

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



ĐẬU THÙY DƯƠNG

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH VÀ TÁC DỤNG
TRÊN CHỨC NĂNG SINH SẢN
CỦA OS35 TRONG THỰC NGHIỆM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2018

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



ĐẬU THÙY DƯƠNG

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH VÀ TÁC DỤNG
TRÊN CHỨC NĂNG SINH SẢN
CỦA OS35 TRONG THỰC NGHIỆM**

Chuyên ngành : Dược lý và Độc chất

Mã số : 62720120

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Nguyễn Trần Thị Giáng Hương
2. PGS.TS. Lê Minh Hà

HÀ NỘI - 2018

Lời cảm ơn

Trong quá trình thực hiện luận án này, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, động viên quý báu 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 PGS.TS. Nguyễn Trần Thị Giáng Hương, Nguyên Trưởng Phòng Quản lý đào tạo đại học, Nguyên Phó Trưởng Bộ môn Dược lý, Đại học Y Hà Nội, đã hết lòng dạy dỗ, chỉ bảo, hướng dẫn tôi trong học tập, công việc, nghiên cứu khoa học và cho tôi nhiều bài học vô cùng quý giá cả trong công việc và cuộc sống ngay từ những ngày đầu tôi về bộ môn và trong quá trình thực hiện luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS. Lê Minh Hà, Phó Trưởng Phòng Hóa dược, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học công nghệ Việt Nam, đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo, tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện luận án này và cho tôi nhiều bài học về tinh thần, thái độ cũng như phương pháp nghiên cứu khoa học.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS. Phạm Thị Vân Anh, Trưởng Bộ môn Dược lý, Giám đốc Trung tâm Dược lý lâm sàng, đã tận tình dạy dỗ, hướng dẫn, tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi học tập và nghiên cứu trong suốt thời gian học nghiên cứu sinh, cũng như luôn luôn giúp đỡ, tạo cơ hội để tôi có thể phát triển chuyên môn và bản thân trong quá trình làm việc ở bộ môn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Trọng Thông, Nguyên Trưởng Bộ môn Dược lý, Nguyên Phụ trách Trung tâm Dược lý lâm sàng, Đại học Y Hà Nội, đã hết lòng dạy dỗ, chỉ bảo, tạo mọi điều kiện thuận lợi và mang đến cho tôi rất nhiều cơ hội để mở mang kiến thức và phát triển chuyên môn trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và làm việc ngay từ những ngày đầu tôi về bộ môn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS. Vũ Thị Ngọc Thanh, Nguyên Phó Trưởng Bộ môn Dược lý, Đại học Y Hà Nội, đã hết lòng dạy dỗ, chỉ bảo, tạo mọi điều kiện và hết sức quan tâm đến công việc, cuộc sống của tôi ngay từ những ngày đầu tôi về bộ môn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn TS. Đỗ Thị Nguyệt Quế, Bộ môn Dược lực, Đại học Dược Hà Nội đã tận tình giúp đỡ, hướng dẫn và tạo mọi điều kiện cho tôi trong quá trình thực hiện luận án này cũng như đã gợi mở cho tôi những hướng đi mới trong nghiên cứu khoa học.

Tôi xin trân trọng cảm ơn TS. Trần Thanh Tùng, Phó Trưởng Bộ môn Dược lý, Trưởng phòng Hành chính tổng hợp, Đại học Y Hà Nội, đã rất tận tình giúp đỡ và hướng dẫn tôi khi thực hiện luận án này.

Tôi xin cảm ơn PGS.TS. Đào Thị Vui, Trưởng Bộ môn Dược lực, Đại học Dược Hà Nội; cùng các anh chị em cán bộ giảng dạy và kỹ thuật viên ở bộ môn Dược lực, đã tạo điều kiện thuận lợi và nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu tại bộ môn.

Tôi xin cảm ơn PGS.TS. Trần Đức Phấn, Nguyên Trưởng Bộ môn Y sinh học - Di truyền, Đại học Y Hà Nội, đã tận tình chỉ bảo và hướng dẫn tôi trong quá trình thực hiện luận án này. Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS. Lương Thị Lan Anh, Trưởng Bộ môn Y sinh học - Di truyền, KTV. Lã Đình Trung, cùng các thầy cô giáo, các anh chị em ở Bộ môn Y sinh học - Di truyền, đã nhiệt tình giúp đỡ khi tôi thực hiện nghiên cứu tại bộ môn.

Tôi xin cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Mạnh Hà, Trưởng Bộ môn Mô phôi học, PGS.TS. Nguyễn Thị Bình, Nguyên Trưởng Bộ môn Mô phôi học, Đại học Y Hà Nội; TS. Cán Văn Mão, Phó Trưởng Bộ môn Sinh lý học, Học viện Quân Y, cùng các anh chị em cán bộ giảng dạy và kỹ thuật viên ở các bộ môn trên, đã tạo điều kiện

thuận lợi và nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án này.

*Tôi xin trân trọng cảm ơn **KTV. Đinh Quang Trường, KTV. Đàm Đình Tranh, KTV. Nguyễn Kiều Vân, KTV. Nguyễn Thành Long, BS. Đặng Thị Ngọc Mai, BS Trần Quỳnh Trang** và toàn thể các anh chị em, các bạn đồng nghiệp ở **Bộ môn Dược lý** và **Trung tâm Dược lý lâm sàng, Đại học Y Hà Nội**, đã luôn luôn hỗ trợ, tin tưởng, ủng hộ và giúp đỡ tôi trong công việc và cuộc sống. Được làm việc, học tập và nghiên cứu tại **Bộ môn Dược lý** và **Trung tâm Dược lý lâm sàng** thực sự là một điều vô cùng may mắn đối với tôi.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn **Ban Giám hiệu, Phòng Quản lý đào tạo Sau đại học, Đại học Y Hà Nội**, đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận án này.*

*Từ tận đáy lòng mình, con xin cảm ơn **Me**, với nghị lực phi thường và tình yêu thương vô bờ bến đã luôn luôn thấu hiểu và dành cho con tất cả để có ngày hôm nay. Cảm ơn **Bố** đã sinh thành và cho con biết như thế nào là vượt qua khó khăn, thử thách. Cảm ơn **gia đình bên chồng** đã luôn luôn ủng hộ và hỗ trợ. Cảm ơn **Chồng** là người bạn đồng hành tuyệt vời nhất trong những năm tháng qua và trong những năm tháng sắp tới. Cảm ơn **các Con yêu** là nguồn hạnh phúc và nguồn động viên vô giá để vượt qua mọi khó khăn trong cuộc sống. Cảm ơn tất cả người thân và những **người bạn** đã luôn luôn sát cánh, tin tưởng, sẻ chia và giúp đỡ.*

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Đậu Thùy Dương, nghiên cứu sinh khóa 32, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Dược lý và Độc chất, xin cam đoan:

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

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

Hà Nội, ngày 08 tháng 6 năm 2018

Người viết cam đoan

(Ký và ghi rõ họ tên)

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ACTH	: adrenocorticotropin hormone (hormon hướng vỏ thượng thận)
ALT	: alanin transaminase
AMP	: adenosin monophosphat
AR	: androgen receptor
AST	: aspartat transaminase
CASA	: computer assisted sperm analysis (phân tích tinh trùng bằng máy tính)
CMC	: carboxyl methyl cellulose
CYP	: cytochrom P
DHEA	: dehydroepiandrosteron
DHEA-S	: dehydroepiandrosteron sulfat
EL	: ejaculation latency (thời gian đạt đến xuất tinh)
eNOS	: endothelial nitric oxide synthetase (nitric oxid synthetase ở tế bào nội mạc mạch máu)
FSH	: follicle stimulating hormone (hormon kích thích nang trứng)
GABA	: gamma-aminobutyric
GH	: growth hormone (hormon tăng trưởng)
GHS	: Globally Harmonised System (Hệ thống Hòa hợp Toàn cầu)
GMP	: guanosin monophosphat
GnRH	: gonadotropin releasing hormone (hormon giải phóng gonadotropin)
HDL	: high density lipoprotein (lipoprotein tỉ trọng phân tử cao)
HE	: hematoxyline - eosin
IC ₅₀	: inhibitory concentration 50% (nồng độ ức chế 50%)
ICP	: intracavernous pressure (áp lực trong thể hang)
IIEF	: international index of erectile function (thang điểm quốc tế về cương dương)

IF	: intromission frequency (số lần thâm nhập)
IL	: intromission latency (thời gian đạt đến thâm nhập)
iNOS	: inducible nitric oxide synthetase (nitric oxid synthetase cảm ứng)
L-NAME	: L- nitro arginin ester (chất ức chế eNOS, nNOS)
LD ₅₀	: lethal dose 50% (liều gây chết 50%)
LDL	: low density lipoprotein (lipoprotein tỉ trọng phân tử thấp)
LH	: luteinizing hormone (hormon hướng hoàng thể)
MAP	: mean arterial pressure (huyết áp động mạch trung bình)
MCV	: mean corpuscular volume (thể tích trung bình hồng cầu)
MF	: mounting frequency (số lần nhảy)
ML	: mounting latency (thời gian nhảy)
mPOA	: medial preoptic area (khu vực tiền thị giữa)
NANC	: non-adrenergic non-cholinergic
nNOS	: neuronal nitric oxide synthetase (nitric oxid synthetase ở tế bào thần kinh)
NO	: nitric oxid
NOS	: nitric oxid synthetase
NYHA	: New York Heart Association (hiệp hội tim mạch New York)
OCT	: organic cation transporter (chất vận chuyển cation hữu cơ)
ODQ	: oxadiazolo quinoxalin (chất ức chế guanyl cyclase)
OECD	: Organization for Economic Co-operation and Development (Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế)
OS35	: cao chiết cồn của quả Xà sàng (trong đó osthol chiếm 35%)
PDE	: phosphodiesterase
PEI	: post ejaculation interval (thời gian nhảy lại sau xuất tinh)
PG	: prostaglandin

SEP : sexual encounter profile
(thông tin về các lần quan hệ tình dục)

TNF : tumor necrosis factor (yếu tố hoại tử u)

TSH : thyroid stimulating hormone (hormon kích thích tuyến giáp)

VIP : vasoactive intestinal peptid (peptid ruột hoạt mạch)

WHO : World Health Organisation (tổ chức y tế thế giới)

YHCT : y học cổ truyền

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
Chương 1: TỔNG QUAN.....	3
1.1. Khái niệm rối loạn chức năng sinh dục nam	3
1.1.1. Rối loạn ham muốn tình dục	4
1.1.2. Rối loạn cương dương	4
1.1.3. Rối loạn xuất tinh	4
1.1.4. Rối loạn cực khoái	5
1.1.5. Dương vật không xì được sau giao hợp.....	5
1.2. Các thuốc điều trị rối loạn sinh dục nam theo y học hiện đại	5
1.2.1. Liệu pháp bổ sung hormon testosterone.....	7
1.2.2. Các thuốc điều trị rối loạn cương dương	12
1.3. Cơ chế bệnh sinh rối loạn sinh dục nam theo y học cổ truyền và một số dược liệu điều trị rối loạn sinh dục nam đã được nghiên cứu thực nghiệm ở Việt Nam	19
1.3.1. Cơ chế bệnh sinh rối loạn sinh dục nam theo y học cổ truyền	19
1.3.2. Một số dược liệu điều trị rối loạn sinh dục nam đã được nghiên cứu thực nghiệm ở Việt Nam.....	20
1.4. Tổng quan về Xà sàng	22
1.4.1. Xà sàng.....	22
1.4.2. Các nghiên cứu về quả Xà sàng	25
1.5. Các phương pháp nghiên cứu tác dụng trên chức năng sinh dục – sinh sản nam trên thực nghiệm.....	29
1.5.1. Phương pháp nghiên cứu hành vi tình dục trên động vật thực nghiệm.....	29
1.5.2. Các phương pháp nghiên cứu chức năng cương dương trên thực nghiệm.....	30
1.5.3. Các phương pháp nghiên cứu vai trò của hormon với hoạt động tình dục trên thực nghiệm	34

1.5.4. Các phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc lên hình thái cơ quan sinh dục và khả năng sinh sản	36
1.5.5. Các mô hình nghiên cứu trên động vật gây suy giảm sinh sản	37
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	41
2.1. Nguyên liệu nghiên cứu.....	41
2.2. Đối tượng nghiên cứu	41
2.3. Hóa chất, thuốc, máy móc và thiết bị phục vụ nghiên cứu	42
2.3.1. Hoá chất và thuốc	42
2.3.2. Máy móc, thiết bị phục vụ nghiên cứu	43
2.4. Phương pháp nghiên cứu	43
2.4.1. Xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của OS35 trên động vật thực nghiệm	44
2.4.2. Đánh giá hoạt tính androgen của OS35 trên chuột cống đực non thiếu ..	45
2.4.3. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chức năng cương dương	46
2.4.4. Đánh giá tác dụng của OS35 trên hành vi tình dục trên chuột cống trắng đực trưởng thành	49
2.4.5. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chuột cống trắng đực bị gây suy giảm sinh sản bởi natri valproat.....	53
2.5. Địa điểm nghiên cứu.....	56
2.6. Xử lý số liệu	56
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	57
3.1. Xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của OS35 trên động vật thực nghiệm.....	57
3.1.1. Xác định độc tính cấp của OS35 theo đường uống trên chuột nhắt trắng	57
3.1.2. Xác định độc tính bán trường diễn của OS35 theo đường uống trên chuột cống trắng	58
3.2. Đánh giá hoạt tính androgen của OS35 trên chuột cống đực non thiếu	69

3.3. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chức năng cương dương.....	75
3.3.1. Đánh giá tác dụng của OS35 trên khả năng cương dương ở thỏ đực trưởng thành	75
3.3.2. Đánh giá tác dụng của OS35 lên áp lực thể hang (ICP) trên chuột cống đực trưởng thành.....	77
3.4. Đánh giá tác dụng của OS35 trên hành vi tình dục trên chuột cống trắng đực trưởng thành	83
3.5. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chuột cống trắng đực bị gây suy giảm sinh sản bởi natri valproat.....	85
3.5.1. Đánh giá tác dụng bảo vệ của OS35 trên chuột cống trắng đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat	85
3.5.2. Đánh giá tác dụng phục hồi của OS35 trên cấu trúc và chức năng sinh sản của chuột cống trắng đực trưởng thành gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat.....	94
Chương 4: BÀN LUẬN.....	103
4.1. Xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của OS35 trên động vật thực nghiệm.....	103
4.1.1. Xác định độc tính cấp của OS35 theo đường uống trên chuột nhắt trắng	103
4.1.2. Xác định độc tính bán trường diễn của OS35 theo đường uống trên chuột cống trắng	107
4.2. Đánh giá hoạt tính androgen của OS35 trên chuột cống đực non thiếu	112
4.3. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chức năng cương dương.....	119
4.3.1. Đánh giá tác dụng của OS35 trên khả năng cương dương ở thỏ đực trưởng thành	119
4.3.2. Đánh giá tác dụng của OS35 trên áp lực thể hang (ICP) trên chuột cống đực trưởng thành.....	124

4.4. Đánh giá tác dụng của OS35 trên hành vi tình dục trên chuột cống đực trưởng thành	130
4.4.1. Ảnh hưởng trên hoạt động nhảy	131
4.4.2. Ảnh hưởng trên hoạt động thâm nhập	134
4.4.3. Ảnh hưởng trên hoạt động xuất tinh	135
4.5. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chuột cống trắng đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat	137
4.5.1. Lí do lựa chọn natri valproat để gây suy giảm sinh sản trên chuột cống	137
4.5.2. Đánh giá tác dụng bảo vệ của thuốc thử OS35 trên chuột cống trắng đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat	139
4.5.3. Đánh giá tác dụng phục hồi của thuốc thử OS35 trên chuột cống trắng đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat	145
4.5.4. Bàn luận về cơ chế tác dụng của OS35 trên chuột gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat	150
4.5.5. Bàn luận về tác dụng của OS35 với lý luận và thực tiễn sử dụng quả Xà sàng trên lâm sàng theo y học cổ truyền	151
KẾT LUẬN	153
KIẾN NGHỊ	155
CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	156
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Một số biện pháp điều trị nguyên nhân rối loạn sinh dục nam.....	6
Bảng 1.2.	So sánh ưu điểm, nhược điểm của các dạng chế phẩm testosterone dùng trong điều trị rối loạn sinh dục nam	8
Bảng 1.3.	Tác dụng không mong muốn hay gặp thuốc ức chế PDEV	14
Bảng 1.4.	Các nghiên cứu thực nghiệm về tác dụng tăng cường chức năng sinh dục nam của một số dược liệu ở Việt Nam	21
Bảng 1.5.	Các nghiên cứu về tác dụng dược lý của quả Xà sàng và hợp chất osthol	26
Bảng 3.1.	Tỷ lệ chuột chết ở các lô chuột uống chế phẩm OS35	57
Bảng 3.2.	Ảnh hưởng của OS35 đến cân nặng của chuột cống trắng	58
Bảng 3.3.	Ảnh hưởng của OS35 đến số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trên chuột cống trắng	59
Bảng 3.4.	Ảnh hưởng của OS35 đến hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu trên chuột cống trắng	60
Bảng 3.5.	Ảnh hưởng của OS35 đến số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu trên chuột cống trắng	61
Bảng 3.6.	Ảnh hưởng của OS35 đến nồng độ albumin và cholesterol trong máu chuột cống trắng	62
Bảng 3.7.	Ảnh hưởng của OS35 đến hoạt độ AST và ALT trong máu chuột cống trắng.....	63
Bảng 3.8.	Ảnh hưởng của OS35 đến nồng độ creatinin trong máu chuột cống trắng.....	64
Bảng 3.9.	Ảnh hưởng của OS35 lên trọng lượng cơ thể chuột cống đực non thiếu.....	69
Bảng 3.10.	Ảnh hưởng của OS35 lên trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ chuột cống đực non thiếu	70

Bảng 3.11.	Ảnh hưởng của OS35 lên nồng độ testosterone trong máu chuột cống đực non thiến.....	74
Bảng 3.12.	Cân nặng thỏ trong nghiên cứu chức năng cương dương	75
Bảng 3.13.	Ảnh hưởng của OS35 lên chiều dài dương vật của thỏ.....	75
Bảng 3.14.	Ảnh hưởng của OS35 lên thời gian cương dương của thỏ.....	77
Bảng 3.15.	Ảnh hưởng của OS35 lên ICP nền trước khi kích thích dây thần kinh hang.....	77
Bảng 3.16.	Ảnh hưởng của OS35 lên ICP cực đại sau khi kích thích dây thần kinh hang.....	78
Bảng 3.17.	Ảnh hưởng của OS35 lên thời gian đáp ứng với kích thích dây thần kinh hang	80
Bảng 3.18.	Ảnh hưởng của OS35 lên huyết áp động mạch trung bình	81
Bảng 3.19.	Ảnh hưởng của OS35 lên chỉ số ICP cực đại/ huyết áp động mạch..	82
Bảng 3.20.	Ảnh hưởng của OS35 lên số lần nhảy (MF), số lần thâm nhập (IF) ở chuột cống đực trưởng thành.....	84
Bảng 3.21.	Ảnh hưởng của OS35 lên thời gian nhảy (ML), thời gian thâm nhập (IL) ở chuột cống đực trưởng thành	84
Bảng 3.22.	Ảnh hưởng của OS35 lên thời gian xuất tinh (EL) và thời gian nhảy lại (PEI) ở chuột cống đực trưởng thành	85
Bảng 3.23.	Ảnh hưởng của OS35 lên trọng lượng các cơ quan sinh dục ở chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat	86
Bảng 3.24.	Ảnh hưởng của OS35 lên mật độ tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng sống ở chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình bảo vệ	87
Bảng 3.25.	Ảnh hưởng của OS35 lên mức độ di động của tinh trùng ở chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình bảo vệ.....	88

