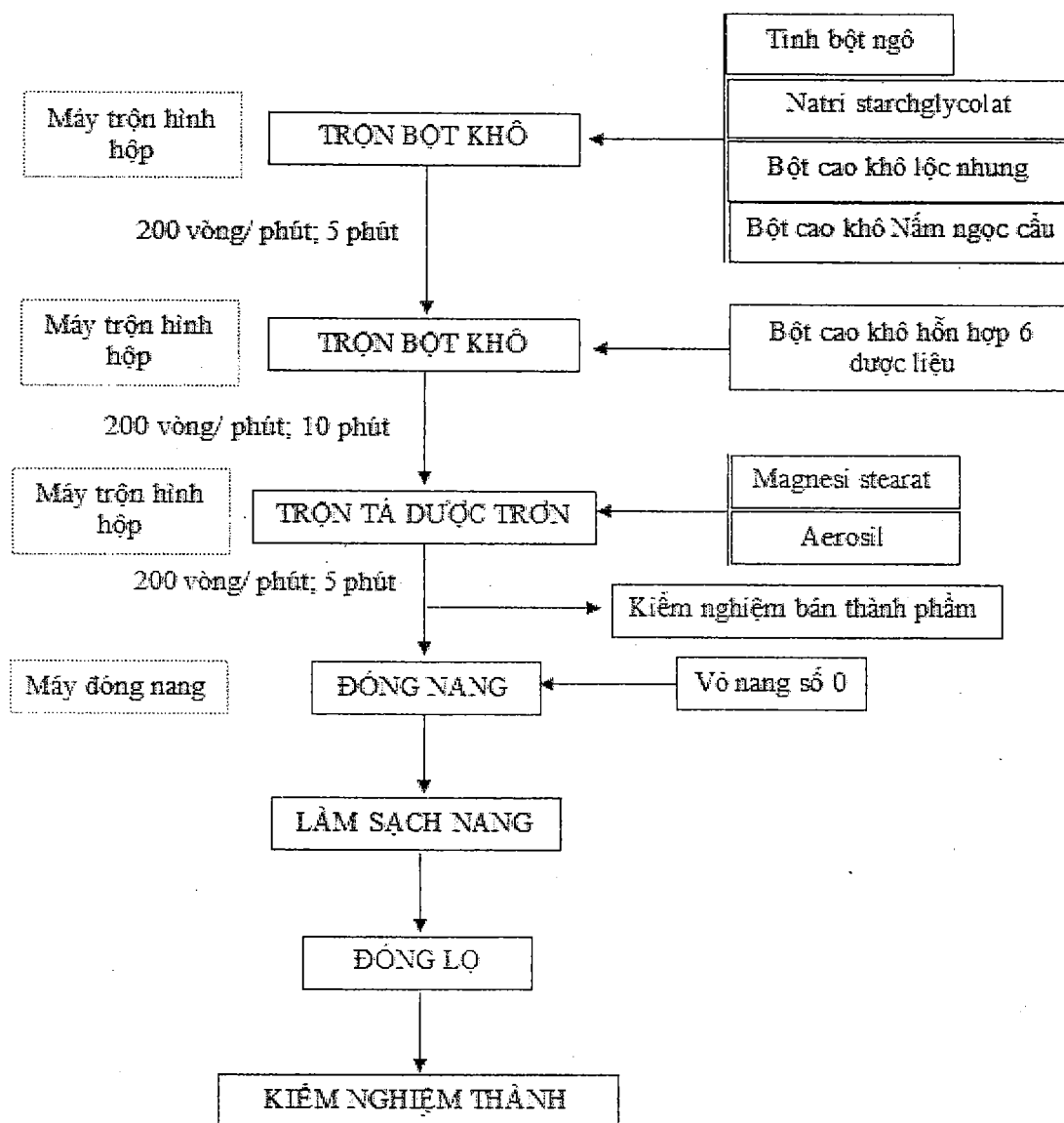
- Cân phân tích Mettler Toledo, độ chính xác 0,1mg (Thụy sỹ).
- Cân kỹ thuật Mettler Toledo 3000, độ chính xác 0,01g (Thụy sỹ).
- Máy xác định hàm ẩm tự động ADAM AMB310 (Anh).
- Tủ sấy tĩnh Ketong TDA-8001 (Trung Quốc).
- Máy trộn hình lập phương (Trung Quốc)
- Máy đóng nang KW-F2 (Trung Quốc).
- Máy làm sạch viên nang YPJ-II (Trung Quốc)

IV. CÔNG THỨC BÀO CHẾ

Bảng 2. Công thức bào chế cho mẻ 10.000 viên nang TXCB

TT	Thành phần	Tiêu chuẩn	Khối lượng	
			1 viên (mg)	10.000 viên (g)
1	Bột cao khô Nấm ngọc cầu	TCCS	75	750
2	Bột cao khô hỗn hợp 6 dược liệu: Ba kích, Dâm dương hoắc, Câu kỷ tử, Sâm cau, Ngu ru đại lực, Thạch học tía	TCCS	310	3.100
3	Bột cao khô Lộc nhung	TCCS	15	150
4	Tinh bột ngô	BP 2014	20	200
5	Natri starchglycolat	BP 2014	20	200
6	Magnesi stearat	BP 2014	7	70
7	Aerosil	USP 38	3	30
8	Vỏ nang cứng số 0	TCCS		

V. SƠ ĐỒ CÁC GIAI ĐOẠN SẢN XUẤT



Hình 1. Sơ đồ các giai đoạn sản xuất viên nang cứng TXCB

VI. MÔ TẢ QUI TRÌNH

a. Chuẩn bị nguyên phụ liệu:

+ Các nguyên liệu đạt tiêu chuẩn mới đưa vào bào chế.

+ Thiết bị, dụng cụ sạch.

+ Phòng trộn và đóng nang: Nhiệt độ, độ ẩm phòng phải đạt: nhiệt độ 25°C, độ ẩm < 30%.

- Xử lý nguyên liệu: tá dược trơn rây qua rây số 180. Các tá dược còn lại rây qua rây số 315.

b. Trộn bột:

- Cân riêng rẽ các nguyên liệu theo công thức.

- Cho tinh bột ngô, natri starch glycolat, cao lọc nhung, cao Nấm ngọc cầu vào thiết bị trộn hình hộp, trộn đều với tốc độ đầu trộn 200 vòng/ phút trong 5 phút.

- Cho tiếp bột cao khô hỗn hợp 6 dược liệu vào trộn đều với tốc độ đầu trộn 200 vòng/ phút trong 10 phút.

- Cho tiếp magnesi stearat và aerosil vào và tiếp tục trộn trong 5 phút với tốc độ 200 vòng/ phút.

- Lấy mẫu bột kiểm nghiệm bán thành phẩm.

c. Đóng nang:

- Đóng nang: Hỗn hợp bột được đóng vào nang cứng số 0 trên máy đóng nang bán tự động. Loại bỏ những nang bị lỗi.