Bảng 3.26.	Ảnh hưởng của OS35 lên hình thái của tinh trùng ở chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình bảo vệ....	89
Bảng 3.27.	Ảnh hưởng của OS35 lên nồng độ testosterone trong máu chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình bảo vệ.....	90
Bảng 3.28.	Ảnh hưởng của OS35 lên kích thước ống sinh tinh ở chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình bảo vệ	91
Bảng 3.29.	Ảnh hưởng của OS35 lên số hoàng thể, số thai đậu và số thai phát triển bình thường trên mô hình bảo vệ.....	92
Bảng 3.30.	Ảnh hưởng của OS35 lên trọng lượng các cơ quan sinh dục của chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình phục hồi.....	94
Bảng 3.31.	Ảnh hưởng của OS35 lên mật độ tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng sống của chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình phục hồi.....	95
Bảng 3.32.	Ảnh hưởng của OS35 lên mức độ di động của tinh trùng ở chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình phục hồi.....	96
Bảng 3.33.	Ảnh hưởng của OS35 lên hình thái của tinh trùng ở chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình phục hồi...	97
Bảng 3.34.	Ảnh hưởng của OS35 lên nồng độ testosterone trong máu chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình phục hồi.....	98
Bảng 3.35.	Ảnh hưởng của OS35 lên kích thước ống sinh tinh ở chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình phục hồi...	99
Bảng 3.36.	Ảnh hưởng của OS35 lên số hoàng thể, số thai đậu và số thai phát triển bình thường trên mô hình phục hồi.....	100
Bảng 4.1.	Phân loại các chất dùng đường uống dựa vào LD ₅₀ theo GHS ...	105

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Ảnh hưởng của sildenafil lên ICP cực đại sau khi kích thích điện thần kinh hang so với ICP nền.....	79
Biểu đồ 3.2. Ảnh hưởng của OS35 lên ICP cực đại sau khi kích thích điện thần kinh hang so với ICP nền.....	79
Biểu đồ 3.3. Ảnh hưởng của OS35 lên tỉ lệ chuột nhảy, chuột thâm nhập, chuột xuất tinh và chuột nhảy lại sau xuất tinh ở chuột công đực trưởng thành.....	83
Biểu đồ 3.4. Ảnh hưởng của OS35 lên tỉ lệ chuột cái có chửa trên mô hình bảo vệ.....	92
Biểu đồ 3.5. Ảnh hưởng của OS35 lên tỉ lệ thai chết sớm, chết muộn và tỉ lệ mất trứng ở chuột cái trên mô hình bảo vệ	93
Biểu đồ 3.6. Ảnh hưởng của OS35 lên tỉ lệ chuột cái có chửa trên mô hình phục hồi.....	100
Biểu đồ 3.7. Ảnh hưởng của OS35 lên tỉ lệ thai chết sớm, chết muộn và tỉ lệ mất trứng ở chuột cái trên mô hình phục hồi.....	101

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Cơ chế tác dụng của thuốc ức chế PDEV	13
Hình 1.2.	Hình ảnh cây và quả Xà sàng	23
Hình 1.3.	Cấu trúc hóa học của osthol	24
Hình 2.1.	Sơ đồ nghiên cứu.....	44
Hình 2.2.	Các chỉ số đánh giá hành vi tình dục ở chuột cống đực	52
Hình 3.1.	Hình ảnh vi thể gan chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc lô chứng sinh học	65
Hình 3.2.	Hình ảnh vi thể gan chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc lô dùng OS35 150 mg/kg/ngày	65
Hình 3.3.	Hình ảnh vi thể gan chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc lô dùng OS35 450 mg/kg/ngày	66
Hình 3.4.	Hình ảnh vi thể thận chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc lô chứng sinh học	67
Hình 3.5.	Hình ảnh vi thể thận chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc lô dùng OS35 150 mg/kg/ngày	67
Hình 3.6.	Hình ảnh vi thể thận chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc lô dùng OS35 450 mg/kg/ngày	68
Hình 3.7.	Hình ảnh các cơ quan sinh dục phụ chuột cống đực non thiếu lô uống dung môi.....	71
Hình 3.8.	Hình ảnh các cơ quan sinh dục phụ chuột cống đực non thiếu lô dùng testosterone.....	72
Hình 3.9.	Hình ảnh các cơ quan sinh dục phụ chuột cống đực non thiếu lô uống OS35 50 mg/kg.....	72
Hình 3.10.	Hình ảnh các cơ quan sinh dục phụ chuột cống đực non thiếu lô uống OS35 150 mg/kg.....	73

Hình 3.11.	Hình ảnh các cơ quan sinh dục phụ chuột cống đực non thiếu lô uống OS35 250 mg/kg.....	73
Hình 3.12.	Hình ảnh cương dương của thỏ lô 1 dùng sildenafil ở thời điểm 15 phút sau khi dùng thuốc	76
Hình 3.13.	Hình ảnh cương dương của thỏ lô 2 dùng OS35 liều 60 mg/kg ở thời điểm 15 phút sau khi dùng thuốc	76
Hình 4.1.	Sinh tổng hợp mineralcorticoid, glucocorticoid và testosterone ở tuyến thượng thận	118
Hình 4.2.	Cơ chế phân tử sự giãn cơ trơn dương vật	127
Hình 4.3.	Hình ảnh mức độ biểu hiện của p-eNOS.....	129

ĐẶT VẤN ĐỀ

Rối loạn chức năng sinh dục nam (hay rối loạn sinh dục) là một tình trạng bệnh lý bao gồm rối loạn cương dương, rối loạn xuất tinh, giảm khoái cảm và rối loạn ham muốn tình dục, có thể kèm theo mất khả năng xù của dương vật [1]. Đây là một tình trạng rối loạn bệnh lý thường gặp ở nam giới với tỉ lệ ngày càng tăng lên ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Theo ước tính, số lượng nam giới bị rối loạn sinh dục trên thế giới sẽ tăng lên khoảng 322 triệu người vào năm 2025 [1]. Bệnh lý tuy không gây tử vong, không cần xử trí cấp cứu nhưng ảnh hưởng rất lớn đến tinh thần và chất lượng cuộc sống của người bệnh. Ngoài ra, tình trạng này có thể liên quan đến các bệnh lý toàn thân khác.

Với các thành tựu đạt được trong lĩnh vực sinh lý và sinh lý bệnh, các nhà khoa học đã có những hiểu biết sâu sắc về nguyên nhân, cơ chế bệnh sinh của rối loạn sinh dục nam. Từ đó, các nhà lâm sàng cũng có những bước tiến đáng kể, tìm ra các phương pháp chẩn đoán và biện pháp điều trị phù hợp với từng bệnh nhân và nguyên nhân gây bệnh [1],[2],[3]. Trong những năm gần đây, bắt nhịp với xu hướng trên thế giới, Việt Nam đã áp dụng những phương pháp điều trị theo y học hiện đại trong chăm sóc, nâng cao sức khỏe sinh sản nói chung và chẩn đoán, điều trị rối loạn sinh dục nam nói riêng.

Mặc dù vậy, điều trị rối loạn sinh dục nam theo y học hiện đại có một số nhược điểm như hiệu quả điều trị chưa cao, giá thành đắt, nhiều tác dụng không mong muốn. Vì vậy, hiện nay, một xu hướng phổ biến là phát hiện và nghiên cứu các thuốc điều trị có nguồn gốc từ dược liệu. Theo y học cổ truyền có nhiều dược liệu được sử dụng rộng rãi để điều trị rối loạn sinh dục nam như nhục thung dung, ba kích, bá bệnh, nhân sâm, cá ngựa v.v... [4],[5],[6]. Trong số đó có quả Xà sàng (tên khoa học là *Cnidium monnieri* (L.) Cuss.). Đây là một dược liệu có sẵn ở Việt Nam. Theo Đỗ Tất Lợi và các nhà khoa

học, quả Xà sàng có tác dụng tăng cường chức năng sinh dục - sinh sản ở nam giới [6]. Một số nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh hợp chất osthol chiết xuất từ quả Xà sàng có tác dụng làm tăng hoạt tính androgen trên động vật thực nghiệm, có tác dụng làm giãn cơ trơn thể hang cô lập... [7],[8],[9].

Tuy nhiên, ở nước ta và trên thế giới, cho đến nay vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về độc tính cũng như tác dụng trên chức năng sinh sản, hành vi tình dục, khả năng cương dương của quả Xà sàng. Vì vậy, để cung cấp bằng chứng khoa học về tính an toàn và hiệu quả của cao chiết cồn từ quả Xà sàng (chế phẩm OS35) trong điều trị rối loạn sinh dục nam, đề tài ***Nghiên cứu độc tính và tác dụng trên chức năng sinh sản của OS35 trong thực nghiệm*** được thực hiện nhằm 3 mục tiêu sau đây:

- 1. Xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của OS35 trên động vật thực nghiệm.*
- 2. Đánh giá hoạt tính androgen, tác dụng trên chức năng cương dương và hành vi tình dục của OS35 trên động vật thực nghiệm.*
- 3. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chuột cống trắng gây suy giảm sinh sản bởi natri valproat.*

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. Khái niệm rối loạn chức năng sinh dục nam

Trước đây, khái niệm rối loạn chức năng sinh dục nam được gọi là chứng bất lực (impotence). Năm 1993, Viện Sức khỏe Quốc gia Hoa Kỳ sử dụng cụm từ rối loạn cương dương (erectile dysfunction), một số nơi gọi là liệt dương, hay giảm khả năng cương dương thay cho cụm từ bất lực để mô tả tình trạng bệnh lý rối loạn chức năng sinh dục ở nam giới, với định nghĩa là không có khả năng cương dương, một giai đoạn trong quá trình hoạt động tình dục ở nam giới. Tuy nhiên, với sự hiểu biết một cách rõ ràng về từng giai đoạn của hoạt động tình dục ở nam giới cũng như những tiến bộ về mặt sinh lý bệnh, cụm từ rối loạn cương dương không còn thích hợp để nói lên tất cả các khía cạnh của tình trạng rối loạn chức năng sinh dục ở nam giới.

Hiện nay, khái niệm rối loạn chức năng sinh dục nam (từ đây gọi tắt là rối loạn sinh dục nam) được mở rộng, và được định nghĩa là một tình trạng bệnh lý bao gồm: rối loạn ham muốn tình dục, rối loạn cương dương, rối loạn xuất tinh, rối loạn cực khoái, giảm khả năng xiù của dương vật; các tình trạng này có thể đơn độc hoặc phối hợp với nhau [1].

Khái niệm rối loạn sinh dục nam phân biệt với khái niệm suy tuyến sinh dục nam (hypogonadism) là tình trạng suy giảm chức năng tinh hoàn, bao gồm rối loạn hormon và rối loạn sản xuất tinh trùng.

Rối loạn sinh dục nam là một tình trạng rối loạn bệnh lý thường gặp ở nam giới, ngày càng tăng lên ở Việt Nam và thế giới. Theo ước tính, số lượng nam giới bị rối loạn chức năng sinh dục trên thế giới sẽ tăng lên khoảng 322 triệu người vào năm 2025 [1]. Tình trạng này ảnh hưởng đến các giai đoạn của quá trình giao hợp ở nam giới, ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng cuộc sống của người bệnh và hạnh phúc gia đình.

1.1.1. Rối loạn ham muốn tình dục (sexual interest/ desire dysfunction)

Giảm ham muốn tình dục (hypoactive sexual desire) là tình trạng xảy ra liên tục hoặc tái phát trong đó người bệnh suy giảm (hoặc mất) hứng thú, nhu cầu hoạt động tình dục [1],[3],[10]. Theo ước tính, tình trạng này xảy ra ở hơn 15% nam giới trưởng thành và 30% nữ giới trưởng thành.

1.1.2. Rối loạn cương dương (erectile dysfunction)

Rối loạn cương dương là một tình trạng bệnh lý biểu hiện dưới một trong những dạng sau đây [1],[11]:

- Không có ham muốn tình dục nên dương vật không cương cứng để tiến hành giao hợp;
- Có ham muốn tình dục nhưng không đủ độ cương cứng để đưa được vào âm đạo;
- Dương vật cương cứng không đúng lúc. Khi định tiến hành cuộc giao hợp thì dương vật không thể cương cứng, nhưng trong những hoàn cảnh tự nhiên hoàn toàn không bị kích thích về tình dục thì dương vật lại cương cứng;
- Dương vật cương cứng trong thời gian rất ngắn, không có khả năng duy trì sự cương cứng đến lúc xuất tinh.

1.1.3. Rối loạn xuất tinh

75% nam giới ở độ tuổi 17, 18 có thể kiểm soát được hành vi xuất tinh của mình. Các rối loạn xuất tinh bao gồm xuất tinh sớm, xuất tinh muộn hoặc không xuất tinh [1].

- Xuất tinh sớm là tình trạng liên tục hoặc tái diễn xuất tinh xảy ra khi chỉ có rất ít kích thích tình dục, có thể xảy ra trước, trong hoặc ngay sau khi thâm nhập âm đạo và trước khi người bệnh có chủ định xuất tinh [1],[12].
- Xuất tinh muộn là sự trì hoãn quá mức khả năng đạt đến cực khoái và xuất tinh. Không xuất tinh là người bệnh không xuất tinh được trong quá trình giao hợp dù có thể đạt được cực khoái [1],[12].

1.1.4. Rối loạn cực khoái

Rối loạn cực khoái ở nam giới được định nghĩa là mất khả năng đạt được cực khoái, giảm đáng kể mức độ khoái cảm hoặc kéo dài đáng kể thời gian đạt được cực khoái trong hoạt động tình dục [1],[13]. Khó có thể đánh giá tình trạng giảm khoái cảm một cách chính xác vì hoàn toàn dựa vào cảm giác chủ quan của người bệnh và một số người bệnh không thể phân biệt được giữa xuất tinh và đạt cực khoái. Tình trạng này khá hiếm gặp, chỉ xảy ra ở 3-10% nam giới có rối loạn sinh dục.

1.1.5. Dương vật không xìu được sau giao hợp

Chứng cương đau dương vật là tình trạng dương vật cương cứng quá mức gây đau và kéo dài (> 4 giờ) không kèm theo ham muốn tình dục và thường gây ra sau các kích thích tình dục bình thường [1]. Nguyên nhân dẫn đến tình trạng này là do sự ngập máu trong thể hang; nếu kéo dài sẽ gây ra xơ hóa thể hang và rối loạn cương dương.

1.2. Các thuốc điều trị rối loạn sinh dục nam theo y học hiện đại

Trước đây, người ta cho rằng rối loạn sinh dục nam là do nguyên nhân tâm thần. Việc tìm ra prostaglandin và thuốc ức chế phosphodiesterase-V (PDEV) đưa đến hiểu biết về cơ chế mạch máu của rối loạn cương dương. Sau đó, các nghiên cứu về hiệu quả của liệu pháp bổ sung testosterone cho thấy vai trò của trục vùng dưới đồi – tuyến yên – tuyến sinh dục đối với hoạt động tình dục. Các hướng nghiên cứu mới về các rối loạn tâm thần và điều trị cho thấy vai trò của các chất dẫn truyền thần kinh trong hoạt động tình dục bình thường và bất thường. Như vậy, mối liên quan giữa các yếu tố sinh học, thần kinh, tâm thần liên quan đến hoạt động tình dục ở nam giới phức tạp hơn rất nhiều, chứ không phải chỉ là công tắc “bật – tắt” đơn giản. Ngoài ra, nhiều bệnh lý toàn thân/ tại chỗ (cơ quan sinh dục) và thuốc điều trị cũng gây giảm ham muốn tình dục và các giai đoạn của hoạt động tình dục ở nam giới.

Vì lí do đó, khi điều trị rối loạn sinh dục nam, cần tìm ra và điều trị triệt để nguyên nhân (trình bày ở bảng 1.1.) đồng thời với việc áp dụng các thuốc hoặc các biện pháp để cải thiện chức năng sinh dục cho bệnh nhân.

Bảng 1.1. Một số biện pháp điều trị nguyên nhân gây rối loạn sinh dục nam

Nhóm nguyên nhân	Biện pháp điều trị
Tâm thần (như rối loạn tâm thần, trầm cảm, trạng thái lo âu, căng thẳng, các thuốc điều trị rối loạn tâm thần...)	- Sử dụng liệu pháp tâm lý - Điều trị bệnh lý tâm thần
Thần kinh (như động kinh, Parkinson, sau đột quy, tổn thương hoặc phẫu thuật thần kinh...)	- Điều trị bệnh lý/ tổn thương thần kinh - Phẫu thuật với các tổn thương cần can thiệp ngoại khoa
Hormon (như suy tuyến sinh dục, thiếu hụt androgen, kháng androgen...)	- Liệu pháp bổ sung testosterone - Điều trị các rối loạn hormon khác
Bệnh mạn tính (như đái tháo đường, tăng huyết áp, xơ vữa động mạch, rối loạn chuyển hóa...)	- Điều trị bệnh mắc phải - Thay đổi lối sống và yếu tố nguy cơ
Bệnh lý/ tổn thương tại chỗ (như bất thường hình thái, bệnh Peyronie, chứng cương đau dương vật, hẹp bao quy đầu, chấn thương hoặc phẫu thuật...)	- Điều trị bệnh lý tại chỗ - Phẫu thuật khi cần can thiệp ngoại khoa
Thuốc (như thuốc ức chế tái thu hồi serotonin, thuốc chống trầm cảm 3 vòng, thuốc hướng thần, thuốc ngủ, thuốc kháng androgen...)	- Giảm liều hoặc ngừng dùng thuốc - Thay thế bằng thuốc khác

Bên cạnh đó, cho dù do nguyên nhân nào, bệnh nhân cũng kèm theo mặc cảm tâm lý nặng nề nên cần kết hợp liệu pháp tâm lý, xóa bỏ mặc cảm và

tạo cảm giác tin tưởng cho bệnh nhân; biện pháp điều trị phải đơn giản, phù hợp tâm lý, ít gây sang chấn, ít tác dụng không mong muốn và mang lại hiệu quả với giá thành phù hợp.

Luận án này sẽ tổng quan các kiến thức về các thuốc thường được sử dụng để điều trị rối loạn sinh dục nam, bao gồm: liệu pháp bổ sung hormon testosterone và các thuốc điều trị rối loạn cương dương.

1.2.1. Liệu pháp bổ sung hormon testosterone

1.2.1.1. Chỉ định

Chỉ định của testosterone là điều trị bổ sung cho tình trạng suy tuyến sinh dục nam (male hypogonadism), khi tình trạng suy giảm testosterone được xác định bằng triệu chứng lâm sàng và xét nghiệm sinh hóa [16],[17].

Mục đích của liệu pháp bổ sung testosterone là phục hồi nồng độ testosterone về giới hạn sinh lý bình thường ở bệnh nhân nam có nồng độ testosterone thấp kèm theo các triệu chứng suy giảm testosterone; từ đó, nâng cao chất lượng cuộc sống, trạng thái sung mãn, chức năng sinh dục, sức mạnh cơ và mật độ khoáng của xương [18].

1.2.1.2. Chống chỉ định

Liệu pháp bổ sung testosterone chống chỉ định trong những trường hợp [16],[17]:

- Quá mẫn với thuốc.
- Tiền sử hoặc hiện tại có khối u ở gan.
- Ung thư phụ thuộc androgen: ung thư biểu mô tuyến tiền liệt, ung thư vú ở nam.
- Bệnh nhân mắc chứng ngừng thở khi ngủ nặng.
- Hematocrit > 54%.
- Rối loạn đường tiết niệu dưới nặng do phì đại lành tính tuyến tiền liệt.
- Suy tim mạn tính nặng (độ IV theo phân loại NYHA).