- Làm sạch nang: Cho nang qua máy làm sạch nang 2 lần.

d. Đóng lọ:

Viên nang TXCB được đóng trong lọ nhựa, nắp kín.

e. Kiểm nghiệm thành phẩm theo tiêu chuẩn cơ sở của chế phẩm

VII. PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT, KIỂM NGHIỆM

Bảng 3. Kiểm soát, kiểm nghiệm

STT	Giai đoạn bào chế	Nội dung kiểm tra, kiểm soát	Yêu cầu
1	Nguyên liệu	Tiêu chuẩn	Đạt
2	Cân nguyên liệu	Cân đủ, đúng nguyên liệu theo công thức	Đúng
3	Trộn bột	Thứ tự trộn và thời gian trộn	Đúng
4	Kiểm nghiệm bán thành phẩm	Chỉ số Carr: 15 – 20. Khối lượng riêng: 0,76 – 0,68g/ml. Hàm ẩm: < 4%.	Đạt
5	Đóng nang	Nhiệt độ phòng 25 ⁰ C, độ ẩm phòng < 30% Hình thức viên, độ đồng đều khối lượng	Đúng

		trong khoảng: KLTB \pm 7,5%	Đạt
6	Đóng lọ	Số lượng viên, độ kín của lọ	Đúng
7	Đóng gói	Số lượng một đơn vị đóng gói, NSX. Nhân đúng qui chế	Đúng
8	Kiểm nghiệm thành phẩm	Theo TCCS	Đạt

VIII. DƯ PHÂM, PHÊ PHÂM

Bột nguyên phụ liệu và thành phẩm không đạt, rơi vãi, bắn phải hủy.

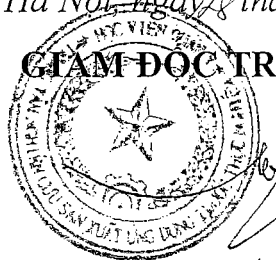
IX. CÁC HỒ SƠ LÀM VIỆC CẦN THIẾT

1. ĐĐVN IV.
2. Sổ pha chế.
3. Quy trình vận hành thiết bị.
4. Tiêu chuẩn cơ sở chế phẩm.
5. Các hồ sơ và nội qui khác có liên quan.

X. BỔ SUNG QUI TRÌNH

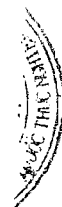
Hà Nội, ngày 20 tháng 02 năm 2018

GIÁM ĐỐC TRUNG TÂM



Trưng tá

Vũ Bình Dương



TIÊU CHUẨN CƠ SỞ
VIÊN NANG TRƯỜNG XUÂN CB

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

TT NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG SẢN XUẤT THUỐC	VIÊN NANG TXCB	TXCB - 2018
		Có hiệu lực kể từ ngày ký

PHẠM VI ÁP DỤNG:

Tiêu chuẩn chất lượng này áp dụng cho viên nang cứng TXCB do Trung tâm nghiên cứu ứng dụng sản xuất thuốc, Học viện Quân y nghiên cứu và sản xuất.

1. YÊU CẦU CHẤT LƯỢNG

1.1. Công thức

Công thức bào chế cho 1 viên nang cứng TXCB

Bột cao khô Tỏa dương	Bảy lăm miligam	75 mg
Bột cao khô hỗn hợp 6 dược liệu: Ba kích, Dâm dương hoắc, Câu kỷ tử, Sâm cau, Ngưu đại lực, Thạch học tía	Ba trăm mười miligam	310 mg
Bột cao khô Lộc nhung	Mười lăm miligam	15 mg
Tá dược (tinh bột ngô, natri starchglycolat, magnesi stearat, aerosil)	Vừa đủ một viên	

1.2. Tiêu chuẩn nguyên liệu

1.3. Chất lượng thành phẩm

1.3.1. Tính chất:

Viên nang cứng bên trong chứa bột màu vàng nâu, khô toi, đồng nhất, có mùi thơm dược liệu, vị hơi ngọt và đắng.

1.3.2. Độ rã: Không quá 30 phút.

1.3.3. Độ đồng đều khối lượng: Khối lượng trung bình thuốc trong nang \pm 7,5%.

1.3.4. Định tính:

Chế phẩm phải thể hiện phép thử định tính của Tỏa dương, Thạch học tía, Ngưu đại lực, Sâm cau, ba kích, Dâm dương hoắc, Câu kỷ tử và Lộc nhung.

1.3.5. Định lượng:

Hàm lượng polysaccharid trong một viên nang không được nhỏ hơn 150 mg.

Hàm lượng acid amin tổng trong một viên nang không được nhỏ hơn 4 mg.

1.3.6. Độ nhiễm khuẩn: Đạt mức 4, ĐĐVN IV - Phụ lục 13.6 - "Thử giới hạn nhiễm khuẩn" phương pháp đĩa thạch

2. PHƯƠNG PHÁP THỬ

2.1. Tính chất: Bằng cảm quan, chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.

2.2. Độ rã: Tiến hành theo phương pháp thử độ rã viên nén và viên nang (Phụ lục 11.6, DĐVN V).

2.3. Độ đồng đều khối lượng: Thử theo DĐVN V, PL 11.3.

2.4. Định tính:

a. Định tính sâm cau:

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel G

Dung môi khai triển: Ethyl acetat - methanol - acid formic (10 : 1 : 0,1).

Dung dịch thử: Lấy 20 viên nang bất kỳ, mở nắp nang lấy phần bột đóng trong nang, trộn đều thành hỗn hợp bột đồng nhất (HH1). Lấy 2 g bột HH1, thêm 20 ml ethanol 96% (TT), đun hồi lưu trên cách thủy 30 phút, lọc. Bay hơi dịch lọc tới cạn, hoà tan cạn trong 1 ml ethyl acetat (TT), dùng lớp trên làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 2 g bột Sâm cau (mẫu đối chiếu), tiến hành chiết như mẫu thử.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra, để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng.

Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết phát quang cùng giá trị R_f và màu sắc với vết đạt được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Hoặc phun lên bản mỏng hỗn hợp dung môi gồm dung dịch kali ferrocyanid 2% (TT) và dung dịch sắt (III) clorid 2% (TT) (1 : 1). Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết phát quang cùng giá trị R_f và màu sắc với vết đạt được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

b. Định tính ba kích:

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4)

Bản mỏng: Silicagel G

Hệ dung môi khai triển: Ether dầu : ethyl acetat : acid acetic băng (7,5 : 2,5 : 0,25)

Dung dịch thử: Lấy 20 viên nang bất kỳ, mở nắp nang lấy phần bột đóng trong nang, trộn đều thành hỗn hợp bột đồng nhất (HH1). Lấy khoảng 3 g bột HH1

thêm 10 ml nước, lắc để nước thấm đều, để yên 15 phút, thêm 40 ml methanol (TT), cho vào bình cầu miệng mài, đun sôi hồi lưu trên cách thủy trong 30 phút, lọc, làm bay hơi dung môi đến cạn. Thêm 5 ml nước và 20 ml ether dầu hỏa (TT), lắc khoảng 3 - 5 phút, để lắng, gạn lấy phần dịch chiết, làm bay hơi hết dung môi. Hòa lẫn trong 2 ml methanol (TT) làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 5 g dược liệu Ba kích (mẫu đối chiếu) và tiến hành như đối với dung dịch thử.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l dung dịch đối chiếu và dung dịch đối chiếu. Sau khi triển khai, lấy bản mỏng ra để khô ngoài không khí, phun dung dịch kali hydroxyd trong ethanol (TT). Sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết (2 - 3 vết) màu đỏ, cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

c. Định tính sâm dương hoắc:

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel H có natri carboxymethylcellulose (dung dịch 0,2 - 0,5%).

Dung môi khai triển: Ethylacetat - butanol - acid formic - nước (10:1:1:1)

Dung dịch thử: Lấy 20 viên nang bất kỳ, mở nắp nang lấy phần bột đóng trong nang, trộn đều thành hỗn hợp bột đồng nhất (HH1). Lấy 1g bột HH1, thêm 10 ml ethanol 96% (TT), ngâm nóng trong 30 phút, lọc, cô bốc hơi dịch lọc tới khô. Hoà tan cạn trong 1 ml ethanol 96% (TT).

Dung dịch đối chiếu: Dùng 0,5 g bột Sâm dương hoắc (mẫu đối chiếu), tiến hành chiết như dung dịch thử.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ L mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký xong, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí rồi quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết cùng màu (màu đỏ thẫm) và giá trị R_f với vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu, khi phun dung dịch nhôm clorid 10% trong ethanol (TT) vết màu đỏ thẫm sẽ chuyển sang màu da cam hoặc/và trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết cùng màu sắc và giá trị R_f với vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

d. Định tính câu kỷ tử:

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4)

Bản mỏng: Silica gel G

Dung môi khai triển: Cloroform-ethyl acetat-acid formic (2 : 3 : 1).

Dung dịch thử: Lấy 20 viên nang bất kỳ, mở nắp nang lấy phần bột đóng trong nang, trộn đều thành hỗn hợp bột đồng nhất (HH1). Lấy 1g bột HH1 cho vào bình nón 50ml, thêm 20 ml nước, đun cách thủy trong 20 phút, để nguội, lọc lấy dịch lọc. Chiết dịch lọc với 15 ml ethyl acetat (TT) (3 lần, mỗi lần 5 ml). Gộp chung dịch chiết ethyl acetat, bay hơi đến gần trên cách thủy. Hòa tan cặn với 1 ml ethyl acetat (TT), được dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy khoảng 0,5 g bột Câu kỷ tử (mẫu đối chiếu), chiết như mẫu thử.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5 μ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Sau khi triển khai xong, lấy bản mỏng ra để khô ở nhiệt độ phòng, quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 365 nm. Sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

e. Định tính thạch học tía:

Sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4)

Bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄.

Dung môi khai triển: Ether : Ethyl acetat : Acid formic (5 : 4 : 0,1).

Dung dịch thử: Lấy 20 viên nang bất kỳ, mở nắp nang lấy phần bột đóng trong nang, trộn đều thành hỗn hợp bột đồng nhất (HH1). Đun hồi lưu 2 g bột HH1 với 20 ml nước cất trong 30 phút. Lọc. Dịch lọc được cô đến khoảng 1ml làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 5g dược liệu (mẫu đối chiếu) tiến hành như dung dịch thử.

Cách tiến hành: chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Sau khi triển khai, để khô bản mỏng ngoài không khí ở nhiệt độ phòng sau đó hiện màu bằng dung dịch acid sulfuric trong ethanol.

Kết quả: trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

f. Định tính ngưi đại lục:

Sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4)

Bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄.

Dung môi khai triển: Dicloromethan : methanol (10 : 1)

Dung dịch thử: Lấy 20 viên nang bất kỳ, mở nắp nang lấy phần bột đóng trong nang, trộn đều thành hỗn hợp bột đồng nhất (HH1). Cho khoảng 2 g bột HH1

vào 20 ml ethanol, siêu âm trong 30 phút, lọc qua màng lọc thu phần dịch trong. Dịch lọc được cô đến khoảng 1ml làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 5g dược liệu (mẫu đối chiếu) tiến hành như dung dịch thử.

Cách tiến hành: chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Sau khi triển khai, để khô bản mỏng ngoài không khí ở nhiệt độ phòng sau đó hiện màu bằng dung dịch acid sulfuric trong ethanol.

Kết quả: trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

g. Định tính Tủa dương:

Sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4)

Bản mỏng silica gel 60 F254.

Dung môi khai triển: Toluene : Ethyl acetat : Acid formic (20 : 4 : 0,5)

Dung dịch thử: Lấy 20 viên nang bất kỳ, mở nắp nang lấy phần bột đóng trong nang, trộn đều thành hỗn hợp bột đồng nhất (HH1). Đun hồi lưu 0,5 g bột HH1 với 20 ml nước cất trong 30 phút, lọc. Dịch lọc được cô đến khoảng 1ml làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 5g dược liệu (mẫu đối chiếu) tiến hành như dung dịch thử.

Cách tiến hành: chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Sau khi triển khai, để khô bản mỏng ngoài không khí ở nhiệt độ phòng sau đó hiện màu bằng dung dịch acid sulfuric trong ethanol.

Kết quả: trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

h. Định tính testosterone bằng HPLC:

Bản mỏng: Silica gel G, dùng dung dịch natri carboxymethylcellulose 0,2 % đến 0,5 % để tráng bản mỏng.

Dung môi khai triển: n-Butanol - acid acetic băng - nước (3 : 1 : 1).

Dung dịch thử: Lấy 20 viên nang bất kỳ, mở nắp nang lấy phần bột đóng trong nang, trộn đều thành hỗn hợp bột đồng nhất (HH1). Lấy khoảng 1g bột HH1, thêm 5 ml ethanol 70 % (TT), lắc siêu âm 15 phút, lọc, dịch lọc để chấm sắc ký.

Dung dịch đối chiếu: Lấy khoảng 0,4 g bột Lộc nhung (mẫu đối chiếu), tiến hành chiết như dung dịch thử được dung dịch đối chiếu Lộc nhung. Hòa tan glycin chuẩn trong ethanol 70 % (TT) để được dung dịch có nồng độ 2 mg/ml làm dung dịch đối chiếu glycin.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 8 μ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu Lọc nhung và 1 μ l dung dịch đối chiếu glycin, triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 12 cm đến 13 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, phun dung dịch ninhydrin 2 % trong acetone (TT), sấy ở 105 °C cho đến khi hiện rõ vết.

Trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu thử phải có vết cùng màu, cùng R_f với vết trên sắc ký đồ mẫu đối chiếu lọc nhung và mẫu đối chiếu glycin.

2.5. Định lượng

Lấy 20 viên nang bất kỳ, mở nắp nang lấy phần bột đóng trong nang, trộn đều thành hỗn hợp bột đồng nhất (HH2).

a. Định lượng polysaccharid toàn phần bằng phương pháp quang phổ UV-Vis.

* Chuẩn bị mẫu chuẩn:

- Pha dung dịch chuẩn glucose gốc có nồng độ 100 μ g/ml. Tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn để được dung dịch chuẩn có nồng độ khoảng 40 μ g/ml.

- Thực hiện phản ứng thủy phân glucose bằng acid sulfuric đặc: Hút chính xác 1ml các dung dịch chuẩn vào ống nghiệm. Thêm 1ml dung dịch phenol 5%. Cuối cùng thêm chính xác 5ml dung dịch acid sulfuric đặc. Lắc đều, sau đó đun nóng cách thủy hỗn hợp ở nhiệt độ 90°C trong 15 phút để phản ứng thủy phân diễn ra hoàn toàn. Làm lạnh nhanh trong 10 phút để nhiệt độ của hỗn hợp ổn định.

- Mẫu trắng được chuẩn bị tương tự mẫu chuẩn nhưng thay dung dịch glucose chuẩn bằng nước cất.

- Đo mật độ quang của dãy chuẩn ở bước sóng 488nm.

* Chuẩn bị mẫu thử:

- Lấy 20 viên nang bất kỳ. Cân xác định khối lượng trung bình thuốc đóng trong 20 viên. Trộn đều bột trong 20 viên (hỗn hợp bột A). Cân chính xác khoảng 450mg hỗn hợp bột A cho vào cốc có mỏ 250ml. Thêm khoảng 80ml nước vào, siêu âm ở nhiệt độ 60°C trong 30 phút, thỉnh thoảng khuấy đều rồi chuyển sang bình định mức 100ml. Dùng khoảng 10ml nước nóng để tráng cốc có mỏ, cho vào bình định mức. Sau khi để dịch hòa tan nguội về nhiệt độ phòng thì thêm nước cất vừa đủ 100ml, lắc đều. Lọc dịch hòa tan qua giấy lọc có kích thước 1 - 3 μ m, bỏ khoảng 10ml dịch lọc đầu. Hút chính xác 1ml dịch lọc cho vào bình định mức 25ml, thêm nước cất vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc dung dịch qua màng lọc 0,45 μ m thu được dung dịch thử.

- Thực hiện phản ứng thủy phân bằng acid sulfuric đặc: Hút chính xác 1ml dung dịch thử rồi tiến hành phản ứng thủy phân tương tự như mẫu chuẩn.

- Đo mật độ quang ở bước sóng 488nm.

- Làm mẫu trắng song song với mẫu thử, chỉ khác là có tá dược nhưng không có các cao dược liệu.

- Hàm lượng polysaccharid toàn phần (theo glucose) tính theo công thức sau:

$$HL \text{ (mg)} = \frac{A_t \times C_c \times 50 \times 100 \times m_v}{A_c \times m_t \times 1000}$$

Trong đó:

HL: Hàm lượng polysaccharid toàn phần tính theo glucose trong viên (mg)

A_t, A_c : Độ hấp thụ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn

C_c : Nồng độ dung dịch chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)

m_t : Khối lượng mẫu thử (mg)

m_v : Khối lượng trung bình thuốc đóng trong nang (mg).

b. Định lượng acid amin tổng bằng phương pháp quang phổ UV-VIS:

- *Dung dịch thử*:

Lấy 20 viên nang bất kỳ. Cân xác định khối lượng trung bình thuốc đóng trong 20 viên. Trộn đều bột trong 20 viên (hỗn hợp bột A). Cân chính xác khoảng 600mg hỗn hợp bột A, cho vào cốc có mỏ 100ml. Thêm khoảng 40ml nước vào, siêu âm trong 30 phút, rồi chuyển sang bình định mức 50ml. Dùng khoảng 2ml nước để tráng cốc có mỏ (3 lần) cho vào bình định mức. Thêm nước cất vừa đủ 50ml, lắc đều. Lọc dịch hòa tan qua giấy lọc có kích thước 1 - 3 μm . Hút chính xác 1ml dịch lọc cho vào bình định mức 20ml, thêm nước cất vừa đủ đến vạch, lắc đều.

Mẫu trắng được làm song song với mẫu thử nhưng chỉ có tá dược mà không có các cao dược chất.

Hút chính xác 4ml dung dịch đã pha loãng ở trên cho vào ống nghiệm sạch, thêm 3ml thuốc thử Ninhydrin, đun ở 80°C trong 30 phút, lấy ra làm lạnh bằng nước đá trong 20 phút, thêm 6ml cồn 50° rồi đem đo quang phổ UV-VIS ở $\lambda = 570\text{nm}$.

- *Dung dịch chuẩn*: Sử dụng dung dịch chuẩn Leucin trong nước có nồng độ 5 $\mu\text{g/ml}$ và tiến hành phản ứng như dung dịch thử.

Hàm lượng acid amin tổng được tính theo công thức:

$$HL \text{ (mg)} = \frac{A_t \times C_c \times 50 \times 20 \times m_v}{A_c \times m_t \times 1000}$$

Trong đó:

HL: Hàm lượng acid amin tổng tính theo Leucin (mg)

A_t, A_c : Độ hấp thụ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn

C_c : Nồng độ dung dịch chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)

m_t : Khối lượng mẫu thử (mg)

m_v : Khối lượng trung bình của 20 viên (mg)

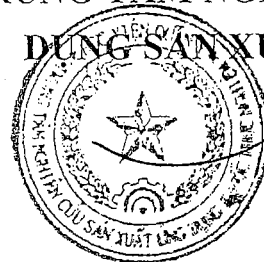
2.6. **Độ nhiễm khuẩn:** thử theo ĐĐVN IV - Phụ lục 13.6 – Thử giới hạn nhiễm khuẩn.

3. ĐÓNG GÓI, GHI NHÃN, BẢO QUẢN

- Đóng gói: Sản phẩm dược đóng trong bao bì kín, tránh ánh sáng.
- Ghi nhãn: Nhãn trình bày rõ ràng, đúng quy chế.
- Bảo quản: Nơi khô ráo, thoáng mát, tránh ánh sáng trực tiếp.

Hà Nội, ngày 28 tháng 02 năm 2018.

TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU ỨNG
DỤNG SẢN XUẤT THUỐC



Trung tá
Vũ Bình Dương

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CÁC BỘT CAO KHÔ

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

HỌC VIỆN QUÂN Y TT NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG SẢN XUẤT THUỐC	BỘT CAO KHÔ HH-CB	BCK - HH - 2018
		Có hiệu lực kể từ ngày ký

1. YÊU CẦU CHẤT LƯỢNG

1.1. Bào chế: Bột cao khô HH-CB là bột cao khô của hỗn hợp sáu vị dược liệu (Thạch học tía, Ngưu đại lực, Sâm cau, Ba kích, Dâm dương hoắc, Câu kỷ tử) được chiết xuất bằng phương pháp chiết nóng với nước và bào chế bột khô bằng phương pháp phun sấy.

1.2. Chất lượng thành phẩm:

1.2.1. Tính chất: Khối bột khô toi, màu nâu, đồng nhất, vị hơi đắng.

1.2.2. Mất khối lượng do làm khô: Không quá 5%.

1.2.3. Độ mịn: Lấy 20g chế phẩm, rây qua rây số 125, số phần tử qua được rây không ít hơn 95%.

1.2.4. Độ đồng nhất: Chế phẩm phải đồng nhất, không được có màu lốm đốm.

1.2.5. Tro toàn phần: Không quá 15,0%.

1.2.6. Kim loại nặng: Không quá 10 ppm.

1.2.7. Định tính: Chế phẩm phải thể hiện phép thử định tính của Sâm cau, Ba kích, Dâm dương hoắc, Câu kỷ tử, Thạch học tía, Ngưu đại lực.

1.2.8. Định lượng: Hàm lượng polysaccharid toàn phần trong bột cao không được nhỏ hơn 400 mg/g.

1.2.9. Độ nhiễm khuẩn: Đạt mức 4, ĐĐVN IV - Phụ lục 13.6 - "Thử giới hạn nhiễm khuẩn" phương pháp đĩa thạch.

2. PHƯƠNG PHÁP THỬ

2.1. Tính chất: Bằng cảm quan, chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.

2.2. Mất khối lượng do làm khô: Thử theo Phụ lục 9.6 - ĐĐVN IV. Dùng 2g chế phẩm sấy ở 105°C, áp suất thường trong 4 giờ.

2.3. Độ mịn: Tiến hành theo phương pháp của ĐĐVN IV, Phụ lục 3.5.

2.4. Độ đồng nhất: Lấy 20 g chế phẩm, cho vào tờ giấy trắng đặt trong khay men, dùng một thìa nhấn ấn nhẹ trên mặt lớp bột, thành một vệt lõm. Quan sát vị trí vệt, màu của chế phẩm phải đồng nhất, không được có màu lốm đốm.

2.5. Tro toàn phần: Lấy 1g chế phẩm, tiến hành theo phương pháp 2, phụ lục 9.8, ĐDVN IV.

2.6. Kim loại nặng: Lấy 1,0 g chế phẩm, tiến hành theo phương pháp 3, phụ lục 9.4.8, ĐDVN IV. Dùng 2,0 ml dung dịch chỉ mẫu 10 phần-triệu (TT) để chuẩn bị mẫu đối chiếu

2.7. Định tính

a. Định tính sâm cau:

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel G

Dung môi khai triển: Ethyl acetat - methanol - acid formic (10 : 1 : 0,1).

Dung dịch thử: Lấy 2 g bột cao khô, thêm 20 ml ethanol 96% (TT), đun hồi lưu trên cách thủy 30 phút, lọc. Bay hơi dịch lọc tới gần, hoà tan gần trong 1 ml ethyl acetat (TT), dùng lớp trên làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 2 g bột Sâm cau (mẫu đối chiếu), tiến hành chiết như mẫu thử.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra, để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng.

Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết phát quang cùng giá trị R_f và màu sắc với vết đạt được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Hoặc phun lên bản mỏng hỗn hợp dung môi gồm dung dịch kali ferrocyanid 2% (TT) và dung dịch sắt (III) clorid 2% (TT) (1 : 1). Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết phát quang cùng giá trị R_f và màu sắc với vết đạt được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

b. Định tính ba kích:

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4)

Bản mỏng: Silicagel G

Hệ dung môi khai triển: Ether dầu : ethyl acetat : acid acetic băng (7,5 : 2,5 : 0,25)

Dung dịch thử: Lấy khoảng 2 g bột cao khô thêm 10 ml nước, lắc để nước thấm đều dược liệu, để yên 15 phút, nghiền dược liệu trong cối sứ thành bột ướt, thêm 40 ml methanol (TT), cho vào bình cầu miệng mài, đun sôi hồi lưu trên cách thủy trong 30 phút, lọc, làm bay hơi dung môi đến cạn. Thêm 5 ml nước và 20 ml ether dầu hòa (TT), lắc khoảng 3 - 5 phút, để lắng, gạn lấy phần dịch chiết, làm bay hơi hết dung môi. Hòa lẫn trong 2 ml methanol (TT) làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 5 g dược liệu Ba kích (mẫu đối chiếu) và tiến hành như đối với dung dịch thử.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l dung dịch đối chiếu và dung dịch thử. Sau khi triển khai, lấy bản mỏng ra để khô ngoài không khí, phun dung dịch kali hydroxyd trong ethanol (TT). Sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết (2 - 3 vết) màu đỏ, cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

c. Định tính dâm dương hoắc:

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel H có natri carboxymethylcellulose (dung dịch 0,2 - 0,5%).

Dung môi khai triển: Ethylacetat – butanol – acid formic – nước (10:1:1:1)

Dung dịch thử: Lấy 0,5 g bột cao khô, thêm 10 ml ethanol 96% (TT), ngâm nóng trong 30 phút, lọc, cô bốc hơi dịch lọc tới khô. Hoà tan cạn trong 1 ml ethanol 96% (TT).

Dung dịch đối chiếu: Dùng 0,5 g bột Dâm dương hoắc (mẫu đối chiếu), tiến hành chiết như dung dịch thử.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ L mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký xong, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí rồi quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết cùng màu (màu đỏ thẫm) và giá trị R_f với vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu, khi phun dung dịch nhôm clorid 10% trong ethanol (TT) vết màu đỏ thẫm sẽ chuyển sang màu da cam hoặc/và trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết cùng màu sắc và giá trị R_f với vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

d. Định tính câu kỹ tử:

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4)

Bản mỏng: Silica gel G

Dung môi khai triển: Cloroform-ethyl acetat-acid formic (2 : 3 : 1).

Dung dịch thử: Lấy 0,5 g bột cao khô cho vào bình nón 50ml, thêm 20 ml nước, đun cách thủy trong 20 phút, để nguội, lọc lấy dịch lọc. Chiết dịch lọc với 15 ml ethyl acetat (TT) (3 lần, mỗi lần 5 ml). Gộp chung dịch chiết ethyl acetat, bay hơi đến gần cạn cách thủy. Hòa tan cặn với 1 ml ethyl acetat (TT), được dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy khoảng 0,5 g bột Câu kỹ tử (mẫu đối chiếu), chiết như mẫu thử

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5 μ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Sau khi triển khai xong, lấy bản mỏng ra để khô ở nhiệt độ phòng, quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 365 nm. Sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

e. Định tính thạch học tía:

Sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4)

Bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄.