1.2.1.3. Lựa chọn điều trị

Bảng 1.2. So sánh ưu điểm, nhược điểm của các dạng chế phẩm testosterone dùng trong điều trị rối loạn sinh dục nam

Dạng bào chế	Ưu điểm	Nhược điểm
Dạng uống (undecanoat)	- Thuận tiện - Tự dùng được	- Nồng độ không sinh lý - Thời gian tác dụng ngắn - Cần dùng nhiều lần trong ngày
Tiêm bắp (liều chuẩn)	- Có thể ngừng thuốc khi gặp tác dụng không mong muốn.	- Nồng độ không sinh lý, dao động; giữa 2 lần tiêm, nồng độ thấp.
Tiêm bắp (tác dụng kéo dài)	- Nồng độ sinh lý, ổn định.	- Không ngừng thuốc được khi gặp tác dụng không mong muốn.
Viên cấy dưới da	- Không phải đưa liều thường xuyên - Nồng độ sinh lý, ổn định	- Nhiễm khuẩn quanh viên cấy - Phản ứng đối với viên cấy - Kỹ thuật đặt thuốc cần chuyên khoa - Không ngừng thuốc được khi gặp tác dụng không mong muốn.
Miếng dán/ gel qua da	- Nồng độ sinh lý, ổn định - Thuận tiện - Tự dùng được	- Thường gây kích ứng da, nguy cơ lây nhiễm người này sang người khác. - Phải dùng thường xuyên
Viên ngậm trong má	- Nồng độ sinh lý - Thuận tiện - Tự dùng được	- Có thể gây kích ứng tại chỗ - Phải dùng thường xuyên

Hiện nay, rất nhiều chế phẩm của testosterone (dưới một số dạng bào chế khác nhau về đường dùng, dược động học và tác dụng không mong muốn) được khuyến cáo sử dụng trong điều trị. Các chế phẩm testosterone có sẵn trên thị trường hiện nay gồm: dạng uống, dạng tiêm bắp, viên cấy dưới da, viên ngậm trong má, dạng gel hoặc miếng dán qua da.

1.2.1.3. Tác dụng không mong muốn của testosterone

- Bệnh lý tuyến tiền liệt

Sự phát triển bình thường của tuyến tiền liệt phụ thuộc vào testosterone thông qua androgen receptor (AR) nên những bất thường trong sinh tổng hợp hormon hay những đột biến gây bất hoạt gen cấu trúc AR đều ảnh hưởng đến sự phát triển của tuyến tiền liệt. Chính vì vậy, trong liệu pháp bổ sung testosterone điều trị rối loạn sinh dục ở nam, đặc biệt ở nam giới cao tuổi, việc xem xét đến nguy cơ phát triển tuyến tiền liệt, kể cả lành tính và ác tính đều rất quan trọng [18],[20].

- Phì đại tuyến vú và ung thư vú ở nam giới

Phì đại tuyến vú (gynaecomastia) là sự phát triển bất thường của tuyến vú ở nam giới dẫn đến phì đại. Nguyên nhân của hiện tượng này thường được cho là do sự mất cân bằng hormon giới tính. Thông thường trong liệu pháp bổ sung testosterone, tỷ lệ giữa estradiol và testosterone vẫn được duy trì ở mức bình thường, do đó không gây quá sản tuyến vú, nhưng một số trường hợp phì đại tuyến vú có thể xảy ra, đặc biệt khi sử dụng testosterone enanthate hoặc cypionat. Trong những trường hợp đó cần phải giảm liều.

Mối liên quan giữa liệu pháp testosterone và ung thư vú ở nam được báo cáo ở một số bệnh nhân [24], tuy nhiên, chưa có đủ bằng chứng để chứng minh mối liên quan này.

- Bệnh lý tim mạch

Nhiều nghiên cứu cung cấp bằng chứng rằng tình trạng suy giảm testosterone cũng như rối loạn cương dương có thể là các dấu hiệu chỉ điểm của bệnh tim mạch. Do đó, bệnh nhân suy giảm testosterone cần được đánh giá để phát hiện và điều chỉnh các yếu tố nguy cơ tim mạch như lối sống, chế độ ăn, luyện tập, thuốc lá, tăng huyết áp, đái tháo đường, rối loạn lipid máu...[18].

Một nghiên cứu có đối chứng với giả dược và hai nghiên cứu quan sát cho kết quả liệu pháp bổ sung testosterone tăng biến cố tim mạch nặng như nhồi máu cơ tim cấp, hội chứng mạch vành cấp, đột quy, suy tim, tử vong do tim mạch [26],[27],[28]. Tuy nhiên, các nghiên cứu này còn một số hạn chế, chưa đủ để đi đến kết luận chắc chắn.

Trái lại, một số nghiên cứu quan sát lại cho kết quả bệnh nhân có biến cố mạch vành có nồng độ testosterone thấp có tỉ lệ tử vong cao hơn; liệu pháp bổ sung testosterone giúp cải thiện tỉ lệ sống ở bệnh nhân so với nhóm không điều trị [29]. Kết quả tương tự cũng được khẳng định trong một phân tích hồi cứu trên 6355 bệnh nhân nam điều trị liệu pháp bổ sung testosterone: liệu pháp bổ sung testosterone không tăng nguy cơ nhồi máu cơ tim so với bệnh nhân không sử dụng. Một phân tích meta các thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng đưa ra kết luận các dữ liệu không đủ để khẳng định liệu pháp bổ sung testosterone là nguyên nhân dẫn đến các biến cố tim mạch [33].

Tóm lại, hiện nay, chưa có đầy đủ bằng chứng để kết luận mối liên quan giữa testosterone làm tăng hay giảm biến cố tim mạch. Tuy nhiên, cần thận trọng khi sử dụng testosterone trên bệnh nhân có sẵn bệnh lý tim mạch. Liệu pháp bổ sung testosterone chống chỉ định ở bệnh nhân suy tim nặng do tác dụng gây ứ dịch có thể làm nặng thêm tình trạng suy tim. Các bệnh nhân suy tim bị suy tuyến sinh dục điều trị bằng testosterone phải được theo dõi chặt chẽ triệu chứng lâm sàng, nồng độ testosterone và hematocrit [18].

- Tăng sản hồng cầu

Hầu hết các nghiên cứu về liệu pháp bổ sung testosterone trong điều trị rối loạn sinh dục ở nam giới đều cho thấy có sự tăng hematocrit từ 2,5% đến 5% so với trước điều trị, gặp ở 6% đến 25% bệnh nhân [32].

Nguyên nhân gây tăng hematocrit có thể là do testosterone kích thích erythropoietin, làm tăng tạo hồng cầu và làm tăng độ nhớt máu, đây có thể là nguyên nhân gây nhồi máu não hoặc nhồi máu cơ tim dẫn đến đột quỵ trong khi điều trị bằng testosterone [16],[18]. Khi sử dụng testosterone, cần theo dõi nồng độ testosterone không vượt quá giới hạn bình thường và hematocrit không được quá 54% [18]. Khi hematocrit > 54% thì cần cân nhắc giảm liều hoặc ngừng điều trị cho đến khi nồng độ hematocrit trở về bình thường.

- Ngừng thở khi ngủ

Một số nghiên cứu cho kết quả điều trị bằng testosterone có thể làm phát triển hội chứng ngừng thở khi ngủ nhưng cho đến nay chưa có đủ bằng chứng để kết luận mối liên quan giữa liệu pháp bổ sung testosterone với hội chứng này. Tuy vậy, liệu pháp bổ sung testosterone chống chỉ định cho bệnh nhân ngừng thở khi ngủ nặng [16],[18].

- Tăng lipid máu

Mặc dù có những báo cáo về tác dụng không mong muốn của liệu pháp testosterone đối với chuyển hóa lipid nhưng các thử nghiệm lâm sàng lại cho những kết quả trái ngược. Theo trích dẫn từ Borst SE. [33]: nghiên cứu của Bagatell & Bremner (1996), Von Eckardstein và cộng sự (1997) cho thấy dùng testosterone có thể làm giảm nồng độ HDL- cholesterol nhưng Wang và cộng sự (2000) lại nhận thấy rằng testosterone dạng gel (tương đương 5–10 mg một ngày) điều trị cho bệnh nhân rối loạn sinh dục trong 6 tháng không gây ra những thay đổi rõ rệt về nồng độ LDL- hay HDL-cholesterol. Whitsel và cộng sự (2001) thực hiện một phân tích gộp dựa vào 19 nghiên cứu cho kết quả là điều trị bằng testosterone có thể gây giảm nhẹ cả nồng độ HDL và LDL-

cholesterol. Hơn nữa, những lợi ích trên tim mạch của testosterone cũng được khẳng định trong nghiên cứu của Malkin và cộng sự (2004) khi thấy testosterone làm giảm nồng độ TNF- α , interleukin-1 β và các cytokin gây viêm trong tuần hoàn, đây là những yếu tố bất lợi, thường tăng trong bệnh suy tim.

Như vậy, mặc dù chưa có bằng chứng rõ rệt nhưng việc giám sát nồng độ HDL-cholesterol và các lipoprotein khác cũng cần đặt ra trong quá trình điều trị bằng testosterone.

- Thay đổi về tâm thần

Những thay đổi về tâm thần bao gồm sự quá khích là một dấu hiệu được nhắc đến khi có sự lạm dụng hormon. Hành vi kích động, tự nói về bản thân cũng được đề cập đến trong một bài báo khi điều trị testosterone cho bệnh nhân rối loạn sinh dục trẻ tuổi, song kết quả này không lặp lại trong một vài nghiên cứu khác. Mặc dù hành vi quá khích không phải là vấn đề nổi trội của liệu pháp bổ sung hormon nhưng vẫn cần được kiểm soát trong khi điều trị [33].

1.2.2. Các thuốc điều trị rối loạn cương dương

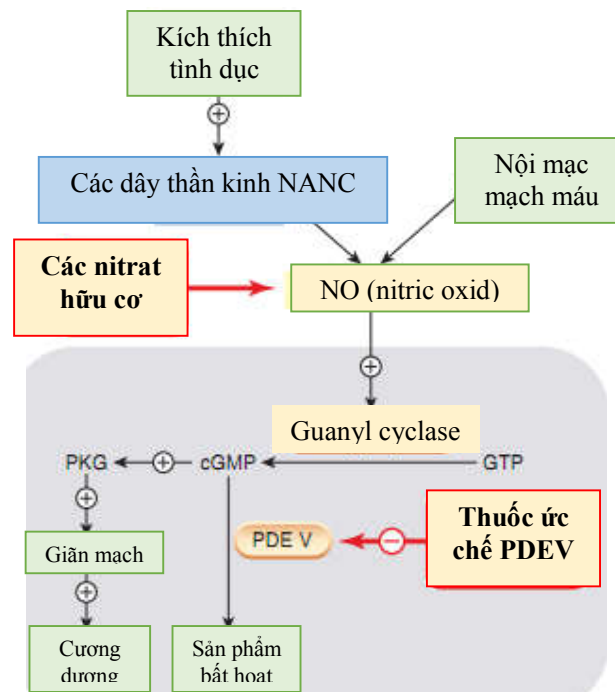
1.2.2.1. Thuốc ức chế phosphodiesterase V

Phương pháp đầu tay để điều trị rối loạn cương dương là thuốc ức chế PDEV [11]. Hiệu quả của thuốc được đánh giá bằng tác dụng làm dương vật cương đủ để thâm nhập âm đạo. Thuốc ức chế PDEV cải thiện đáng kể các chỉ số IIEF, SEP2, SEP3 của bệnh nhân. Thuốc có hiệu quả điều trị trên các nhóm bệnh nhân, kể cả những bệnh nhân được cho là khó điều trị (như bệnh nhân đái tháo đường) [11].

* Cơ chế tác dụng thuốc ức chế PDEV

Khi có kích thích tình dục, các ngọn dây thần kinh giải phóng nitric oxid (NO), sau đó, NO hoạt hóa enzym guanylyl cyclase, làm tăng nồng độ GMP vòng, từ đó làm giãn cơ trơn thể hang thông qua hoạt hóa protein kinase G [35]. PDEV là enzym phân hủy GMP vòng ở thể hang.

Nhóm thuốc này không có tác dụng làm giãn trực tiếp trên thể hang phân lập ở người nhưng nó làm tăng tác dụng của NO bằng cách ức chế PDEV. Khi kích thích tình dục gây ra sự giải phóng NO tại chỗ, thì sự ức chế PDEV làm tăng nồng độ GMP vòng trong thể hang, từ đó làm giãn cơ trơn và tăng dòng máu tới thể hang. Ở liều khuyến cáo, thuốc ức chế PDEV không có tác dụng nếu không có kích thích tình dục kèm theo [16],[35].



Hình 1.1. Cơ chế tác dụng của thuốc ức chế PDEV [35]

*** Chỉ định và chống chỉ định của thuốc ức chế PDEV**

- **Chỉ định:** Thuốc ức chế PDEV được chỉ định ở bệnh nhân nam giới trưởng thành để điều trị các rối loạn cương dương, là tình trạng không có khả năng đạt được hoặc duy trì cương cứng đủ để thỏa mãn hoạt động tình dục [16],[17].

- **Chống chỉ định:**

+ Quá mẫn với thuốc.

+ Dùng cùng các nitrat và các chất cho NO.

+ Bệnh nhân nam mà hoạt động tình dục không được khuyến khích (như bệnh nhân bệnh tim mạch nặng như đau thắt ngực không ổn định, suy tim nặng).

+ Bệnh nhân mất thị lực một bên do bệnh lý thần kinh thị giác do thiếu máu cục bộ vùng trước không do nguyên nhân động mạch có liên quan đến việc dùng thuốc ức chế PDEV trước đó hay không.

+ Suy gan nặng, hạ huyết áp (huyết áp < 90/50 mmHg), tiền sử đột quỵ hoặc nhồi máu cơ tim.

+ Rối loạn võng mạc thoái hóa di truyền (như viêm võng mạch sắc tố do rối loạn PDEV võng mạc di truyền).

* Tác dụng không mong muốn của thuốc ức chế PDEV

Nhiều tác dụng không mong muốn của thuốc ức chế PDEV gây ra do giãn mạch, bao gồm hạ huyết áp, đỏ bừng, đau đầu [16],[17]. Các rối loạn thị lực cũng được báo cáo do thuốc cũng có tác dụng trên PDE6 ở võng mạc và có vai trò quan trọng với thị lực [16],[17].

Bảng 1.3. Tác dụng không mong muốn hay gặp thuốc ức chế PDEV [11]

Tác dụng không mong muốn	Sildenafil	Tadalafil	Vardenafil	Avanafil
Đau đầu	12,8%	14,5%	16%	9,3%
Đỏ bừng	10,4%	4,1%	12%	3,7%
Khó tiêu	4,6%	12,3%	4%	Không thường gặp
Nghẹt mũi	1,1%	4,3%	10%	1,9%
Chóng mặt	1,2%	2,3%	2%	0,6%
Bất thường thị lực	1,9%		< 2%	Không
Đau cơ		5,7%		< 2%

- Trên hệ miễn dịch: phản ứng quá mẫn
- Trên hệ thần kinh: đau đầu, chóng mặt, buồn ngủ, giảm cảm giác, tai biến mạch máu não, ngất, nhồi máu não, động kinh.
- Trên mắt: rối loạn thị lực, rối loạn phân biệt màu sắc, rối loạn kết mạc, tiết nước mắt, nhồi máu võng mạc, bệnh lý thần kinh thị giác do nhồi máu cục bộ não trước...
- Trên thính giác và tiền đình: chóng mặt, ù tai, điếc
- Trên mạch: đỏ bừng, tăng huyết áp, hạ huyết áp
- Trên tim: nhịp tim nhanh, nhồi máu cơ tim, đau thắt ngực, rối loạn nhịp tim (rung nhĩ, rối loạn nhịp thất)
- Trên hô hấp: ngạt mũi, chảy máu cam
- Trên tiêu hóa: khó tiêu, nôn, buồn nôn, khô miệng
- Trên da: ban da, hội chứng Stevens Johnson, hội chứng hoại tử biểu bì cấp nhiễm độc
- Trên cơ xương và mô liên kết: đau cơ
- Trên cơ quan sinh dục: cương kéo dài, cương đau dương vật
- Các rối loạn khác: đau ngực, mệt mỏi

* Các thuốc trong nhóm thuốc ức chế PDEV

- Sildenafil

Sildenafil được phát triển từ năm 1998 và là thuốc ức chế PDEV đầu tiên. Sildenafil được dùng với liều 25, 50 và 100 mg. Liều khuyến cáo là 50 mg và điều chỉnh theo đáp ứng của bệnh nhân và tác dụng không mong muốn. Tác dụng của thuốc xuất hiện 30 đến 60 phút sau khi dùng. Tác dụng giảm đi sau một bữa ăn giàu chất béo do kéo dài hấp thu của thuốc. Tác dụng có thể kéo dài đến 12 giờ sau khi uống [35],[36].

Kết quả nghiên cứu đáp ứng liều cho thấy ở bệnh nhân dùng sildenafil liều 25, 50, 100 mg, tỉ lệ có cải thiện chức năng cương lần lượt là 56%, 77%

và 84% [36]. Hiện nay, ngoài dạng viên nén thông thường, sildenafil còn được bào chế dưới dạng viên nén tan trong miệng hàm lượng 50 mg thích hợp cho bệnh nhân khó nuốt [16],[35].

- Tadalafil

Tadalafil được cấp phép điều trị rối loạn cương dương từ năm 2003. Tác dụng của thuốc xuất hiện từ 30 phút sau khi uống, đạt đỉnh sau khoảng 2 giờ và duy trì đến 36 giờ. Hấp thu thuốc không bị ảnh hưởng bởi thức ăn [16],[35].

Liều khuyến cáo khởi đầu là 10 mg và điều chỉnh theo đáp ứng của bệnh nhân và tác dụng không mong muốn trong khoảng liều từ 5 đến 20 mg.

Kết quả nghiên cứu đáp ứng liều cho thấy ở bệnh nhân dùng tadalafil liều 10 và 20 mg, tỉ lệ có cải thiện chức năng cương lần lượt là 67% và 81% [37].

- Vardenafil

Vardenafil được cấp phép điều trị rối loạn cương dương từ năm 2003. Tác dụng của thuốc xuất hiện từ 30 phút sau khi uống và giảm đi sau bữa ăn nhiều chất béo [16],[35].

Liều khuyến cáo khởi đầu là 10 mg và điều chỉnh theo đáp ứng của bệnh nhân và tác dụng không mong muốn trong khoảng liều từ 5 đến 20 mg.

Kết quả nghiên cứu đáp ứng liều cho thấy ở bệnh nhân dùng tadalafil liều 5, 10 và 20 mg, tỉ lệ có cải thiện chức năng cương lần lượt là 66%, 76% và 80% [38]. Giống như sildenafil, tadalafil cũng có dạng bào chế viên nén thông thường và viên nén tan trong miệng.

- Avanafil

Avanafil là một thuốc mới, được cấp phép điều trị rối loạn cương dương từ năm 2013. So với các thuốc khác, avanafil có tác dụng ức chế PDEV mạnh hơn các typ PDE khác; do đó, tác dụng không mong muốn của thuốc cũng giảm đi [39].

Thuốc được dùng điều trị rối loạn cương với các liều 50 mg, 100 mg và 200 mg. Liều khởi đầu khuyến cáo là 100 mg uống 30 phút trước khi quan hệ tình dục; điều chỉnh liều theo đáp ứng và dung nạp của bệnh nhân [39]. Thức ăn có thể làm giảm thời gian khởi phát tác dụng của thuốc so với lúc đói, tuy nhiên, avanafil có thể dùng cùng hoặc không cùng thức ăn.

Kết quả nghiên cứu đáp ứng liều cho thấy ở bệnh nhân dùng avanafil liều 50, 100 và 200 mg, tỉ lệ có cải thiện chức năng cương lần lượt là 47%, 58% và 59% [39].

1.2.2.2. Các thuốc khác điều trị rối loạn cương dương

* Yohimbin

Yohimbin là alkaloid chiết từ vỏ cây *Pausinystalia yohimbin*. Yohimbin có tác dụng hủy giao cảm do chặn receptor α_2 -adrenergic, nên có thể tăng cường chức năng cương dương. Tuy nhiên, một số nghiên cứu chỉ ra yohimbin có hiệu quả điều trị không cao và có tác dụng adrenergic ngoại biên, làm tăng huyết áp và nồng độ noradrenalin trong huyết tương. Liều dùng yohimbin theo đường uống 4,5 – 6 mg/lần, 3 lần/ngày [40].

* Alprostadi

- Cơ chế tác dụng: Alprostadin là prostaglandin E1 (PGE-1). Cơ chế tác dụng của prostaglandin E1 là làm giãn mạch ngoại vi, đồng thời làm giãn cơ trơn do ức chế bài tiết noradrenalin và triệt tiêu sự bài tiết angiotensin [41].

- Chỉ định: Điều trị rối loạn cương do nguyên nhân thần kinh, tâm thần như đái tháo đường, xơ vữa động mạch và một số bệnh lý tùy sống [41],[42].

- Chống chỉ định: Bệnh nhân quá mẫn với alprostadi, bệnh nhân có nguy cơ cao cương đau dương vật, bệnh nhân có rối loạn chảy máu [41],[42].

- Đường dùng:

+ Tiêm vào thể hang: Khi bệnh nhân không đáp ứng với thuốc dùng đường uống, có thể chuyển sang dùng các thuốc tiêm vào thể hang. Tác dụng cương dương xuất hiện 5-15 phút sau khi tiêm và thời gian kéo dài tác dụng tùy thuộc vào liều tiêm [42].

+ Đặt niệu đạo: Alprostadin được bào chế dưới dạng viên đạn đặt niệu đạo (125-1000 μg) đã được cấp phép để điều trị rối loạn cương [43],[44]. Đặt viên đạn alprostadil vào niệu đạo dương vật bằng một dụng cụ chế tạo sẵn đóng gói kèm theo. Alprostadil ngấm vào tĩnh mạch vật xốp rồi tác động vào vật hang, qua hệ thống tĩnh mạch mũ và tĩnh mạch lưng sâu dương vật, gây cơ chế giãn mạch vùng vật hang. Biện pháp này thường được chỉ định thay thế ở những bệnh nhân không thích hợp với tiêm alprostadil vào thể hang.

+ Ngoài dạng bào chế đưa vào niệu đạo, alprostadil còn có dạng bào chế kem bôi tại chỗ (200 và 300 μg) [45]. Kem bôi alprostadil được bào chế để tăng tính thấm qua lỗ niệu đạo.

- Tác dụng không mong muốn:

+ Tại chỗ: đau dương vật, tụ máu dương vật, cương dương kéo dài, cương đau dương vật, xơ hóa thể hang, chảy máu niệu đạo, nhiễm khuẩn tiết niệu [41],[42].

+ Các tác dụng không mong muốn toàn thân thường ít gặp, bao gồm hạ huyết áp nhẹ (nhất là khi dùng liều cao).

* Các thuốc khác được dùng tiêm vào thể hang

- Papaverin: là thuốc có tác dụng giãn trực tiếp cơ trơn do tác dụng ức chế không đặc hiệu enzym PDE, dẫn đến tăng tích lũy AMP vòng và GMP vòng. Thuốc còn ức chế kênh calci phụ thuộc điện thế, giảm dòng calci đi vào

và ức chế giải phóng dự trữ calci nội bào. Papaverin có tác dụng gây cương dương từ 10-30 phút sau tiêm, kéo dài từ 30 phút – 240 phút. Tác dụng không mong muốn khi dùng papaverin bao gồm tác dụng toàn thân (giãn mạch ngoại biên, hạ huyết áp, nhịp tim nhanh phản xạ, tăng enzym gan), tại chỗ (cương đau, xơ hóa dương vật, giảm cảm giác dương vật) [46]. Thuốc thường được dùng phối hợp với các thuốc khác để tăng hiệu quả điều trị và giảm tác dụng không mong muốn.

- Phentolamin: là thuốc giãn cơ trơn thể hang do tác dụng đối kháng trực tiếp lên receptor α_1 và α_2 -adrenergic; đồng thời, đối kháng chức phận lên tác dụng thông qua tế bào nội mạc mạch máu, có thể thông qua hoạt hóa tổng hợp NO. Cho đến nay, có rất ít nghiên cứu về dùng phentolamin đường uống hoặc đường đặt dưới lưỡi. Thường dùng đường tiêm vào thể hang [47].

1.3. Cơ chế bệnh sinh rối loạn sinh dục nam theo y học cổ truyền và một số dược liệu điều trị rối loạn sinh dục nam đã được nghiên cứu thực nghiệm ở Việt Nam

1.3.1. Cơ chế bệnh sinh rối loạn sinh dục nam theo y học cổ truyền

Y học cổ truyền (YHCT) cho rằng cơ thể con người gồm lục phủ, ngũ tạng, trong đó, tạng thận có vai trò quan trọng, chủ về tàng tinh, sinh trưởng và phát dục của cơ thể [48]. Theo lý luận của YHCT, các biểu hiện của rối loạn sinh dục có thể được sắp xếp thành các dạng bệnh danh khác nhau như: liệt dương được gọi là chứng dương nuy, xuất tinh sớm gọi là chứng hoạt tinh, suy giảm (hoặc không) có tinh trùng dẫn đến vô sinh được gọi là chứng nam tử bất dục v.v... Nhìn chung, mọi nguyên nhân của rối loạn sinh dục đều được xem là có nguồn gốc tại thận. Thận khí hư nhược, tiên thiên bất túc, phòng dục quá độ làm hao tổn thận tinh. Thận âm hư dẫn đến thận tinh hư tổn, dương vật không đủ độ cương cứng, xuất tinh sớm, tinh trùng ít, thiếu

năng sinh dục. Mệnh môn hỏa suy gây liệt dương, xuất tinh sớm, chất lượng tinh trùng kém. Ngoài ra, khí huyết lưỡng hư (âm tỳ hư), can uất khí trệ huyết ứ, đàm thấp ứ trệ, thấp nhiệt hạ trú cũng là nguyên nhân của suy tinh trùng, thiếu năng sinh dục, khó có con [48].

Ngoài ra, tỳ là nguồn sinh hóa tạo thành khí huyết, tỳ hư tất khí huyết sẽ suy giảm nên nuôi dưỡng cân (tông cân – dương vật) bị ảnh hưởng. Tâm chủ huyết mạch và tàng thân nên tâm hư làm huyết không vận hành được bình thường, thần không chủ được sự hợp đồng của các tạng phủ làm cân mạch (tông mạch) không được nuôi dưỡng đầy đủ và điều hòa. Can chủ cân, can khí uất kết làm mất chức năng sơ tiết và điều đạt nên ảnh hưởng đến sự vận động của cân mạch (tông cân). Sự sợ hãi sẽ làm khí loạn, thận khí sẽ bị tổn thương làm ảnh hưởng đến điều phối cân mạch [48].

Ngoài tổn thương các tạng phủ còn có nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh khác như ở người ăn nhiều chất béo ngọt, uống nhiều rượu lâu ngày dẫn đến tích ngưng trong cơ thể, làm ảnh hưởng đến tỳ vị, tích thấp sinh nhiệt, thấp nhiệt hạ trú xuống hạ tiêu làm cân mạch bị tổn thương.

Điều trị các rối loạn sinh dục nam bằng thuốc YHCT đã được chú ý từ lâu, tùy theo thể bệnh mà có các phương thuốc thích hợp.

1.3.2. Một số dược liệu điều trị rối loạn sinh dục nam đã được nghiên cứu thực nghiệm ở Việt Nam

Ở Việt Nam, đã có một số công trình nghiên cứu về tác dụng tăng cường chức năng sinh dục nam của các vị thuốc, bài thuốc đông y trên thực nghiệm như mô tả ở bảng 1.4.

Bảng 1.4. Các nghiên cứu thực nghiệm về tác dụng tăng cường chức năng sinh dục nam của một số dược liệu ở Việt Nam

Tác giả	Năm	Nguyên liệu	Đối tượng nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu
Đậu Xuân Cảnh	2007	Hải mã và Sâm Việt Nam	Chuột cống trắng đực trưởng thành	Cải thiện chức năng tinh hoàn, tăng trọng lượng các cơ quan sinh dục, tăng nồng độ testosterone trong máu [49].
Trần Thanh Tùng	2009	Nhục Thung dung	Chuột cống đực non và trưởng thành	Có hoạt tính androgen, cải thiện chức năng tinh hoàn và khả năng sinh sản trên chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat [50].
Đoàn Minh Thụy	2010	Viên nang Hồi xuân hoàn	Chuột cống trắng đực trưởng thành	Tăng nồng độ testosterone trong máu, tăng số lượng, chất lượng tinh trùng [51].
Trần Mỹ Tiên	2012	Cao chiết cồn của rễ Ba kích	Chuột nhắt trắng đực thiếu	Cao chiết cồn của rễ Ba kích có tác dụng làm tăng trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ và testosterone trong máu trên chuột nhắt đực thiếu [52].
Dương Thị Ly Hương	2012	Rễ Bá bệnh	Chuột cống đực non và trưởng thành	Có hoạt tính androgen, có tác dụng tăng cường hành vi tình dục trên chuột cống trắng bình thường và cải thiện chức năng tinh hoàn và khả năng sinh sản trên chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat [5].

Phan Anh Tuấn	2013	Sâu chít	Chuột cống đực trưởng thành	Có tác dụng làm tăng số lượng tinh trùng, mức độ di động tinh trùng, cải thiện hình thái mô học tinh hoàn và tăng nồng độ testosterone trong máu trên chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng nhiệt và bằng stress trường diễn [53].
Nguyễn Thanh Hương	2017	Dịch chiết nước Tảo dương	Chuột cống đực	Có hoạt tính androgen, có tác dụng cải thiện chức năng tinh hoàn và khả năng sinh sản trên chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat [54].

1.4. Tổng quan về Xà sàng

1.4.1. Xà sàng

Xà sàng có tên khoa học là *Cnidium monneieri* (L.) Cuss., thuộc họ Hoa tán *Umbelliferae* [6].

Người ta thường dùng xà sàng tử (*Fructus Cnidii*) là quả phơi hay sấy khô của cây xà sàng, có những đặc điểm như sau:

1.4.1.1. Mô tả cây

Cây Xà sàng là một loại cỏ cao từ 0,4 - 1m. Thân có vạch dọc. Lá hai lần xẻ lông chim, chiều rộng của thùy 1 - 1,5mm. Cuống lá dài 4 - 8 cm. Có bé lá ngắn. Hoa mọc thành tán kép. Cuống hoa dài 7 - 12 cm, dài hơn lá. Quả dài 2 - 5 mm, có địa mỏng [6].

1.4.1.2. Phân bố, thu hái và chế biến

Mọc hoang ở những nơi đất trống ở nước ta. Thu hái vào tháng 6 đến tháng 8 là thời gian quả chín. Nhổ hay cắt cả cây về phơi khô. Đập lấy quả. Loại bỏ tạp chất. Phơi lần nữa cho thật khô là được [6].



Hình 1.2. Hình ảnh cây và quả Xà sàng

1.4.1.3. Thành phần hóa học

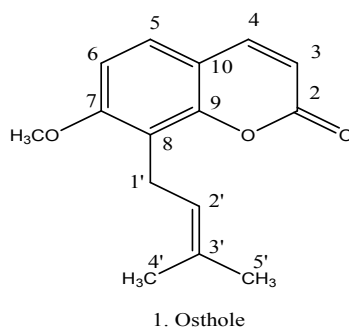
Nghiên cứu của các tác giả Trung Quốc cho thấy nhóm hợp chất trong cây Xà sàng (*Cnidium monnieri*) bao gồm [55]:

- Các coumarin và furanocoumarin: gồm osthol là thành phần chính, imperatorin, xanthotoxin (methosalen), isopimpinellin, bergapten và cnidilin.
- Các tetramethylpirazin
- Các secquiterpen: torilin, torilolon và 1-hydroxytorilin.
- Các hợp chất chromon như umtatin, cnidimol và karentin.
- Daucosterol.
- Các terpenoid như α -pinen, camphen và limonen.

Tại phòng Dược liệu trường Đại Học Y Học Cổ Truyền Phúc Kiến, Trung Quốc, nhóm nghiên cứu của Lei Liu đã chiết xuất và định lượng các thành phần hóa học của quả Xà sàng được thu thập ở khu vực tỉnh Hắc Long Giang, Trung Quốc với các lần chiết khác nhau cho kết quả định lượng như sau: osthol 0,91 - 2,467%; imperatorin: 0,014 - 0,877%; bergapten 0,030 - 0,168%; isopimpinelin: 0,074 - 0,287%; xanthotoxin 0,023 - 0,181% [56].

Nghiên cứu của Dien PH và cs năm 2012 về các thành phần chính từ quả Xà sàng ở Việt Nam cho thấy: Từ dịch chiết ethyl acetat của quả Xà sàng, nhóm nghiên cứu tinh chiết được 3 loại furanocoumarin là osthol, xanthotoxin, imperatorin và 1 sterol là daucosterol [58].

Thành phần chính trong quả Xà sàng là osthol. Osthol là một hợp chất được phân lập từ thiên nhiên, có tên khoa học là 7-methoxy-8-isopentenyl coumarin, là chất rắn màu trắng, có công thức phân tử $C_{15}H_{16}O_3$, khối lượng phân tử 244,29; điểm nóng chảy $83 - 84^{\circ}C$, có công thức cấu tạo như sau:



Hình 1.3. Cấu trúc hóa học của osthol [6]

Trong thiên nhiên, osthol được tìm thấy là thành phần chính trong quả Xà sàng (*Cnidium monnieri*) và một số loài thực vật khác như *Imperatoria ostruthium*, *Peucedanum hispanicum*, *Seseli siribicum*, *Angelica pubescens*....[55].

1.4.1.4. Công dụng và liều dùng

Trích đoạn Y văn cổ: “Xà sàng có tác dụng trị đàn ông liệt dương, giúp dễ sinh con (lệnh nhân hữu tử); trị nam giới đau nhức vùng thắt lưng (khử nam tử yêu đông), đục nam tử âm, tính năng ích dương có thể làm khỏi bệnh lại thêm bồi bổ cơ thể” [59].

Theo Đỗ Tất Lợi, quả Xà sàng có vị cay đắng, tính bình, hơi có độc, vào 2 kinh thận và tam tiêu. Tác dụng cường dương, ích thận, khử phong táo thấp, dùng chữa liệt dương, bộ phận sinh dục ẩm ngứa, phụ nữ lạnh tử cung,

không có con, khí hư, xích bạch đới. Liều dùng 4 đến 12 g dưới dạng thuốc sắc uống riêng hoặc phối hợp với các vị thuốc khác [6].

Một số bài thuốc phối hợp quả Xà sàng với các dược liệu khác để trị nam liệt dương:

- Tam tử hoàn: Xà sàng tử, Ngũ vị tử, Thỏ ty tử lượng bằng nhau, làm hoàn mỗi lần uống 5g, ngày 2 lần.

- Xà sàng tử 10g, Dâm dương hoắc 8g, Sơn thù 10g, Tiểu hồi hương 2g, nước 600ml sắc thành 200ml, chia làm 3 lần uống trong ngày.

1.4.2. Các nghiên cứu về quả Xà sàng

1.4.2.1. Các nghiên cứu liên quan đến chức năng sinh dục và khả năng sinh sản

Nghiên cứu *in vitro* của James Chen và cs. năm 2000 đánh giá tác dụng của osthol trên cơ trơn thể hang của chuột cống trắng cô lập. Kết quả cho thấy osthol có tác dụng làm giãn cơ trơn thể hang, có thể do cơ chế làm tăng giải phóng nitric oxid từ nội mạc hoặc do ức chế phosphodiesterase [7].

Nghiên cứu của Yuan J. và cs năm 2004 đánh giá tác dụng của osthol trên nồng độ androgen và hoạt độ NOS trên chuột cống đực non thiếu cho thấy osthol làm tăng nồng độ testosterone, LH, FSH và hoạt độ NOS [8].

Nghiên cứu của Xie Jin-xian năm 2007 đánh giá ảnh hưởng của osthol trên nồng độ androgen và receptor androgen ở tinh hoàn của chuột nhắt trắng gây rối loạn sinh sản bằng cyclophosphamid cho thấy osthol có tác dụng làm tăng nồng độ testosterone trong máu và tăng biểu hiện của receptor androgen ở tinh hoàn [9].

1.4.2.2. Các nghiên cứu khác

Bảng 1.5. Các nghiên cứu về tác dụng dược lý của quả Xà sàng và hợp chất osthol

Năm	Tác giả	Kết quả
Tác dụng trên tim mạch		
2007	Matthew Lai Yin Chan và cs.	Osthol có tác dụng giãn mạch bằng cơ chế nội mạc và giãn cơ trơn mạch máu, thông qua con đường nitric oxid – GMP vòng trên động mạch vành ở lợn [60].
2012	F.Fusi và cs.	Osthol có tác dụng chặn kênh calci Ca(v)1.2 trên tế bào cơ trơn động mạch đuôi chuột cống [61].
2013	Xian Yue-wang và cs.	Osthol có tác dụng bảo vệ trên chuột cống gây nhồi máu cơ tim, tác dụng này do khả năng chống oxy hóa và chống viêm [62].
Tác dụng trên thần kinh trung ương		
1998	Zhou Qing và cs.	Osthol làm tăng tác dụng an thần gây ra bởi pentobarbital và đối kháng tác dụng gây kích thích của caffein trên chuột nhắt trắng [63].
2011	J.Singhuber và cs.	Osthol có tác dụng điều biến receptor của GABA _A với vị trí gắn khác với vị trí gắn của benzodiazepin, làm tăng gắn GABA _A với receptor [64].
Tác dụng trên chuyển hóa và nội tiết		
1996	Quin LP	Osthol và coumarin toàn phần từ <i>Fructus Cnidii</i> có tác dụng làm tăng nồng độ T3, T4, TSH trong máu chuột cống trắng bị gây chứng Thận dương hư bằng tiêm hydrocortison [65].

2006	Song Fang và cs.	Osthol có tác dụng hạ cholesterol toàn phần, triglycerid, tỉ lệ LDL-c/ HDL-c và giảm tình trạng gan nhiễm mỡ trên chuột cống trắng gây rối loạn lipid máu [66].
2009	Liang và cs.	Osthol có tác dụng làm hạ glucose máu trên chuột nhắt trắng đái tháo đường db/db [67].
Tác dụng trên xương		
1994	Li QN và cs.	Coumarin toàn phần từ <i>Fructus Cnidii</i> có tác dụng dự phòng mất xương ở chuột cống cắt buồng trứng [68].
2010	Wenping Zhang và cs.	Osthol ở các nồng độ 40 – 320 µg/ml có tác dụng tăng sự nhân lên và biệt hóa của các tạo cốt bào từ chuột cống <i>Sprague-Dawley</i> sơ sinh. Nồng độ dưới 40 µg/ml có tác dụng kém hơn, nồng độ trên 320 µg/ml gây độc tế bào [69].
Tác dụng chống viêm, chống dị ứng		
2002	Matsuda và cs.	Dịch chiết cồn của <i>Fructus Cnidii</i> và osthol có tác dụng ức chế trên 3 mô hình: phản vệ thụ động trên da 48h, viêm da tiếp xúc gây ra bởi 2, 4-dinitrofluorobenzene (DNFB) và viêm da tiếp xúc gây ra bởi picryl chlorid (PC) trên chuột nhắt trắng ICR, chuột cống trắng Wistar [70].
2003	Wei Jia và cs.	Dịch chiết từ Xà sàng có tác dụng ức chế đáng kể tình trạng phù chân chuột trên cả 2 mô hình gây phù chân chuột bằng carragenin và tá chất Freund hoàn chỉnh trên chuột cống trắng [71].