Dung môi khai triển: Ether : Ethyl acetat : Acid formic (5 : 4 : 0,1).

Dung dịch thử: đun hồi lưu 2 g bột cao khô hỗn hợp liệu với 20 ml nước cất trong 30 phút. Lọc. Dịch lọc được cô đến khoảng 1ml làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 5g dược liệu (mẫu chuẩn) tiến hành như dung dịch thử.

Cách tiến hành: chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Sau khi triển khai, để khô bản mỏng ngoài không khí ở nhiệt độ phòng sau đó hiện màu bằng dung dịch acid sulfuric trong ethanol.

Kết quả: trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

f. Định tính ngưi đại lực:

Sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4)

Bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄.

Dung môi khai triển: Dicloromethan : methanol (10 : 1)

Dung dịch thử: Cho khoảng 2 g bột cao khô vào 20 ml ethanol, siêu âm trong 30 phút, lọc qua màng lọc thu phần dịch trong. Dịch lọc được cô đến khoảng 1ml làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 5g dược liệu (mẫu đối chiếu) tiến hành như dung dịch thử.

Cách tiến hành: chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Sau khi triển khai, để khô bản mỏng ngoài không khí ở nhiệt độ phòng sau đó hiện màu bằng dung dịch acid sulfuric trong ethanol.

Kết quả: trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

2.8. Định lượng

Tiến hành định lượng polysaccharid toàn phần bằng phương pháp quang phổ UV-Vis.

* Chuẩn bị mẫu chuẩn:

- Pha dung dịch chuẩn glucose gốc trong nước có nồng độ khoảng 100 μ g/ml. Tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn gốc thành dãy các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 10 μ g/ml đến 70 μ g/ml.

- Thực hiện phản ứng thủy phân glucose bằng acid sulfuric đặc: Hút chính xác 1ml các dung dịch chuẩn vào ống nghiệm. Thêm 1ml dung dịch phenol 5%. Cuối cùng thêm chính xác 5ml dung dịch acid sulfuric đặc. Lắc đều, sau đó đun nóng cách thủy hỗn hợp ở nhiệt độ 90 $^{\circ}$ C trong 15 phút để phản ứng thủy phân diễn ra hoàn toàn. Làm lạnh nhanh trong 10 phút để nhiệt độ của hỗn hợp ổn định.

- Mẫu trắng được chuẩn bị tương tự mẫu chuẩn nhưng thay dung dịch glucose chuẩn bằng nước cất.

- Đo mật độ quang của dãy chuẩn ở bước sóng 488nm.

- Xây dựng đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa mật độ quang và nồng độ của dung dịch glucose chuẩn.

* Chuẩn bị mẫu thử:

- Cân chính xác 200 mg bột cao khô cho vào bình định mức 50ml. Thêm chính xác 50 ml nước cất, cân ghi khối lượng. Tiến hành siêu âm ở 70 $^{\circ}$ C trong 30 phút. Để nguội, cân bù khối lượng bằng nước cất, lắc đều. Lọc qua giấy lọc thu lấy phần dịch trong. Hút chính xác 1ml dịch lọc cho vào bình định mức 50ml, thêm

nước cất vừa đủ đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 1ml dung dịch trên cho vào ống nghiệm, sau đó tiến hành phản ứng thủy phân tương tự như đối với mẫu chuẩn.

- Đo mật độ quang ở bước sóng 488nm.
- Căn cứ vào đường chuẩn để tính ra hàm lượng polysaccharid toàn phần (tính theo glucose) trong dược liệu khô kiệt.

2.9. Độ nhiễm khuẩn

Tiến hành theo phương pháp thử giới hạn nhiễm khuẩn (Phụ lục 13.6, ĐVN IV).

3. ĐÓNG GÓI, GHI NHÃN, BẢO QUẢN

- Đóng gói: Sản phẩm dược đóng trong bao bì kín, tránh ánh sáng.
- Ghi nhãn: Nhãn trình bày rõ ràng, đúng quy chế.
- Bảo quản: Nơi khô ráo, thoáng mát, tránh ánh sáng trực tiếp.

Hà Nội, ngày 25 tháng 01 năm 2018.

**TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU ỨNG
DỤNG SẢN XUẤT THUỐC**



(Handwritten signature)

Trung tá
Nữ Bình Dương

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

HỌC VIỆN QUÂN Y TRUNG TÂM NCSX THUỐC	CAO KHÔ LỘC NHUNG	Ký mã hiệu: CLN-TCCS03 Có hiệu lực từ ngày ký.
---	------------------------------	---

* Nguồn gốc: Là sản phẩm được chiết xuất, phun sấy bào chế thành cao khô từ lộc nhung.

1. Yêu cầu chất lượng:

1.1. Tính chất:

Là dạng bột khô tơi, màu nâu nhạt, mùi hơi tanh, vị hơi mặn, không bị nấm mốc, dễ bị hút ẩm khi để ngoài không khí.

1.2. Độ ẩm: Không quá 5,0%.

1.3. Hình thái kích thước tiểu phân: hình cầu, bề mặt nhẵn nheo, xốp; hình ảnh kích thước chụp dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) $\leq 200 \mu\text{m}$.

1.4. Tro toàn phần: Không quá 5%.

1.5. Tro không tan trong acid: Không quá 1%.

1.6. Định tính: Chế phẩm phải thể hiện phép thử định tính đặc trưng của lộc nhung và testosterone.

* **Định tính lộc nhung:**

a. **Phản ứng hóa học:** phải cho phản ứng đặc trưng của acid amin

b. **Phương pháp SKLM:**

Trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu thử phải có vết cùng màu, cùng R_f với vết trên sắc ký đồ mẫu đối chiếu lộc nhung và mẫu đối chiếu glycin.

* **Định tính testosterone bằng HPLC:**

Trên sắc ký đồ của mẫu thử phải xuất hiện pic có thời gian lưu trùng với pic trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn.

1.7. Định lượng: Hàm lượng acid amin tổng $\geq 350 \text{ mg/g}$ so với khối lượng cao khô tuyệt đối tính theo Leucin.

1.8. Giới hạn nhiễm khuẩn: Phải đạt yêu cầu mức 4 (ĐBVN IV)

1.9. Giới hạn kim loại nặng: Không quá 10 ppm.

2. Phương pháp thử

2.1. Tính chất: Thử bằng cảm quan chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.

2.2. Độ ẩm: Tiến hành theo DDVN IV, phụ lục 9.6 (2 g, 105 °C, 4 giờ).

2.3. Hình thái kích thước tiểu phân:

Chụp khối bột dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM): Bột cao khô ĐTHT phải có dạng hình cầu bề mặt nhẵn nheo, xốp, hình ảnh kích thước chụp SEM $\leq 200 \mu\text{m}$.