2016	Jinshu và cs.	<p>Dịch chiết cồn của quả Xà sàng có tác dụng:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ức chế phản ứng phản vệ thụ động trên da (passive cutaneous anaphylaxis test) ở chuột cống. - Ức chế giải phóng hạt từ màng tế bào mast lấy từ xương sọ của chuột cống. - Ức chế giải phóng histamin từ tế bào mast lấy từ màng bụng chuột cống [72].
Tác dụng kháng u		
2006	Szu-Yuan Chou và cs.	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i>: Osthol ức chế sự tăng trưởng của tế bào HeLa (tác dụng phụ thuộc thời gian và nồng độ) với IC_{50} là 77,96 và 64,94 μM trong 24h và 48h. - <i>In vivo</i>: Thời gian sống của chuột nhắt CDF₁ có khối u tế bào P-288D1 kéo dài (ILS% = 37) sau khi dùng osthol [73].
2012	Lurong Zhang và cs.	Osthol ức chế sự phát triển của tế bào ung thư biểu mô gan <i>in vitro</i> và <i>in vivo</i> thông qua tác động vào chu kỳ tế bào và gây chết tế bào theo chương trình bằng cách ức chế hoạt tính của NF-kB và tăng biểu hiện gen liên quan đến chết theo chương trình [74].
2012	Lintao Wang và cs.	Osthol có tác dụng ức chế sự nhân lên của các tế bào ung thư vú MDA-MB435, thông qua con đường gây chết theo chương trình (nhờ hoạt hóa caspase-9 và caspase-3 dẫn đến giáng hóa PARP), tác động vào pha G1 quá trình phân bào (do tăng biểu hiện p53 và p21, giảm biểu hiện Cdk2 và cyclin D1) [75].
2012	DienPH và cs.	Osthol có tác dụng gây độc mức độ trung bình và không đặc hiệu lên 4 loại tế bào ung thư ở người: KB (ung thư biểu mô biểu bì, MCF7 (ung thư biểu mô tuyến vú), SK-LU-1 (ung thư biểu mô phổi), HepG2 (ung thư biểu mô tế bào gan) [58].

Mặc dù đã được sử dụng khá phổ biến ở một số nước (như Mỹ, Trung Quốc) dưới dạng thực phẩm chức năng điều trị rối loạn sinh dục nam nhưng cho đến nay chưa tìm thấy nhiều nghiên cứu chứng minh tác dụng trong điều trị rối loạn sinh dục nam cũng như tính an toàn của quả Xà sàng.

Vì vậy, đề tài này được tiến hành nhằm đánh giá tác dụng trong điều trị rối loạn sinh dục nam và tính an toàn của quả Xà sàng. Từ đó cung cấp bằng chứng khoa học cho việc sử dụng trên lâm sàng.

Để đánh giá một cách chính xác nhất tác dụng của một thuốc nghiên cứu, nhà nghiên cứu cần lựa chọn các mô hình nghiên cứu trên thực nghiệm phù hợp nhất với mục đích nghiên cứu và điều kiện sẵn có. Sau đây là phân tổng quan các mô hình nghiên cứu trên thực nghiệm về tác dụng trên chức năng sinh dục nam.

1.5. Các phương pháp nghiên cứu tác dụng trên chức năng sinh dục – sinh sản nam trên thực nghiệm

Trong những năm gần đây, ngày càng có nhiều nghiên cứu liên quan đến việc phát triển các thuốc mới để điều trị các tình trạng bệnh lý rối loạn sinh dục. Những kiến thức về cơ chế sinh lý, tâm thần, dược lý liên quan đến chức năng sinh dục đều dựa vào các nghiên cứu trên động vật và người. Mỗi tương quan giữa các mô hình thực nghiệm và dữ liệu lâm sàng đang dần được thiết lập; từ đó, cải thiện các mô hình động vật hiện có và tăng khả năng tiên đoán hiệu quả lâm sàng ở người.

1.5.1. Phương pháp nghiên cứu hành vi tình dục trên động vật thực nghiệm

Có 2 mô hình thực nghiệm nghiên cứu tác dụng của thuốc trên hoạt động tình dục, đó là test hành vi tình dục (sexual behaviour test) và test ham muốn tình dục (test for libido) [76].

* Test hành vi tình dục

Chuột cống đực và cái trưởng thành, được nuôi trong điều kiện nhiệt độ, độ ẩm thích hợp, chu kỳ sáng tối được đảo ngược nhân tạo. Chuột cống cái được gây động dục nhân tạo. Chuột đực được làm quen với test hành vi tình dục trong các đợt huấn luyện, mỗi đợt cách nhau 4 ngày. Các thông số quan sát gồm: MF, ML, IF, IL, EL, PEI [77],[78]. Trong 4 đợt huấn luyện cuối cùng, chỉ những chuột có hoạt động tình dục kém (không hoàn thành ít nhất 1 test sàng lọc) mới được đưa vào nghiên cứu. Thuốc đối chiếu có thể là sildenafil hoặc testosterone. Thử nghiệm được tiến hành như trong test huấn luyện vào ngày cuối cùng của đợt điều trị trong cùng phòng thí nghiệm. Quan sát, ghi lại và so sánh chỉ số hành vi tình dục giữa các lô [77],[78].

* Test ham muốn tình dục

Sự ham muốn tình dục có thể phát sinh do cơ quan sinh dục bị kích thích hoặc khi có sự kích thích bởi nghe, nhìn, ngửi mùi đối tượng khác giới. Khi gây tê dương vật, cảm giác tại cơ quan sinh dục không còn, do đó làm mất đi sự ham muốn được mang đến bởi cảm giác tại cơ quan sinh dục. Test ham muốn tình dục là một thử nghiệm để đánh giá tác dụng của thuốc trên lòng ham muốn tình dục nội tại, được phản ánh qua chỉ số ML, MF [76].

Chuẩn bị, huấn luyện chuột, chọn chuột, chia lô và cho uống thuốc như trên. Thử nghiệm được tiến hành vào ngày cuối cùng của đợt điều trị. Bộc lộ dương vật bằng cách thụt màng bao dương vật và bôi mỡ xylocain 5% vào dương vật tại các thời điểm 30 phút, 15 phút và 5 phút trước khi bắt đầu cho giao phối. Cho mỗi con đực vào một chuồng quan sát, sau đó cho một con cái vào. Ghi lại các chỉ số ML, MF và so sánh giữa các lô với nhau [76].

1.5.2. Các phương pháp nghiên cứu chức năng cương dương trên thực nghiệm

Cương dương là một mắt xích cơ bản trong đời sống tình dục của nam giới. Hiện nay, tỷ lệ nam giới bị rối loạn cương dương có xu hướng ngày càng

tăng, do đó, cần thiết phải phát triển các thuốc có tác dụng điều trị rối loạn cương dương. Các mô hình được trình bày sau đây có thể dùng để nghiên cứu tác dụng của thuốc trên chức năng cương dương.

1.5.2.1. Test cương dương trên động vật tỉnh

* Test cương trên thỏ

Bình thường không nhìn thấy dương vật của thỏ. Khi dương vật cương mới quan sát thấy và có thể đo được chiều dài dương vật. Thỏ đực trưởng thành khỏe mạnh được nuôi ít nhất 1 tuần trước khi làm nghiên cứu trong điều kiện phòng thí nghiệm. Cho thỏ dùng thuốc. Giữ thỏ nhẹ nhàng trong một phòng yên tĩnh, hạn chế mọi kích thích. Đo chiều dài dương vật (đoạn dương vật được lộ ra, không bị che bởi bao quy đầu) tại các thời điểm 5, 10, 15, 30, 50, 60, 90, 120 phút sau khi dùng thuốc và tiếp tục như vậy đến khi hết khoảng thời gian nghiên cứu (thời gian này thay đổi tùy theo tác dụng của từng thuốc thử) [79],[80].

* Test cương trên chuột cống

- Test cương không tiếp xúc:

Trong thí nghiệm cương không tiếp xúc, chuồng quan sát được chia làm 2 nửa bằng một hàng rào hai lớp mắt lưới kim loại rộng 3 mm và cách nhau 2,5 cm. Hàng rào ngăn cản sự tiếp xúc trực tiếp giữa con đực và con cái ở 2 bên nhưng vẫn cho phép chuột có thể bị kích thích bởi nghe, nhìn và ngửi mùi của con cái. Chuột đực được nhốt một mình trong một bên của chuồng quan sát trong 5 phút để làm quen, sau đó, chuột cái được đưa vào bên kia chuồng, quan sát hiện tượng cương của con đực trong 30 phút. Sự cương được xác định khi con đực đứng lên trên gót 2 chân sau, cúi đầu về phía vùng sinh dục và hông chuyển động. Sau mỗi test cương không tiếp xúc, rửa chuồng quan sát và hàng rào bằng chất tẩy rửa, làm khô rồi mới thử chuột tiếp theo [81],[82].

- Test cương gây ra bởi apomorphin:

Đặt chuột đực một mình trong chuồng quan sát 5 phút để làm quen. Chuột được tiêm dưới da apomorphin liều 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Quan sát và ghi lại các hiện tượng cương (erection, quick flip, long flip) trong 30 phút sau khi tiêm. Sự cương dương vật được ghi lại khi con chuột thể hiện hoạt động như trong test cương không tiếp xúc [81],[82].

- Test cương phản xạ

Chuột đực cố định trong một ống nhựa có đường kính 8cm, dài 20cm trong 5 phút để làm quen. Sau đó co vỏ bao quy đầu và để lộ dương vật bằng một vòng kim loại lỏng. Đáp ứng phản xạ được quan sát bằng mắt thường như sự kéo dài của thân dương vật, sung huyết quy đầu và sự gập thân dương vật. Test kéo dài trong 15 phút kể từ khi có đáp ứng đầu tiên [81],[82].

Các phương pháp đánh giá chức năng cương được nêu trên đây có nhược điểm là tính chính xác không cao do chịu ảnh hưởng nhiều bởi ngoại cảnh và chủ quan của người quan sát. Để khắc phục tình trạng này, hiện nay, một phương pháp được sử dụng phổ biến trên thế giới để đánh giá tác dụng của một thuốc thử lên chức năng cương dương là đo áp lực thể hang (ICP). Phương pháp đo áp lực thể hang có thể thực hiện trên động vật gây mê hoặc trên động vật tỉnh.

1.5.2.2. Đo áp lực thể hang (ICP)

6 Đo ICP trên động vật gây mê

Khả năng cương của dương vật sau thời gian dùng thuốc được đánh giá dựa trên ICP đo được sau khi kích thích dây thần kinh hang bằng điện.

Chuột cống đực trưởng thành được 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. Gây cương dương vật bằng cách kích thích điện dây thần kinh hang và ghi lại ICP [81],[82],[83].

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 thể hang đều có thể làm tăng sự cương dương. Thuốc có tác dụng tăng cường sự cương dương khi làm tăng giá trị ICP cực đại ở lô thử so với lô chứng [83].

Thuốc làm tăng dòng máu trong thể hang là do làm giãn cơ trơn dương vật, do đó nó có thể làm giãn mạch và gây giảm huyết áp động mạch trung bình. Kích thích thần kinh thể hang bằng điện gây giảm thoáng qua huyết áp động mạch trung bình, và gây ra sự tăng ICP kéo dài ngay cả sau khi đã ngừng kích thích [83].

* Đo ICP trên động vật tinh bằng kỹ thuật theo dõi từ xa

Trước khi can thiệp bằng thuốc, chuột đực được cấy bộ cảm biến cho phép theo dõi ICP từ xa vào trong thể hang. Phương pháp này cho phép đo ICP trong test hành vi tình dục, test cương không tiếp xúc, test cương bởi apomorphin và test cương phản xạ mà không cần gây mê chuột [82].

Đo ICP bằng kỹ thuật theo dõi từ xa cung cấp số liệu có giá trị và xác thực về ICP trong các hoạt động giao cấu của chuột. Mô hình này có ưu điểm hơn mô hình đo ICP bằng kích thích điện là chuột không bị gây mê, do đó có thể ghi lại những diễn biến của ICP trong các điều kiện hoạt động tự nhiên. Tuy nhiên, nhược điểm của mô hình là khó có thể đưa thuốc vào trong thể hang chuột khi chuột đang hoạt động [66],[82].

1.5.2.3. Đo dòng máu chảy qua dương vật

Dùng siêu âm Doppler để đánh giá vi tuần hoàn dương vật, dòng máu chảy qua dương vật và đặc tính mạch máu ở dương vật, từ đó đánh giá tác dụng của thuốc trên chức năng cương dương qua tác động lên dòng máu chảy qua dương vật. Tốc độ dòng máu chảy qua dương vật được ghi lại và được so sánh giữa các lô. Phương pháp này được dùng kết hợp với đo ICP bằng kích thích điện dây thần kinh hang (ở chuột cống) hoặc co vỏ bao dương vật (ở

thỏ) [82],[84],[85]. Một thuốc có tác dụng tăng cường chức năng cương dương khi làm tăng tốc độ dòng chảy trước và sau khi kích thích và làm giảm tốc độ dòng chảy trong quá trình kích thích thần kinh hang để gây cương cứng.

1.5.2.4. Nghiên cứu trên cơ trơn thể hang cô lập

Động vật thường được sử dụng là thỏ, chuột cống. Cô lập dải thể hang, nuôi trong bình nuôi cơ quan cô lập. Với thỏ, bình nuôi cơ quan cô lập chứa dung dịch đệm Tyrod ở 37°C, bão hòa 95% O₂ và 5% CO₂. Với chuột cống, bình nuôi cơ quan cô lập chứa dung dịch muối sinh lý đệm bởi HEPES (140mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 5mM HEPES, 11mM glucose) với 100% O₂ [82],[86]. Ghi lại hoạt động co, giãn của cơ trơn thể hang dưới tác dụng của thuốc hoặc hóa chất như phenylephrin, acetylcholin, isobutyl methylxanthien (IBMX) - một chất ức chế phosphodiesterase không chọn lọc hoặc GMP vòng [82],[86].

Nghiên cứu này được thực hiện để tìm hiểu cơ chế tác dụng của thuốc trên cơ trơn thể hang. Thuốc làm giãn cơ trơn thể hang có thể do làm tăng giải phóng NO từ nội mô mạch máu hoặc do ức chế enzym phosphodiesterase.

1.5.3. Các phương pháp nghiên cứu vai trò của hormon với hoạt động tình dục trên thực nghiệm

Androgen là hormon sinh dục nam, đóng vai trò quan trọng trong chức năng sinh sản của nam giới. Nó cần thiết để hình thành và duy trì các đặc tính sinh dục nam thứ phát, ảnh hưởng đến khả năng sinh sản và hoạt động tình dục. Vì vậy, thử hoạt tính androgen là một bước để sàng lọc và đánh giá tác dụng của thuốc trên chức năng sinh sản nam.

Các thử nghiệm về hoạt tính androgen phụ thuộc vào sự nhạy cảm của các cơ quan sinh dục phụ loài gặm nhấm đực và các cấu trúc giới tính thứ cấp của chim và động vật có vú đối với androgen. Trước đây, các nhà nghiên cứu dựa vào đáp ứng của mào gà trống choai thiếu để đánh giá hoạt tính androgen.

Sau đó, các nhà khoa học có những cải tiến phương pháp sử dụng chuột nhắt trắng, chuột cống trắng. Hiện nay, phương pháp nghiên cứu hoạt tính androgen phổ biến được sử dụng là nghiên cứu ảnh hưởng trên trọng lượng cơ quan sinh dục phụ của chuột cống đực. Cơ quan sinh dục phụ của chuột cống đực non rất nhạy cảm với androgen. Có thể tiến hành trên chuột cống đực non thiếu hoặc chuột cống đực non cai sữa.

1.5.3.1. Nghiên cứu hoạt tính androgen trên chuột cống đực non thiếu (Phương pháp Hershberger)

Đây là phương pháp nhạy cảm, có giá trị, đáng tin cậy và được cho là một mô hình tốt để sàng lọc các thuốc có hoạt tính androgen cũng như kháng androgen [87]. Chuột cống đực non 42-50 ngày tuổi, được thiếu, cắt bỏ 2 tinh hoàn 2 bên để loại trừ ảnh hưởng của androgen nội sinh, sau đó dùng thuốc nghiên cứu. Thuốc chứng dương sử dụng là testosterone propionat, tiêm dưới da đùi với liều 0,4 mg/kg thể trọng/ngày. Thuốc nghiên cứu dùng ít nhất 2 liều [87]. Chỉ số nghiên cứu chính bao gồm trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ (túi tinh, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn – hành hang, tuyến tiền liệt, đầu dương vật). Thuốc nghiên cứu được đánh giá là có hoạt tính androgen khi làm tăng trọng lượng ít nhất 2 cơ quan sinh dục phụ nói trên [87].

1.5.3. 2. Nghiên cứu hoạt tính androgen trên chuột cống đực non cai sữa

Chuột cống đực non 20 - 34 ngày tuổi được cho dùng thuốc nghiên cứu. Thuốc chứng dương sử dụng là testosterone propionat, tiêm dưới da đùi với liều 1,0 mg/kg thể trọng/ngày. Thuốc nghiên cứu dùng ít nhất 2 liều [87]. Chỉ số nghiên cứu chính bao gồm trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ (mào tinh, túi tinh, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn – hành hang, tuyến tiền liệt, đầu dương vật). Thuốc nghiên cứu được đánh giá là có hoạt tính androgen khi làm tăng trọng lượng ít nhất 2 cơ quan sinh dục phụ nói trên [87].

Bên cạnh các phương pháp nghiên cứu hoạt tính androgen trên động vật thực nghiệm còn có các phương pháp nghiên cứu hoạt tính androgen của thuốc *in vitro* như định lượng testosterone trong máu, nghiên cứu ái lực gắn của thuốc với androgen receptor, định lượng androgen receptor (AR) ở tuyến tiền liệt.

1.5.4. Các phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc lên hình thái cơ quan sinh dục và khả năng sinh sản

1.5.4.1. Phương pháp đánh giá trực tiếp trên chuột cống đực

*** Phân tích tinh trùng**

Chuột cống đực trưởng thành được dùng thuốc nghiên cứu trong một khoảng thời gian nhất định tùy vào mục đích điều trị. Sau đợt điều trị, mổ chuột, phẫu tách tinh hoàn và cân. Tách mào tinh ra để phân tích tinh trùng. Các chỉ số phân tích gồm: mật độ tinh trùng, tỷ lệ tinh trùng sống/chết, khả năng di động của tinh trùng [89],[90].

*** Đánh giá hình thái tinh trùng**

Ngoài ra, tinh trùng còn được lấy để làm tiêu bản mô học về hình thái tinh trùng. Tiêu bản tinh trùng được nhuộm bằng kỹ thuật nhuộm papanicolaou: tinh trùng sau khi được lấy ra từ đuôi mào tinh được cố định trên lam kính bằng dung dịch methanol 96%, sau đó nhuộm papanicolaou. Tiêu bản hình thái tinh trùng được quan sát dưới kính hiển vi để xác định hình thái và phát hiện những cấu trúc bất thường ở đầu, cổ hay đuôi tinh trùng [89],[90].

*** Đánh giá hình thái tinh hoàn**

Tinh hoàn được lấy để làm tiêu bản mô học tinh hoàn, đánh giá chức năng sinh tinh của tinh hoàn. Tinh hoàn sau khi được phẫu tích, còn nguyên cả vỏ bao, được cố định trong dung dịch formol đậm trung tính 10% và sử dụng kỹ thuật nhuộm Hematoxyline - Eosin (HE) để đánh giá hình thái tinh hoàn. Tiêu

bản hình thái tinh hoàn được quan sát dưới kính hiển vi để đánh giá thay đổi về cấu trúc của biểu mô tinh, ống sinh tinh, tuyến kẽ; số lượng, mật độ và kích thước ống sinh tinh; số lượng các tế bào dòng tinh [89],[90].

1.5.4.2. Phương pháp đánh giá gián tiếp trên sự mang thai của chuột cái

Chuột công đực được dùng thuốc nghiên cứu, sau đó cho ghép đôi với chuột công cái không dùng thuốc nghiên cứu. Thông thường, 1 chuột đực được ghép đôi với 2 chuột cái. Qua đó, đánh giá gián tiếp chất lượng tinh trùng, hoạt động tình dục và khả năng sinh sản của chuột đực thông qua đánh giá các chỉ số mang thai trên chuột cái. Cùng với việc phân tích số lượng và chất lượng tinh trùng, nghiên cứu trên sự mang thai của chuột cái cho phép khẳng định hơn nữa tác dụng của thuốc nghiên cứu trên khả năng sinh sản nam [89],[90].

Các chỉ số nghiên cứu mang thai của chuột cái bao gồm: tỉ lệ chuột cái có thai, số hoàng thể, số thai đậu, số thai bình thường, số mất trứng, số thai chết sớm, số thai chết muộn.

1.5.5. Các mô hình nghiên cứu trên động vật gây suy giảm sinh sản

Bên cạnh các phương pháp nghiên cứu trên động vật thực nghiệm bình thường, các nhà nghiên cứu còn xây dựng và áp dụng những mô hình nghiên cứu trên động vật gây suy giảm sinh sản, từ đó, đánh giá tác dụng của thuốc nghiên cứu trong điều trị suy giảm sinh sản nam. Các phương pháp được sử dụng để gây suy giảm sinh sản ở động vật thực nghiệm bao gồm: suy giảm sinh sản do tuổi, stress, tia xạ, thuốc/hóa chất, đột biến và bệnh lý toàn thân. Trên cơ sở gây được các động vật có tình trạng suy giảm sinh sản, các nhà nghiên cứu sử dụng các phương pháp nghiên cứu đã trình bày trên đây nhằm đánh giá tác dụng của thuốc nghiên cứu.

1.5.5.1. Suy giảm sinh sản do tuổi

Loại động vật già thường được sử dụng là chuột cống đực *Brown Norway* (25 tháng tuổi), chuột cống đực *Sprague-Dawley* (9-10 tháng tuổi), chuột nhắt (22-26 tháng tuổi), thỏ (20 tháng tuổi). Đặc điểm của các loại động vật này là có tình trạng rối loạn cương, suy chức năng nội mạc mạch máu, suy giảm testosterone do tuổi già gây ra [91]. Các loại động vật già thường được sử dụng để đánh giá các test cương dương, test hành vi tình dục hoặc đánh giá chức năng sinh sản....

1.5.5.2. Suy giảm sinh sản do stress

Suy giảm sinh sản có thể do nhiều nguyên nhân gây ra, trong đó có nguyên nhân stress. Stress có thể gây ức chế tổng hợp steroid ở tinh hoàn, dẫn đến giảm testosterone. Có thể gây stress bằng cách nhốt chuột cống đực trưởng thành bất động trong buồng nhốt kích thước nhỏ (20 x 7 cm) bằng nhựa trong suốt có đục lỗ 12 tiếng/ ngày (thường là từ 6 giờ đến 18 giờ). Sau đó, đánh giá ảnh hưởng của thuốc thử trên test hành vi tình dục, test cương dương, nồng độ testosterone...[92].

1.5.5.3. Suy giảm sinh sản do nhiệt

Nhiệt có thể gây tác động lớn đến hệ sinh sản ở động vật, đặc biệt ức chế quá trình sinh tinh, ức chế chức năng sinh sản. Một trong những phương pháp được sử dụng để gây suy giảm sinh sản do nhiệt là cho động vật thí nghiệm (thường là chuột cống) tiếp xúc với môi trường nhiệt độ cao (40°C) mỗi ngày 2 giờ trong 7 ngày liên tục [94].

1.5.5.4. Suy giảm sinh sản do tia xạ

Chiếu xạ làm giảm quá trình sinh tinh, rối loạn hormon dẫn đến suy giảm sinh sản thông qua cơ chế tạo các gốc tự do. Chuột cống đực trưởng thành được chiếu xạ (tia gamma) ở vùng bìu. Chuột được dùng thuốc nghiên

cứu và đánh giá tác dụng trên chức năng sinh sản, số lượng, chất lượng tinh trùng, hình thái tinh hoàn và định lượng testosterone [95].

1.5.5.5. Suy giảm sinh sản do thuốc/hóa chất

Một số loại thuốc/ hóa chất được sử dụng gây ra tình trạng rối loạn hormon, ức chế sinh tinh, dẫn đến rối loạn sinh sản. Chuột cống đực trưởng thành được dùng thuốc/ hóa chất gây suy giảm sinh sản, sau đó dùng thuốc nghiên cứu (bảo vệ hoặc phục hồi). Từ đó, đánh giá ảnh hưởng của thuốc lên cấu trúc, chức năng cơ quan sinh dục, cũng như chức năng sinh sản. Một số thuốc/ hóa chất được sử dụng để gây suy giảm sinh sản gồm:

- Estrogen: Tiêm bắp 500 µg/kg/ngày trong 14 ngày [96].
- Natri valproat: Uống 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần [97].
- Rượu :Uống 2 mg/kg/ngày trong 60 ngày [98].
- Cyclophosphamid: Tiêm màng bụng 100 mg/kg, 1 lần duy nhất; hoặc tiêm màng bụng 15 mg/kg, 1 tuần 1 lần, trong 4 tuần [99].

1.5.5.6. Suy giảm sinh sản do đột biến

Các nhà khoa học đã và đang phát triển các mô hình suy giảm sinh sản do đột biến di truyền. Những nghiên cứu trên các chủng chuột di truyền này cho phép đánh giá sâu sắc hơn tác dụng riêng biệt của từng loại hormon đối với chức năng sinh sản ở nam giới. Một số mô hình gây suy giảm sinh dục trên động vật thực nghiệm bằng đột biến di truyền bao gồm:

- Đột biến gen GnRH vùng dưới đồi (chuột hpg - hypogonadism) [100].
- Đột biến mất receptor đáp ứng với androgen (chuột ARKO – Androgen Receptor Knockout Mice) [101].
- Đột biến chuyển đoạn gen (transgenic mice) [102].
- Đột biến điểm do hóa chất (sử dụng chất gây đột biến ENU - N-ethyl-N-nitrourea) [102].

Trong luận án này, nhóm nghiên cứu sử dụng các phương pháp sau đây để đánh giá tác dụng của chế phẩm OS35 lên chức năng sinh dục nam:

- Đánh giá hoạt tính androgen trên chuột cống đực non thiếu.
- Đánh giá tác dụng của chế phẩm OS35 lên chức năng cương dương trên thỏ đực trưởng thành ở trạng thái tỉnh (không gây mê) và đo áp lực thể hang (ICP) trên chuột cống trắng đực trưởng thành.
- Đánh giá tác dụng của OS35 lên hành vi tình dục trên chuột cống trắng đực trưởng thành.
- Sử dụng natri valproat gây suy giảm sinh sản cho chuột cống đực trưởng thành, sau đó, đánh giá các chỉ số nghiên cứu trực tiếp trên chuột đực và các chỉ số nghiên cứu gián tiếp trên chuột cái giao phối với chuột đực gây suy giảm sinh sản.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Chế phẩm OS35 là cao chiết cồn của quả Xà sàng; do Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm khoa học công nghệ Việt Nam cung cấp, đạt Tiêu chuẩn cơ sở.

Quả Xà sàng thu hái từ tháng 6 đến tháng 8 tại một số tỉnh Tuyên Quang, Bắc Giang, Lạng Sơn... Quả thu hái về được loại bỏ tạp, phơi khô và nghiền nhỏ, được chiết nóng với ethanol 70%, lọc lấy dịch chiết. Cô dịch chiết thu được, loại tạp bằng n-hexan và aceton. Quy trình chiết xuất chế phẩm OS35 được trình bày trong Phụ lục 1. Chế phẩm OS35 có chứa osthol chiếm 35% với hệ suất chiết là 3%. Thuốc thử được pha trong dung môi là dung dịch CMC 0,5% trước khi cho động vật thí nghiệm uống.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu	Đối tượng	Đặc điểm
Độc tính cấp	Chuột nhắt trắng chủng <i>Swiss</i> (do Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp).	Cả 2 giống, khỏe mạnh, trọng lượng 18 - 20 g.
- Độc tính bán trường diễn - Test hành vi tình dục - Tác dụng trên chuột gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat	Chuột cống trắng chủng <i>Wistar</i> (do Học viện Quân y cung cấp).	Cả 2 giống, trưởng thành, khỏe mạnh, 10 - 12 tuần tuổi, trọng lượng 200 - 220 g.
Hoạt tính androgen	Chuột cống trắng chủng <i>Wistar</i> (do Học viện Quân y cung cấp).	Giống đực non, khỏe mạnh, 42 - 50 ngày tuổi, trọng lượng 60 - 80 g.
Test cương dương	Thỏ chủng <i>Newzealand White</i> (do Học viện Quân y cung cấp).	Giống đực trưởng thành, khỏe mạnh, trọng lượng 2,2 - 2,5 kg.
Tác dụng trên áp lực thể hang (ICP)	Chuột cống trắng chủng <i>Wistar</i> (do Học viện Quân y cung cấp).	Giống đực trưởng thành, khỏe mạnh, 10 - 12 tuần tuổi, trọng lượng 200 - 220 g.

Động vật thí nghiệm được nuôi 7 ngày trước khi tiến hành nghiên cứu để thích nghi với môi trường và điều kiện chăn nuôi của phòng thí nghiệm.

Trước và trong suốt quá trình nghiên cứu, động vật thí nghiệm được nuôi bằng thức ăn chuẩn do Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp, uống nước tự do.

2.3. Hóa chất, thuốc, máy móc và thiết bị phục vụ nghiên cứu

2.3.1. Hoá chất và thuốc

- Thuốc tiêm Tesmon (testosteron propionat) 25mg/ml, của hãng Tai Yu Chemical & Pharmaceutical Co., Ltd, Đài Loan.
- Thuốc tiêm estrogen do công ty Hanvec sản xuất.
- Thuốc tiêm progesteron 25 mg/ml, của hãng Rotexmedica, Đức.
- Viên nén Viagra (sildenafil) 50mg của hãng Pfizer, Úc.
- Bột pha tiêm thiopental 1 g của hãng Rotexmedica, Đức
- Nước cất pha tiêm của Công ty Cổ phần Dược Vật tư y tế Hải Dương sản xuất.
- Thuốc tiêm Feldene (piroxicam) 20mg/ml của hãng Pfizer, Pháp.
- Thuốc tiêm Vinphacine (amikacin) 500 mg/2ml của công ty Dược phẩm Vinphaco.
- Chỉ tự tiêu Surgical chromic catgut của hãng Suremed, Trung Quốc.
- Viên nén Depakin (thành phần natri valproat) hàm lượng 200mg của hãng Sanofi Synthelabo, Pháp..
- Xylazin, dung dịch thuốc tiêm 20 mg/ml
- Ketamin, dung dịch tiêm 10 mg/ml
- Cồn 70 độ, betadin
- Heparin, dung dịch tiêm 5000 UI/ml
- Kit định lượng các enzym và chất chuyển hoá trong máu : ALT (alanin aminotransferase), AST (aspartat aminotransferase), albumin, cholesterol toàn

phân và creatinin của hãng Hospitex Diagnostics (Italy) và hãng DIALAB GmbH (Áo).

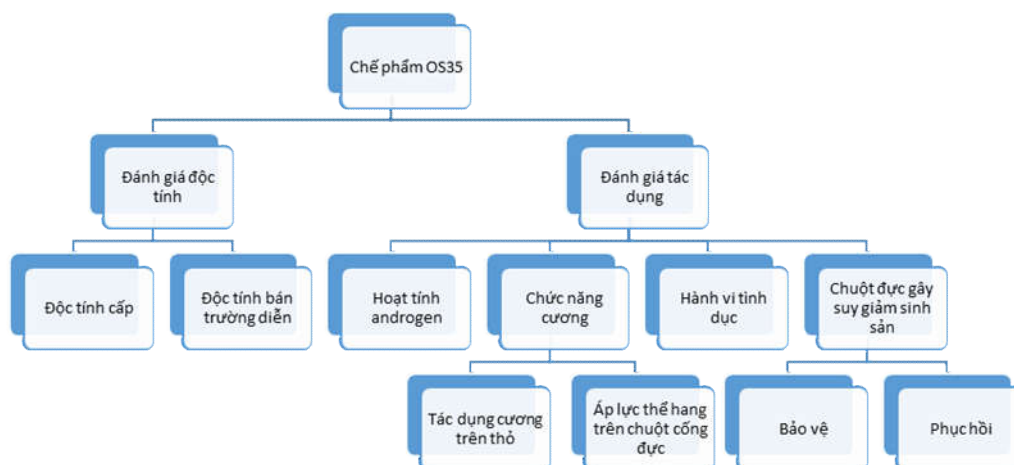
- Dung dịch xét nghiệm máu ABX Minidil LMG của hãng ABX – Diagnostics

2.3.2. Máy móc, thiết bị phục vụ nghiên cứu

- Kim chuyên dụng cho chuột cống/ chuột nhắt uống thuốc
- Webcam, máy tính kết nối với webcam, phần mềm ghi hình
- Đồng hồ bấm giờ
- Cân phân tích CP224S chính xác đến 0,1mg của hãng Sartorius, Đức.
- Máy Screen master của hãng Hospitex Diagnostics (Italy).
- Máy Vet abc™ Animal Blood Counter của hãng Ugo- Basile (Italy).
- Máy phân tích tinh trùng tự động CASA của hãng Hamilton Ivos.
- Dụng cụ và vật liệu dùng cho phẫu thuật: kính hiển vi phẫu thuật, kính lúp, dao mổ, kéo, panh, kim chỉ, bông, băng, gạc, bơm tiêm...
- Hệ thống thu thập số liệu:
 - + Hệ thống Powerlab (AD Instrument, Úc), phần mềm Lab Chart Pro.
 - + Đầu đo áp lực MLT 844 và các dây nối phụ kiện khác.
 - + Đầu đo huyết áp động mạch
- Bộ điện cực kích thích dây thần kinh hang gồm:
 - + Điện cực: hai điện cực bằng kim loại, đặt trong ống nhựa.
 - + Khung cố định điện cực có thể điều chỉnh các hướng khác nhau.
- Phần mềm tính kích thước Image J.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Sơ đồ nghiên cứu được tóm tắt trong hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

2.4.1. Xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của OS35 trên động vật thực nghiệm

2.4.1.1. Xác định độc tính cấp của OS35 theo đường uống trên chuột nhắt trắng

Theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon [103],[104].

Chuột nhắt trắng, cả 2 giống trọng lượng $20 \pm 2g$ được chia thành từng lô, mỗi lô 10 con. Cho từng lô chuột uống thuốc thử OS35 với liều từ liều cao nhất không gây chết tới liều thấp nhất gây chết 100% chuột với thể tích uống là 0,2 ml/10 g thể trọng chuột. Chuột được nhịn ăn 12 giờ trước khi uống thuốc, vẫn uống nước đầy đủ. Theo dõi số chuột chết trong 72 giờ đầu và tình trạng chung của chuột trong 7 ngày sau khi uống thuốc (ăn uống, hoạt động, đi lại, bài tiết...). Nếu chuột chết, mổ chuột để đánh giá đại thể các tổn thương của các cơ quan.

Xác định liều chết 50% (LD₅₀) theo tỷ lệ chuột chết trong vòng 72 giờ đầu.

2.4.1.2. Xác định độc tính bán trường diễn của OS35 theo đường uống trên chuột cống trắng

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng theo đường uống theo hướng dẫn của WHO [105].

Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên làm 3 lô, mỗi lô 10 con như sau:

- Lô chứng: uống dung môi pha thuốc 10 ml/kg thể trọng/ngày
- Lô trị 1: uống chế phẩm OS35 liều 150 mg/kg thể trọng/ngày với thể tích 10 ml/kg thể trọng/ngày.
- Lô trị 2: uống chế phẩm OS35 liều 450 mg/kg thể trọng/ngày (gấp 3 lần lô trị 1) với thể tích 10 ml/kg thể trọng/ngày.

Chuột cống trắng được uống dung môi hoặc thuốc thử trong 4 tuần liên, mỗi ngày một lần vào buổi sáng.

Các chỉ tiêu theo dõi vào các thời điểm trước khi uống thuốc (N0), sau khi uống thuốc 2 tuần (N14) và 4 tuần (N28), bao gồm:

- Tình trạng chung, thể trọng của chuột.
- Các chỉ số đánh giá chức phận tạo máu: số lượng hồng cầu, thể tích trung bình hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu.
- Đánh giá chức năng gan thông qua định lượng một số chất chuyển hoá trong máu: albumin và cholesterol toàn phần.
- Đánh giá mức độ hủy hoại tế bào gan thông qua định lượng hoạt độ enzym trong máu: ALT, AST.
- Đánh giá chức năng lọc cầu thận thông qua định lượng nồng độ creatinin trong máu.
- Mô bệnh học: Sau 4 tuần uống thuốc, chuột được mổ để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan. Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, thận của 30% số chuột ở mỗi lô.

2.4.2. Đánh giá hoạt tính androgen của OS35 trên chuột cống đực non thiến

Áp dụng mô hình Hershberger trên chuột cống đực non [87].

Chuột cống đực non 42 - 50 ngày tuổi, được nuôi ổn định 7 ngày trong môi trường phòng thí nghiệm, sau đó tiến hành thí nghiệm theo các bước sau:

- Thiến chuột, cắt bỏ 2 tinh hoàn 2 bên.

- Chuột được tiêm kháng sinh amikacin 100 mg/kg dự phòng và giảm đau sau mổ bằng piroxicam liều 3mg/kg.

- Cho chuột nghỉ ngơi 7 ngày. Sau đó, chia chuột ngẫu nhiên vào 5 lô, mỗi lô 10 con, như sau:

+ Lô 1: uống dung môi pha thuốc, với thể tích 10ml/kg/ngày

+ Lô 2: tiêm dưới da testosterone với liều 0,4 mg/kg/ngày

+ Lô 3: uống OS35 liều 50 mg/kg/ngày

+ Lô 4: uống OS35 liều 150 mg/kg/ngày

+ Lô 5: uống OS35 liều 250mg/kg/ngày

Chuột được cho dùng thuốc thử hoặc dung môi mỗi ngày 1 lần vào buổi sáng, trong vòng 10 ngày.

- Đến ngày thứ 11 (24 giờ sau khi uống liều thuốc cuối cùng), cân trọng lượng chuột, sau đó, giết chuột.

- Lấy máu, li tâm tách huyết thanh để làm xét nghiệm định lượng nồng độ testosterone.

- Bóc tách các cơ quan sinh dục phụ bao gồm: túi tinh, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn – hành hang, tuyến tiền liệt, đầu dương vật. Sau đó cân ngay trên cân phân tích, riêng túi tinh được ép nhẹ cho hết tinh dịch rồi cân.

- Các chỉ số nghiên cứu:

+ Trọng lượng chuột (g)

+ Trọng lượng cơ quan (mg)/100 g trọng lượng cơ thể chuột

+ Nồng độ testosterone trong máu (nmol/l)

- So sánh chỉ số nghiên cứu giữa các lô với nhau.

2.4.3. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chức năng cương dương

2.4.3.1. Đánh giá tác dụng của OS35 trên khả năng cương dương ở thỏ đực trưởng thành

Thí nghiệm được tiến hành như sau [80]:

- Thỏ đực được đặt trong phòng yên tĩnh, hạn chế tối đa mọi kích thích.
- Thỏ đực chia ngẫu nhiên thành 2 lô:
 - + Lô 1: uống sildenafil liều 4,5 mg/kg với thể tích 1 ml/kg
 - + Lô 2: uống OS35 liều 60mg/kg với thể tích 1 ml/kg
- Sau khi uống thuốc, bắt đầu quan sát thỏ để đánh giá các chỉ số nghiên cứu sau:

+ Chiều dài dương vật 5 phút 1 lần tại các thời điểm từ 0 phút (khi uống thuốc) cho đến khi dương vật hết cương. Nghiên cứu viên không trực tiếp đo chiều dài dương vật thỏ để tránh kích thích trực tiếp lên thỏ mà chụp ảnh, sau đó, sử dụng phần mềm Image J để đo chiều dài dương vật.

+ Thời gian dương vật trở lại bình thường.

2.4.3.2. Đánh giá ảnh hưởng của OS35 lên áp lực thể hang (ICP) trên chuột cống trắng đực trưởng thành

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Mehta [82], cụ thể như sau:

- Chuột cống trắng đực, trưởng thành được chia ngẫu nhiên thành 2 lô:
 - + Lô 1 (n = 8): uống sildenafil liều 10 mg/kg.
 - + Lô 2 (n = 7): uống OS35 liều 150 mg/kg.

Chuột đực cho uống thuốc thử 1 lần duy nhất (sau khi đã gây mê và đo được ICP trước khi dùng thuốc).