2.4. Tro toàn phần:

Cân chính xác khoảng 1g bột cao khô đồng trùng hạ thảo, tiến hành thử theo DDVN IV, phụ lục 9.8.

2.5. Tro không tan trong acid:

Tiến hành theo DDVN IV, phụ lục 9.7 (phương pháp 1).

2.6. Định tính:

a. Định tính lọc nhung:

a.1. Phản ứng hóa học:

Lấy khoảng 0,05 g bột cao khô, thêm 4 ml nước, đun nóng 15 phút, để nguội, lọc. Lấy 1 ml dịch lọc, thêm 3 giọt thuốc thử ninhydrin (TT), trộn đều, đun sôi vài phút, màu tím hơi xanh xuất hiện. Lấy 1 ml dịch lọc khác, thêm 2 giọt dung dịch natri hydroxyd 10 % (TT), trộn đều, thêm từng giọt dung dịch đồng sulfat 0,5 % (TT), xuất hiện màu tím hơi xanh.

a.2. Phương pháp SKLM:

Bản mỏng: Silica gel G, dùng dung dịch natri carboxymethylcellulose 0,2 % đến 0,5 % để tráng bản mỏng.

Dung môi khai triển: n-Butanol - acid acetic băng - nước (3 : 1 : 1).

Dung dịch thử: Lấy 0,2 g bột cao khô, thêm 5 ml ethanol 70 % (TT), lắc siêu âm 15 phút, lọc, dịch lọc để chấm sắc ký.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 0,4 g bột Lọc nhung (mẫu đối chiếu), tiến hành chiết như dung dịch thử được dung dịch đối chiếu Lọc nhung. Hòa tan

glycin chuẩn trong ethanol 70 % (TT) để được dung dịch có nồng độ 2 mg/ml làm dung dịch đối chiếu glycin.

Cách tiến hành: Châm riêng biệt lên bản mỏng 8 μ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu Lộc nhung và 1 μ l dung dịch đối chiếu glycin, triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 12 cm đến 13 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, phun dung dịch ninhydrin 2 % trong aceton (TT), sấy ở 105 °C cho đến khi hiện rõ vết.

Trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu thử phải có vết cùng màu, cùng R_f với vết trên sắc ký đồ mẫu đối chiếu lộc nhung và mẫu đối chiếu glycin.

b. Định tính testosterone bằng HPLC:

** Điều kiện sắc ký:*

- Cột sắc ký: SunFire RP-C18 (250 \times 4,6 mm; 5 μ m, 100A^o).
- Detector UV đo ở bước sóng 254 nm.
- Pha động: ACN : Nước, chạy theo chương trình gradient (0 \rightarrow 20 phút, 30% ACN \rightarrow 60% ACN; 20 \rightarrow 30 phút, 60% ACN; 30 \rightarrow 35 phút, 60% ACN \rightarrow 30% ACN)
- Tốc độ dòng: 0,8 ml/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μ l.
- Nhiệt độ cột: 30°C.

** Chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch chuẩn:*

- *Dung dịch thử:* Cân chính xác khoảng 15,0 gam bột cao khô Lộc nhung đã vào bình nón có nút mài, chiết siêu âm bằng EtOH 90% trong 2 giờ ở 60°C (40 ml \times 2 lần). Ly tâm (5000 vòng/phút \times 5 phút) lấy dịch chiết. Gộp dịch chiết 2 lần vào bình định mức 100 ml, bổ sung vừa đủ thể tích. Hút chính xác 20 ml dịch chiết cho vào bình cô quay chân không đến cạn. Hòa tan căn bằng 2 ml MeOH 25%, chuyển vào cột chiết pha rắn SPE đã được hoạt hóa trước (5 ml MeOH 25% \times 2 lần, 5 ml nước cất). Rửa loại tạp chất bằng 5ml nước cất \times 2 lần. Rửa giải bằng 2 ml MeOH. Tất cả các bước loại

tạp và rửa giải trên được thực hiện với tốc độ 30 – 45 giọt/phút. Dem dịch rửa giải cô dưới áp suất giảm ở 60°C tới cạn, hòa tan cạn trong 1ml MeOH, lọc qua màng 0,45 µm.

- *Dung dịch chuẩn*: Dung dịch chuẩn testosterone có nồng độ 1µg/ml.

* *Cách tiến hành*:

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào máy sắc ký.

Trên sắc ký đồ của mẫu thử phải xuất hiện pic có thời gian lưu trùng với pic trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn.

2.7. Định lượng:

Định lượng acid amin tổng bằng phương pháp quang phổ UV-VIS:

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 1 g bột cao khô Lộc nhung, thêm 20 ml nước cất, lắc siêu âm. Lọc qua giấy lọc, dịch lọc được định mức thành 20 ml (dung dịch A). Hút chính xác 1,0 ml dung dịch A vào bình 50 ml, bổ sung nước cất vừa đủ (dung dịch B). Hút chính xác 1,0 ml dung dịch B định mức thành 50 ml.

Hút chính xác 4ml dung dịch đã pha loãng ở trên cho vào ống nghiệm sạch, thêm 3ml thuốc thử Ninhydrin, đun ở 80°C trong 30 phút, lấy ra làm lạnh bằng nước đá trong 20 phút, thêm 6ml cồn 50° rồi đem đo quang phổ UV-VIS ở $\lambda = 570\text{nm}$.

Dung dịch chuẩn: Sử dụng dung dịch chuẩn Leucin trong nước có nồng độ 5 µg/ml và tiến hành phản ứng như dung dịch thử.

Hàm lượng acid amin tổng được tính theo công thức:

$$X \text{ (mg/g)} = \frac{A_t \times C_c \times 50 \times 100}{A_c \times m_t \times (100 - h)}$$

Trong đó:

X: Hàm lượng acid amin tổng tính theo Leucin so với khối lượng bột cao khô tuyệt đối (mg/g)

A_t, A_c : Độ hấp thụ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn

C_c : Nồng độ dung dịch chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)

m_t : Khối lượng mẫu thử (g)

h: Độ ẩm của bột cao khô (%)

2.8. Giới hạn nhiễm khuẩn:

Thử theo ĐĐVN IV, phụ lục 13.6 “Thử giới hạn nhiễm khuẩn”, phương pháp đĩa thạch.

2.9. Giới hạn kim loại nặng:

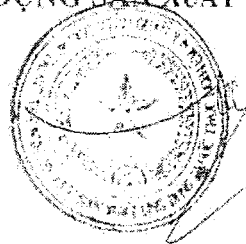
Tiến hành theo phương pháp của ĐĐVN IV (phụ lục 9.4.8).

3. Đóng gói, bảo quản:

- Đóng trong túi PE 2 lớp, có nhãn đúng quy định.
- Để nơi khô mát, tránh ánh sáng.

Hà Nội, ngày 25 tháng 01 năm 2018

TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU ỨNG
DỤNG SẢN XUẤT THUỐC



Trung tá
Vu Đình Dương

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

HỌC VIỆN QUẢN LÝ TT NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG SẢN XUẤT THUỐC	BỘT CAO KHÔ TỎA DƯƠNG	BCK - TD - 2018
		Có hiệu lực kể từ ngày ký

1. YÊU CẦU CHẤT LƯỢNG

1.1. Bào chế: Bột cao khô Tỏa dương được bào chế từ cây Tỏa dương (*Balanophora indica* (Arnott) Griff, thuộc họ Dó đất Balanophoraceae), theo phương pháp chiết nóng với nước, cô dịch chiết, loại tạp và phun sấy tạo bột khô.

1.2. Chất lượng thành phẩm:

1.2.1. Tính chất: Khối bột khô toai, màu nâu, đồng nhất, vị hơi đắng, dễ hút ẩm ngoài không khí.

1.2.2. Mất khối lượng do làm khô: Không quá 5%.

1.2.3. Độ mịn: Lấy 20g chế phẩm, rây qua rây số 125, số phần tử qua được rây không ít hơn 95%.

1.2.4. Độ đồng nhất: Chế phẩm phải đồng nhất, không được có màu lốm đốm.

1.2.5. Tro toàn phần: Không quá 15,0%.

1.2.6. Kim loại nặng: Không quá 20,0%.

1.2.7. Định tính: Chế phẩm phải thể hiện phép thử định tính của Tỏa dương.

1.2.8. Định lượng: Hàm lượng polysaccharid trong bột cao khô Tỏa dương không được nhỏ hơn 500 mg/g.

1.2.9. Độ nhiễm khuẩn: Đạt mức 4, ĐĐVN IV - Phụ lục 13.6 - "Thử giới hạn nhiễm khuẩn" phương pháp đĩa thạch.

2. PHƯƠNG PHÁP THỬ

2.1. Tính chất: Bằng cảm quan, chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.

2.2. Mất khối lượng do làm khô: Thử theo Phụ lục 9.6 - ĐĐVN IV. Dùng 2g chế phẩm sấy ở 105⁰C, áp suất thường trong 4 giờ.

2.3. Độ mịn: Tiến hành theo phương pháp của ĐĐVN IV, Phụ lục 3.5.

2.4. Độ đồng nhất: Lấy 20 g chế phẩm, cho vào tờ giấy trắng đặt trong khay men, dùng một thìa nhẵn ấn nhẹ trên mặt lớp bột, thành một vết lõm. Quan sát vị trí vết, màu của chế phẩm phải đồng nhất, không được có màu lốm đốm.

2.5. Tro toàn phần: Lấy 1g chế phẩm, tiến hành theo phương pháp 2, phụ lục 9.8, ĐĐVN IV.

2.6. Kim loại nặng: Lấy 1,0 g chế phẩm, tiến hành theo phương pháp 3, phụ lục 9.4.8, ĐĐVN IV. Dùng 2,0 ml dung dịch chỉ mẫu 10 phần triệu (TT) để chuẩn bị mẫu đối chiếu

2.7. Định tính

Sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4)

Bản mỏng silica gel 60 F254.

Dung môi khai triển: Toluene : Ethyl acetat : Acid formic (20 : 4 : 0,5)

Dung dịch thử: đun hồi lưu 0,5 g bột cao khô với 20 ml nước cất trong 30 phút, lọc. Dịch lọc được cô đến khoảng 1ml làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 5g dược liệu (mẫu đối chiếu) tiến hành như dung dịch thử.

Cách tiến hành: chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Sau khi triển khai, để khô bản mỏng ngoài không khí ở nhiệt độ phòng sau đó hiện màu bằng dung dịch acid sulfuric trong ethanol.

Kết quả: trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

2.8. Định lượng

Phương pháp quang phổ UV-Vis.

** Chuẩn bị mẫu chuẩn:*

- Pha dung dịch chuẩn glucose gốc có nồng độ 100 μ g/ml. Tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn gốc thành dãy các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 10 μ g/ml đến 70 μ g/ml.

- Thực hiện phản ứng thủy phân glucose bằng acid sulfuric đặc: Hút chính xác 1ml các dung dịch chuẩn vào ống nghiệm. Thêm 1ml dung dịch phenol 5%. Cuối cùng thêm chính xác 5ml dung dịch acid sulfuric đặc. Lắc đều, sau đó đun nóng cách thủy hỗn hợp ở nhiệt độ 90⁰C trong 15 phút để phản ứng thủy phân diễn ra hoàn toàn. Làm lạnh nhanh trong 10 phút để nhiệt độ của hỗn hợp ổn định.

- Mẫu trắng được chuẩn bị tương tự mẫu chuẩn nhưng thay dung dịch glucose chuẩn bằng nước cất.

- Đo mật độ quang của dãy chuẩn ở bước sóng 488nm.

- Xây dựng đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa mật độ quang và nồng độ của dung dịch glucose chuẩn.

*** Chuẩn bị mẫu thử:**

- Cân chính xác 200 mg bột cao khô cho vào bình định mức 50ml. Thêm chính xác 50 ml nước cất, cân ghi khối lượng. Tiến hành siêu âm ở 70°C trong 30 phút. Để nguội, cân bù khối lượng bằng nước cất, lắc đều. Lọc qua giấy lọc thu lấy phần dịch trong. Hút chính xác 1ml dịch lọc cho vào bình định mức 50ml, thêm nước cất vừa đủ đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 1ml dung dịch trên cho vào ống nghiệm, sau đó tiến hành phản ứng thủy phân tương tự như đối với mẫu chuẩn.

- Đo mật độ quang ở bước sóng 488nm.

- Căn cứ vào đường chuẩn để tính ra hàm lượng polysaccharid toàn phần (tính theo glucose) trong bột cao khô.

2.9. Độ nhiễm khuẩn: thử theo ĐDVN IV - Phụ lục 13.6 – “Thử giới hạn nhiễm khuẩn” phương pháp đĩa thạch.

3. ĐÓNG GÓI, GHI NHÃN, BẢO QUẢN

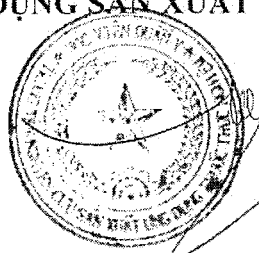
- Đóng gói: Sản phẩm được đóng trong bao bì kín, tránh ánh sáng.

- Ghi nhãn: Nhãn trình bày rõ ràng, đúng quy chế.

- Bảo quản: Nơi khô ráo, thoáng mát, tránh ánh sáng trực tiếp.

Hà Nội, ngày 25 tháng 01 năm 2018.

**TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU ỨNG
DỤNG SẢN XUẤT THUỐC**



Trung tá
Vũ Bình Dương