Các bước thực hiện như sau:

- Chuẩn bị:
 - + Chuột đực gây mê bằng dung dịch ketamin liều 25 mg/kg, cố định nằm ngửa trên bàn mổ, sát trùng.
 - + Kết nối hệ thống Powerlab, điện cực kích thích, đầu đo áp lực, phần mềm Labchart.
- Tiến hành

+ Bước 1: Bộc lộ động mạch cảnh và đặt catheter vào động mạch cảnh đo huyết áp động mạch.

+ Bước 2: Bộc lộ dây thần kinh hang.

+ Bước 3: Bộc lộ thể hang, đưa kim 26G vào thể hang, nối với một ống PE-50 chứa nước muối sinh lý pha heparin 100 IU/ml để đo ICP.

+ Bước 4: Đo áp lực thể hang, huyết áp động mạch trước khi kích thích dây thần kinh hang.

+ Bước 5: Kích thích điện dây thần kinh hang bằng một bộ phận kích thích theo nhịp nối với điện cực lưỡng cực. Đo áp lực thể hang, huyết áp động mạch sau khi kích thích dây thần kinh hang. Số lần kích thích là 1 lần trước khi uống thuốc và 3 lần sau khi uống thuốc (15 phút, 30 phút và 45 phút sau khi dùng thuốc), mỗi lần kích thích kéo dài 1 phút. Dòng điện kích thích dây thần kinh hang có cường độ 5V, tần số 20 Hz, độ rộng xung 2 ms.

+ Bước 6: Phân tích số liệu offline bằng phần mềm Labchart pro. Kết quả sau phân tích cho ra các thông số về áp lực thể hang, huyết áp động mạch (đơn vị mmHg).

- Các chỉ số nghiên cứu tại các thời điểm trước khi dùng thuốc, 15 phút, 30 phút và 45 phút sau khi dùng thuốc:

+ ICP trước khi kích thích dây thần kinh hang (ICP nền) (mmHg)

+ ICP cực đại sau kích thích dây thần kinh hang (ICP max) (mmHg)

+ Thời gian đáp ứng với kích thích (ms)

+ Huyết áp động mạch trung bình (MAP)

+ Tỷ số ICP cực đại/huyết áp động mạch trung bình (ICP max/MAP)

- Các chỉ số nghiên cứu được so sánh giữa các lô và so sánh sau khi uống thuốc và trước khi uống thuốc.

2.4.4. Đánh giá tác dụng của OS35 trên hành vi tình dục trên chuột cống trắng đực trưởng thành

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Agmo (1997) [77], cụ thể như sau:

2.4.4.1. Giai đoạn thích nghi với chu kỳ sáng - tối đảo ngược

- Chuột cống trưởng thành được nhốt riêng đực - cái, 4 - 5 con/chuồng.
- Chuột được nuôi ổn định trong chu kỳ sáng - tối đảo ngược bằng cách bật đèn sáng vào ban đêm (từ 20h00 đến 8h00) và tắt đèn vào ban ngày (từ 8h00 đến 20h00) trong 3 tuần trước khi tiến hành nghiên cứu.

2.4.4.2. Giai đoạn chuẩn bị chuột cái

Chuột cái được gây động dục nhân tạo bằng phương pháp sau:

- Chuột cái được mổ cắt buồng trứng với quy trình cụ thể như sau:
 - + Gây mê chuột cái bằng cách tiêm màng bụng thiopental natri với liều 40mg/kg và xylazin với liều 40mg/kg.
 - + Sau khi chuột đã mê, đặt chuột nằm sấp, dùng kéo cắt lớp da, lớp mỡ rồi đến lớp cơ lưng; dùng panh kéo lớp mỡ chứa buồng trứng ra ngoài, thắt buồng trứng bằng chỉ tự tiêu rồi cắt bỏ buồng trứng ở trên chỗ thắt.
 - + Khâu lần lượt lớp cơ, lớp mỡ rồi đến lớp da của chuột. Sát trùng vết mổ bằng povidon iod.
- Chuột được dự phòng nhiễm khuẩn bằng cách tiêm màng bụng kháng sinh amikacin liều 100mg/kg và giảm đau bằng cách tiêm màng bụng piroxicam 3mg/kg.
 - Sau khi mổ, chuột được chăm sóc hậu phẫu và nghỉ ngơi 14 ngày.
 - Trước khi tiến hành ghép đôi với chuột đực, chuột cái được gây động dục bằng cách tiêm hormon như sau: 52 giờ trước khi ghép đôi, tiêm dưới da estradiol benzoat 20 microgam/chuột. Sau đó 4 giờ (trước khi ghép đôi 48 giờ) tiêm dưới da progesteron 1000 microgam/chuột.

- Khi cho giao phối với chuột đực, những con cái không có hành vi chịu đực (như uốn cong lưng khi bị kích thích) sẽ bị loại.

2.4.4.3. Giai đoạn huấn luyện (3 đợt)

- Nhốt mỗi chuột đực vào 1 chuồng riêng
- 5 phút sau, đưa 1 chuột cái gây động dục nhân tạo vào.
- Nếu chuột cái không có hành vi chịu đực thì thay chuột cái khác.
- Đánh giá các hành vi của chuột đực bao gồm: nhảy cái (mounting), thâm nhập âm đạo (intromission), xuất tinh (ejaculation).

- Nếu chuột đực không thâm nhập âm đạo trong vòng 30 phút thì dừng test và coi như chuột đực đó không có khả năng hoạt động tình dục.

- Các hành vi tình dục của chuột đực xác định như sau:

- + *Hành vi nhảy*: thường được thực hiện vào thời điểm đầu của loạt giao cấu. Khi chuột đực bắt đầu gặp chuột cái, chuột đực sẽ tiếp cận với chuột cái từ phía sau, trèo lên lưng chuột cái và đẩy nhanh, nâng khung chậu về phía chuột cái với tần số 19 - 23 Hz trong vòng 30ms, sau đó con đực rời khỏi lưng con cái và liếm cơ quan sinh dục [77],[78],[107]. Như vậy, dấu hiệu để nhận biết hành vi nhảy là diễn ra sớm và hoạt động đẩy khung chậu của chuột đực về phía âm đạo chuột cái diễn ra nhẹ, nông, ngắn.

- + *Hành vi thâm nhập âm đạo*: trong quá trình tiếp cận, nếu con đực tìm thấy âm đạo của chuột cái, nó sẽ bất ngờ đẩy khung chậu sâu hơn và đút dương vật vào âm đạo trong vòng 200 - 300ms. Sau đó, con đực ngừng đẩy khung chậu, rút nhanh, mạnh ra khỏi con cái và luôn luôn liếm dương vật, con đực sẽ không bao giờ tiếp cận trở lại ngay sau khi thâm nhập [77],[78],[107]. Như vậy, dấu hiệu để nhận biết hành vi thâm nhập âm đạo là hoạt động đẩy khung chậu của chuột đực về phía âm đạo chuột cái diễn ra mạnh hơn, sâu hơn và kéo dài hơn hành vi nhảy.

- + *Hành vi xuất tinh*: sau vài lần thâm nhập vào âm đạo, con đực sẽ xuất

tinh. Xuất tinh được đặc trưng bởi sự đẩy khung chậu sâu và dài hơn (750 - 2000 ms) và rời khỏi con cái chậm hơn, sau khi xuất tinh, con đực vẫn còn ở trên lưng con cái trong vòng 1 - 3 s [77],[78],[107]. Như vậy, hành vi xuất tinh dễ dàng được nhận biết bởi thời gian diễn ra chậm và kéo dài hơn, sau khi xuất tinh, con đực vẫn còn ở trên lưng con cái 1 - 3s mới chịu rời xuống.

- Chuột đực và chuột cái được làm quen (huấn luyện) với test hành vi tình dục trong 3 đợt ghép, mỗi đợt cách nhau 4 ngày.

Mục đích của các đợt làm quen này nhằm khởi động phản xạ giao cấu, phát huy tối đa vai trò của hệ thần kinh và nội tiết đối với hành vi tình dục của chuột, đồng thời giúp các nghiên cứu viên làm quen với việc quan sát hành vi tình dục ở chuột.

Trong quá trình ghép đôi đực - cái, quan sát và đánh giá các chỉ số sau [77],[78],[107]:

- **MF** (số lần nhảy - Mounting Frequency): là số lần con đực nhảy lên lưng con cái trong một loạt giao cấu.

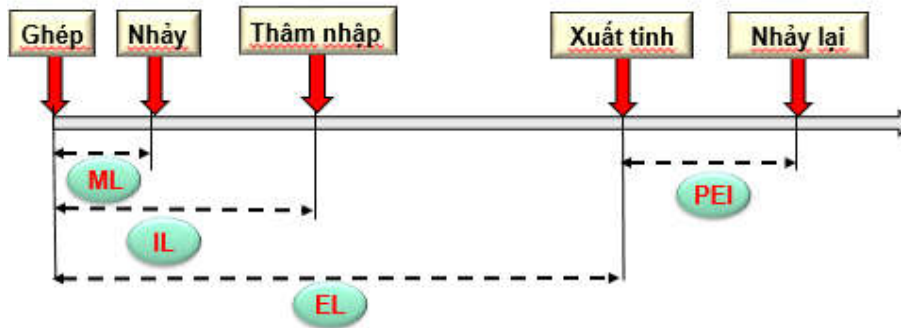
- **ML** (thời gian nhảy - Mounting Latency): là khoảng thời gian từ khi con đực gặp con cái đến lần nhảy đầu tiên;

- **IF** (số lần thâm nhập âm đạo- Intromission Frequency): là số lần dương vật con đực thâm nhập vào âm đạo con cái trong một loạt giao cấu;

- **IL** (thời gian đạt đến thâm nhập- Intromission Latency): là khoảng thời gian từ khi con đực gặp con cái đến lần thâm nhập âm đạo đầu tiên;

- **EL** (thời gian đạt đến xuất tinh- Ejaculation Latency): là khoảng thời gian từ lần nhảy đầu tiên (hoặc thâm nhập âm đạo đầu tiên- nếu không có nhảy) đến lần xuất tinh đầu tiên;

- **PEI** (thời gian sau xuất tinh- Post Ejaculation Interval): là khoảng thời gian từ sau khi xuất tinh lần đầu đến lần nhảy hoặc thâm nhập âm đạo tiếp theo (nếu không có nhảy) để bắt đầu một loạt giao cấu mới.



Hình 2.2. Các chỉ số đánh giá hành vi tình dục ở chuột cống đực

Thử nghiệm kết thúc khi ghi được PEI, hoặc khi ML, IL > 15 phút; EL > 30 phút; PEI > 15 phút. Những chuột xác định được chỉ số PEI được xem là đã hoàn thành test hành vi.

Để đảm bảo hoạt động giao cấu của chuột diễn ra một cách tự nhiên và không bị ảnh hưởng bởi người quan sát, quá trình quan sát được ghi lại bằng webcam nối với máy tính, sau đó sẽ được nghiên cứu viên đọc và xử lý kết quả, tính ra các chỉ số nghiên cứu.

2.4.4.4. Giai đoạn sàng lọc (4 đợt)

- Chuột được huấn luyện qua 3 đợt, sau đó tiến hành 4 test sàng lọc để phân loại chuột đực.

- Sau 4 test sàng lọc, cho điểm chuột đực và phân loại thành những chuột đạt và không đạt.

- Những chuột không hoàn thành ít nhất 1 test sàng lọc được xếp vào nhóm chuột không đạt.

2.4.4.5. Giai đoạn đánh giá tác dụng của thuốc thử

- Nhóm chuột không đạt được chia đều ngẫu nhiên như sau:

- + Lô 1 (n = 9): uống dung môi pha thuốc với thể tích 10ml/kg

- + Lô 2 (n = 7): uống sildenafil liều 10 mg/kg 30 phút trước khi ghép

với chuột cái

+ Lô 3 (n = 8): uống OS35 liều 150mg/kg/ngày 15 phút trước khi ghép với chuột cái

- Chuột đực được ghép đôi với chuột cái sau khi uống thuốc thử hoặc dung môi.

Quan sát hành vi tình dục, ghi lại các chỉ số nghiên cứu và so sánh các lô với nhau.

2.4.5. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chuột cống trắng đực bị gây suy giảm sinh sản bởi natri valproat

Natri valproat là một thuốc chống động kinh được sử dụng rộng rãi. Trên cơ quan sinh sản, natri valproat đã được chứng minh làm giảm nồng độ FSH, LH và testosterone máu trên chuột thực nghiệm [108],[109]. Các nghiên cứu về độc tính sinh sản của natri valproat cũng cho thấy natri valproat làm giảm các chỉ số sinh sản như làm giảm số lượng tinh trùng ở đuôi mào tinh, giảm độ di động của tinh trùng, thay đổi hình thái và cấu trúc của tinh trùng cũng như tinh hoàn [108],[109].

Chính vì thế, trong nghiên cứu này natri valproat được sử dụng như một tác nhân gây suy giảm sinh sản cho chuột đực trên thực nghiệm, trên cơ sở đó đánh giá tác dụng của OS35.

2.4.5.1. Đánh giá tác dụng bảo vệ của OS35 trên chuột cống trắng đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Chuột cống đực trưởng thành, được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, được cho uống thuốc 2 lần/ngày như sau:

- Lô 1: Lần 1 uống natri clorid 0,9% 10ml/kg/ngày; lần 2 uống dung môi pha thuốc CMC 0,5%.

- Lô 2: Lần 1 uống natri valproat 500 mg/kg/ngày; lần 2 uống dung môi pha thuốc CMC 0,5%.

- Lô 3: Lần 1 uống natri valproat 500 mg/kg/ngày; lần 2 uống OS35 150mg/kg/ngày được pha trong dung môi CMC 0,5%.

Chuột được cho uống như trên liên tục trong 7 tuần, khoảng cách giữa 2 lần uống trong ngày cách nhau ít nhất 2 giờ. Sau 5 tuần, tiến hành ghép chuột, 1 chuột đực được ghép ngẫu nhiên cùng một chuồng với 2 chuột cái trong 2 tuần. Sau 7 tuần nghiên cứu, đánh giá các chuột như sau:

- Với chuột đực, tiến hành mổ và đánh giá các chỉ số:

+ Trọng lượng các cơ quan sinh dục (tinh hoàn, túi tinh, tuyến Cowper, đầu dương vật, tuyến tiền liệt, cơ nâng hậu môn – hành hang).

+ Mật độ tinh trùng và tỷ lệ tinh trùng sống.

+ Mức độ di động của tinh trùng (tỉ lệ tinh trùng có tiến tới, tỉ lệ tinh trùng tiến tới nhanh, tỉ lệ tinh trùng không tiến tới, tỉ lệ tinh trùng không di động).

+ Làm tiêu bản hình thái mô học của tinh hoàn với kỹ thuật nhuộm Hematoxyline-Eosin (HE); đánh giá hình thái mô học của tinh hoàn.

+ Làm tiêu bản hình thái của tinh trùng với kỹ thuật nhuộm papanicolaou; đánh giá hình thái tinh trùng.

+ Lấy máu, li tâm tách huyết thanh để làm xét nghiệm định lượng nồng độ testosterone.

- Với chuột cái: ngày thứ 14 đến 17 sau khi thụ thai, giết chuột để đánh giá các chỉ số:

+ Tỉ lệ chuột cái có chửa (%).

+ Số hoàng thể trung bình/1 chuột mẹ.

+ Số thai đậu trung bình/1 chuột mẹ.

+ Số thai phát triển bình thường/1 chuột mẹ.

+ Tỉ lệ thai chết sớm (%).

+ Tỉ lệ thai chết muộn (%).

+ Tỉ lệ mất trứng (số mất trứng bằng số hoàng thể trừ đi số thai đậu) (%).

Các chỉ số nghiên cứu được so sánh giữa các lô với nhau.

2.4.5.2. Đánh giá tác dụng phục hồi của OS35 trên chuột cống trắng đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Chuột cống đực trưởng thành, được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, được cho uống thuốc như sau:

+ Lô 1: Uống natri clorid 0,9% 10ml/kg/ngày trong 7 tuần đầu, sau đó uống CMC 0,5% 10ml/kg/ngày trong 10 ngày tiếp theo.

+ Lô 2: Uống natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần đầu, sau đó uống CMC 0,5% 10ml/kg/ngày trong 10 ngày tiếp theo.

+ Lô 3: Uống natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần đầu và OS35 150mg/kg/ngày trong 10 ngày tiếp theo.

Sau 7 tuần uống natri valproat hoặc natri clorid, chuột đực cho uống thuốc thử hoặc dung môi pha thuốc với thể tích 1ml/100g cân nặng trong 10 ngày. Sau 10 ngày uống thuốc thử hoặc dung môi pha thuốc, tiến hành ghép chuột, 1 chuột đực được ghép ngẫu nhiên cùng một chuồng với 2 chuột cái trong 2 tuần. Sau 2 tuần ghép, đánh giá các chuột như sau:

- Với chuột đực, tiến hành mổ và đánh giá các chỉ số:

+ Trọng lượng các cơ quan sinh dục (tinh hoàn, túi tinh, tuyến Cowper, đầu dương vật, tuyến tiền liệt, cơ nâng hậu môn – hành hang).

+ Mật độ tinh trùng và tỷ lệ tinh trùng sống.

+ Mức độ di động của tinh trùng (tỉ lệ tinh trùng có tiến tới, tỉ lệ tinh trùng tiến tới nhanh, tỉ lệ tinh trùng không tiến tới, tỉ lệ tinh trùng không di động).

+ Làm tiêu bản hình thái mô học của tinh hoàn với kỹ thuật nhuộm Hematoxyline-Eosin (HE); đánh giá hình thái mô học của tinh hoàn, đo kích thước ống sinh tinh.

+ Làm tiêu bản hình thái của tinh trùng với kỹ thuật nhuộm papanicolaou; đánh giá hình thái tinh trùng.

+ Lấy máu, li tâm tách huyết thanh để làm xét nghiệm định lượng nồng độ testosterone máu.

- Với chuột cái: ngày thứ 14 đến 17 sau khi thụ thai, giết chuột để đánh giá các chỉ số:

- + Tỷ lệ chuột cái có chửa (%).
- + Số hoàng thể trung bình/1 chuột mẹ.
- + Số thai đậu trung bình/1 chuột mẹ.
- + Số thai phát triển bình thường/1 chuột mẹ.
- + Tỷ lệ thai chết sớm (%).
- + Tỷ lệ thai chết muộn (%).
- + Tỷ lệ mất trứng (số mất trứng bằng số hoàng thể trừ số thai đậu) (%).

Các chỉ số nghiên cứu được so sánh giữa các lô với nhau.

2.5. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại các địa điểm sau đây:

- Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội.
- Bộ môn Y sinh học - Di truyền, Trường Đại học Y Hà Nội.
- Bộ môn Mô phôi học, Trường Đại học Y Hà Nội (do PGS.TS. Nguyễn Thị Bình đọc).
- Bộ môn Giải phẫu bệnh, Trường Đại học Y Hà Nội (do PGS.TS. Lê Trung Thọ đọc).
- Bộ môn Dược lực, Trường Đại học Dược Hà Nội .
- Bộ môn Sinh lý học, Học viện Quân Y.
- Khoa xét nghiệm, Bệnh viện Phụ sản Trung ương.

2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được biểu diễn dưới dạng: $\bar{X} \pm SD$ hoặc %. Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Stata 3.0, sử dụng sign test ghép cặp, Mann-Withney test, Proportional test. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của OS35 trên động vật thực nghiệm

3.1.1. Xác định độc tính cấp của OS35 theo đường uống trên chuột nhắt trắng

Ở những lô chuột uống chế phẩm OS35 liều từ 1,25 g/kg thể trọng chuột trở lên, sau khi uống, chuột ở tình trạng chậm chạp, ức chế, nằm im, không ăn uống gì. Sau 30 phút, chuột chuyển sang trạng thái khó thở, vã bọt mép rồi dẫn đến suy hô hấp, tím vùng đầu và cổ, đồng thời, chuột có hiện tượng co giật rồi chết. Liều không gây chết chuột là 0,625 g/kg. Liều gây chết 100% chuột là 15 g/kg. Các chuột chết được mổ để quan sát đại thể có hiện tượng tim, phổi, gan của chuột sung huyết. Các cơ quan khác chưa quan sát thấy gì bất thường. Ở các lô có chuột chết, các chuột chết trong vòng 24 giờ kể từ khi được cho uống thuốc thử. Tỷ lệ chuột chết được ghi lại ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Tỷ lệ chuột chết ở các lô chuột uống chế phẩm OS35

STT	Liều uống chế phẩm OS35 (g/kg)	Số chuột chết	% chuột chết
1	0,625	0/10	0
2	1,25	1/10	10
3	2,5	3/10	30
4	5,0	5/10	50
5	7,5	7/10	70
6	11,25	8/10	80
7	15,0	10/10	100

Từ bảng kết quả trên tính toán được LD₅₀ của chế phẩm OS35.

$$LD_{50} = 4,5 (2,8 - 7,1) \text{ g/kg với } p = 0,05.$$

3.1.2. Xác định độc tính bán trường diễn của OS35 theo đường uống trên chuột cống trắng

3.1.2.1. Tình trạng chung và cân nặng của chuột cống trắng

Trong thời gian thí nghiệm, chuột ở cả 3 lô hoạt động bình thường, ăn uống tốt, nhanh nhẹn, lông mượt. Không thấy biểu hiện gì bất thường ở cả 3 lô chuột trong suốt thời gian nghiên cứu.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của OS35 đến cân nặng của chuột cống trắng

Thời gian	Cân nặng (g)			p (t- test Student)
	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	
Trước uống thuốc	196,25 ± 10,09	194,54 ± 8,21	197,69 ± 7,94	> 0,05
Sau 2 tuần	242,50 ± 9,73	230,00 ± 8,94	216,92 ± 11,56	> 0,05
p (trước sau)	<u>≤ 0,05</u>	<u>≤ 0,05</u>	<u>≤ 0,05</u>	
Sau 4 tuần	251,25 ± 10,58	237,27 ± 11,55	220,77 ± 10,34	> 0,05
p (trước – sau)	<u>≤ 0,05</u>	<u>≤ 0,05</u>	<u>≤ 0,05</u>	

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy: sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc, cân nặng của chuột cống ở cả 3 lô đều tăng so với trước khi nghiên cứu ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt về cân nặng chuột cống giữa các lô dùng thuốc thử và lô chứng ($p > 0,05$).

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của OS35 đến hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu trên chuột cống trắng

Thời gian	Hematocrit (%)			Thể tích trung bình hồng cầu (fl)			p (t- test Student)
	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	
Trước uống thuốc	38,89 ± 2,16	34,31 ± 2,29	33,28 ± 1,80	50,71 ± 0,57	51,44 ± 1,13	51,61 ± 0,86	> 0,05
Sau 2 tuần	38,66 ± 1,64	35,37 ± 3,43	29,79 ± 2,53	49,46 ± 0,75	49,35 ± 1,28	50,64 ± 0,62	> 0,05
p (tr-ước sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 4 tuần	34,01 ± 2,60	34,83 ± 2,53	36,59 ± 1,70	47,94 ± 0,46	48,36 ± 0,60	49,94 ± 0,40	> 0,05
p (tr-ước sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Kết quả ở các bảng 3.3 và 3.4 cho thấy sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc liên tục, số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu ở chuột cống trắng ở cả lô trị 1 và lô trị 2 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so với trước khi uống thuốc ($p > 0,05$).

Kết quả ở các bảng 3.5 và 3.6 cho thấy sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc liên tục, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu và công thức bạch cầu trên chuột cống trắng ở cả lô trị 1 và lô trị 2 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so với trước khi uống thuốc ($p > 0,05$).

3.1.2.3. Ảnh hưởng của OS35 trên chức năng gan trên chuột cống trắng

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của OS35 đến nồng độ albumin và cholesterol trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Albumin (g/l)			Cholesterol (mmol/l)			P (t- test Student)
	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	
Trước uống thuốc	34,92 ± 1,71	34,73 ± 2,70	34,26 ± 1,59	1,99 ± 0,16	1,81 ± 0,16	1,69 ± 0,15	> 0,05
Sau 2 tuần	33,79 ± 2,72	35,57 ± 2,75	32,06 ± 1,28	1,97 ± 0,18	1,55 ± 0,22	1,60 ± 0,30	> 0,05
p (trước sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 4 tuần	35,88 ± 1,34	33,94 ± 1,32	35,39 ± 1,33	1,81 ± 0,25	1,91 ± 0,26	1,51 ± 0,14	> 0,05
p (trước sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Kết quả ở các bảng 3.7 cho thấy: sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc liên tục, nồng độ albumin và cholesterol trong máu chuột cống trắng ở cả lô trị 1 và lô trị 2 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so với thời điểm trước khi uống thuốc ($p > 0,05$).

3.1.2.4. Ảnh hưởng của OS35 trên mức độ hủy hoại tế bào gan trên chuột cống trắng

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của OS35 đến hoạt độ AST và ALT trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Hoạt độ AST (UI/l)			Hoạt độ ALT (UI/l)			p (t- test Student)
	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	
Trước uống thuốc	63,75 ± 3,86	70,29 ± 10,4	67,78 ± 4,63	168,00 ± 16,71	153,86 ± 22,66	178,89 ± 18,27	> 0,05
Sau 2 tuần	72,13 ± 7,13	72,67 ± 5,07	61,00 ± 5,37	171,00 ± 13,41	144,83 ± 8,06	173,56 ± 6,14	> 0,05
p (trước sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 4 tuần	79,86 ± 15,49	62,14 ± 8,27	55,78 ± 7,04	180,43 ± 29,21	202,00 ± 27,12	187,00 ± 17,89	> 0,05
p (trước sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Kết quả ở các bảng 3.8 cho thấy: sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc liên tục, hoạt độ AST, ALT trong máu chuột cống trắng ở cả lô trị 1 và lô trị 2 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so với thời điểm trước khi uống thuốc ($p > 0,05$).

3.1.2.5. Ảnh hưởng của OS35 trên chức năng lọc của cầu thận trên chuột cống trắng

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của OS35 đến nồng độ creatinin trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Creatinin (micromol/l)			p (t- test Student)
	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	
Trước uống thuốc	42,50 ± 2,69	44,87 ± 7,40	39,73 ± 2,56	> 0,05
Sau 2 tuần	52,25 ± 2,61	49,33 ± 5,65	53,78 ± 5,67	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 4 tuần	43,25 ± 2,61	41,90 ± 5,07	37,78 ± 1,63	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Kết quả ở bảng 3.9 cho thấy: sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc liên tục, ở cả lô trị 1 và lô trị 2, nồng độ creatinin trong máu chuột cống trắng không có sự khác biệt so với lô chứng và so với trước khi uống thuốc ($p > 0,05$).

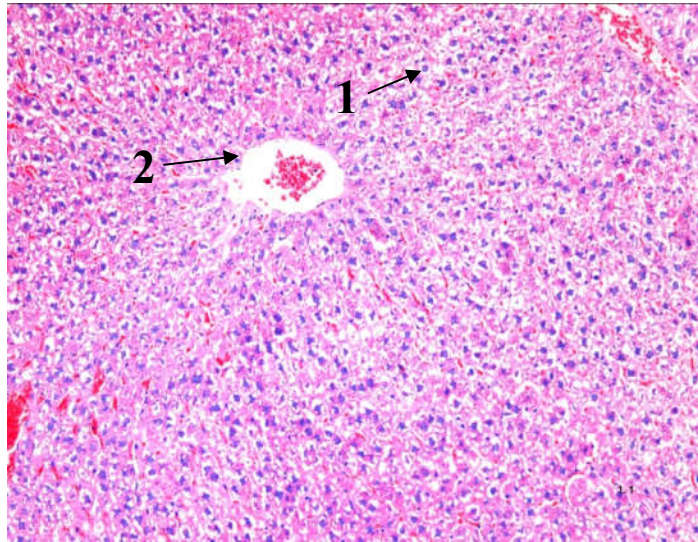
3.1.2.6. Ảnh hưởng của OS35 trên giải phẫu bệnh gan, thận trên chuột cống trắng

* Đại thể

Trên tất cả các chuột thực nghiệm (cả lô chứng và 2 lô trị), không quan sát thấy có thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan tim, phổi, gan, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá của chuột.

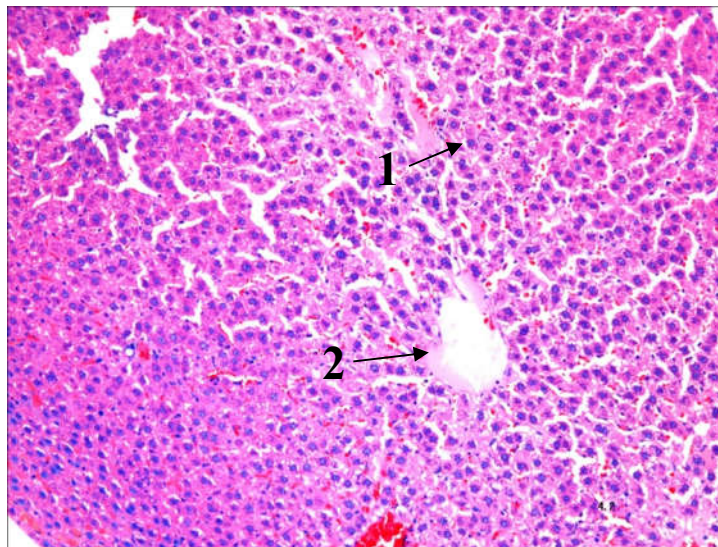
* Vi thể

- Trên cấu trúc vi thể gan: Ở lô chứng và 2 lô trị dùng OS35 liều 150 mg/kg/ngày và 450 mg/kg/ngày, cấu trúc gan không bị đảo lộn. Tất cả vùng tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy gan và vùng khoảng cửa không xơ hóa, không xâm nhập viêm, không tăng sinh ống mật. Không có sự khác biệt về cấu trúc vi thể gan giữa 2 lô dùng thuốc thử OS35 với lô chứng.



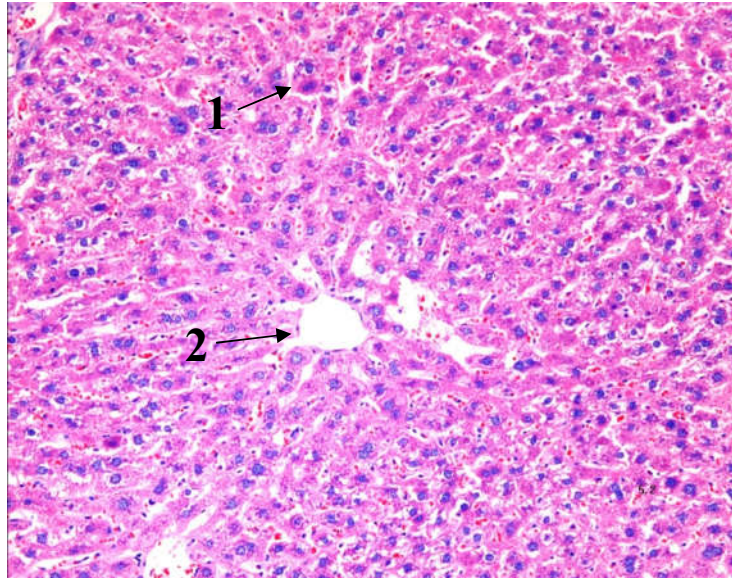
Hình 3.1. Hình ảnh vi thể gan chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc lô chứng sinh học (HE x 400)

1. Tế bào gan – 2. Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy



Hình 3.2. Hình ảnh vi thể gan chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc lô dùng OS35 150 mg/kg/ngày (HE x 400)

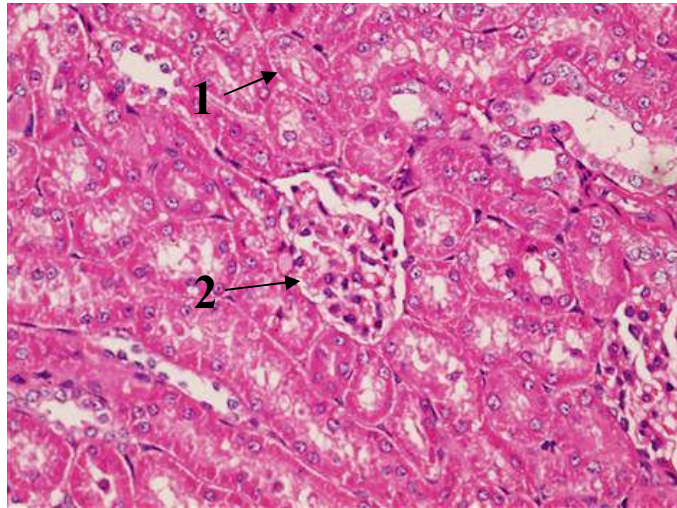
1. Tế bào gan – 2. Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy



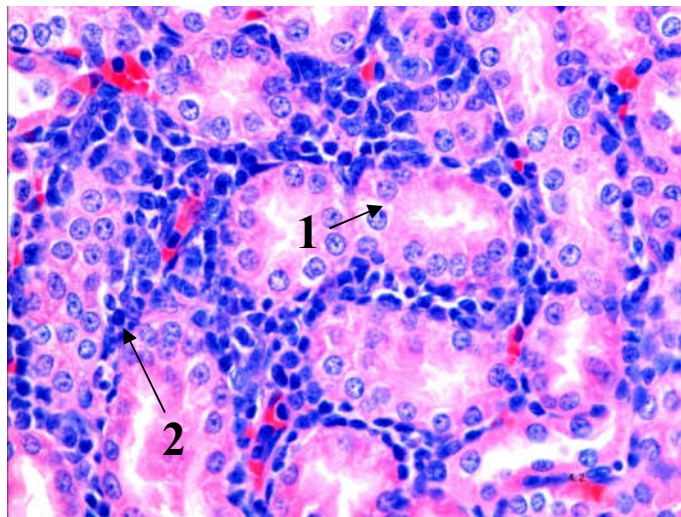
Hình 3.3. Hình ảnh vi thể gan chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc lô dùng OS35 450 mg/kg/ngày (HE x 400)

1. Tế bào gan – 2. Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy

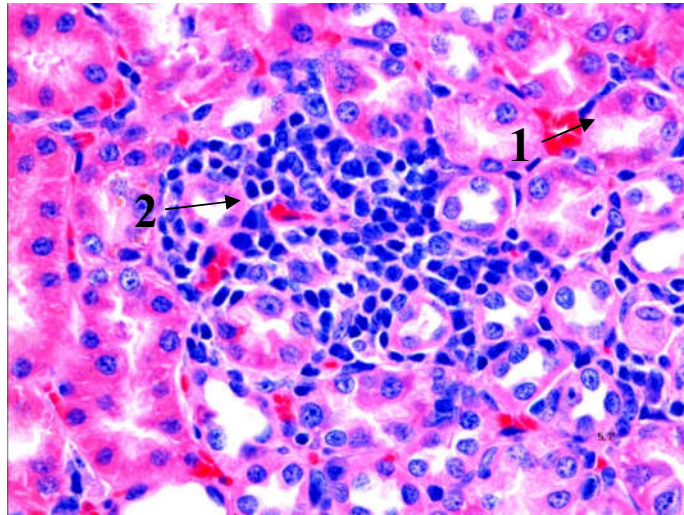
- Trên cấu trúc vi thể thận: Ở lô chứng và 2 lô trị dùng OS35, các cầu thận có hình thái, cấu trúc trong giới hạn bình thường, không xơ hóa, không tăng sinh tế bào. Ở chuột lô chứng, nhu mô thận không viêm, không hoại tử, mô đệm bình thường, không có xâm nhập viêm. Ở chuột lô trị 1 (uống OS35 liều 150 mg/kg thể trọng), và lô trị 2 (uống OS35 liều 450 mg/kg thể trọng), trong mô đệm có các ổ xâm nhập viêm mạn tính (chủ yếu là lympho bào), tăng sinh xơ.



Hình 3.4. Hình ảnh vi thể thận chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc lô chứng sinh học (HE x 400)
1. Tế bào thận – 2. Tiểu cầu thận



Hình 3.5. Hình ảnh vi thể thận chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc lô dùng OS35 150 mg/kg/ngày (HE x 400)
1. Tế bào thận – 2. Tiểu cầu thận



Hình 3.6. Hình ảnh vi thể thận chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc lô dùng OS35 450 mg/kg/ngày (HE x 400)

1. Tế bào thận – 2. Tiểu cầu thận

Như vậy, kết quả xét nghiệm mô bệnh học gan, thận của chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc cho thấy:

- Cấu trúc vi thể gan của chuột cống trắng ở các lô uống chế phẩm OS35 sau 4 tuần uống thuốc không có sự khác biệt so với lô chứng.

- Cấu trúc vi thể thận của chuột cống trắng ở lô uống chế phẩm OS35 sau 4 tuần uống thuốc có các ổ viêm mạn tính trong mô đệm. Tuy nhiên, các cầu thận có hình thái, cấu trúc trong giới hạn bình thường và xét nghiệm creatinin đánh giá chức năng thận vẫn trong giới hạn bình thường.

3.2. Đánh giá hoạt tính androgen của OS35 trên chuột công đực non thiên

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của OS35 lên trọng lượng cơ thể chuột công đực non thiên

Lô	n	Trọng lượng cơ thể (g)		% tăng trọng lượng
		Trước	Sau	
Lô 1: dung môi	7	76,53 ± 3,16	126,84 ± 6,32	65,70 ± 4,80
Lô 2: Testosteron	8	75,92 ± 3,12	121,22 ± 4,44	60,06 ± 2,81
p ₂₋₁		> 0,05	> 0,05	> 0,05
Lô 3: OS35 50mg/kg	7	77,14 ± 3,88	126,84 ± 5,26	65,14 ± 4,25
p ₃₋₁		> 0,05	> 0,05	> 0,05
p ₃₋₂		> 0,05	> 0,05	> 0,05
Lô 4: OS35 150mg/kg	7	78,57 ± 5,20	125,41 ± 4,64	61,99 ± 7,00
p ₄₋₁		> 0,05	> 0,05	> 0,05
p ₄₋₂		> 0,05	> 0,05	> 0,05
Lô 5: OS35 250mg/kg	7	76,84 ± 4,93	119,39 ± 7,44	56,37 ± 7,43
p ₅₋₁		> 0,05	> 0,05	> 0,05
p ₅₋₂		> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.10 cho thấy trọng lượng cơ thể của chuột cũng như tỉ lệ tăng trọng lượng cơ thể của chuột ở các lô nghiên cứu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của OS35 lên trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ chuột công đực non thiến

Lô	n	Trọng lượng cơ quan sinh dục (mg/100g thể trọng)				
		Túi tinh	Tuyến tiền liệt	Đầu dương vật	Tuyến Cowper	Cơ nâng hậu môn
Lô 1: dung môi	7	11,30 ± 1,18	7,00 ± 1,55	20,07 ± 1,29	1,97 ± 0,30	20,74 ± 2,77
Lô 2: Testosteron	8	290,11 ± 26,25	97,30 ± 8,96	41,74 ± 1,76	21,02 ± 2,20	205,70 ± 13,85
p ₂₋₁		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Lô 3: OS35 50mg/kg	7	11,01 ± 1,13	7,58 ± 1,43	21,28 ± 1,64	2,37 ± 0,26	29,51 ± 2,17
p ₃₋₁		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05
p ₃₋₂		< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,001	< 0,001
Lô 4: OS35 150mg/kg	7	11,14 ± 1,20	4,97 ± 0,72	28,10 ± 2,89	2,95 ± 0,73	34,16 ± 4,88
p ₄₋₁		> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05
p ₄₋₂		< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,001	< 0,001
Lô 5: OS35 250mg/kg	7	17,97 ± 2,35	6,44 ± 1,07	28,33 ± 1,73	2,83 ± 0,24	34,00 ± 2,80
p ₅₋₁		< 0,05	> 0,05	< 0,01	< 0,05	< 0,01
p ₅₋₂		< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,001	< 0,001

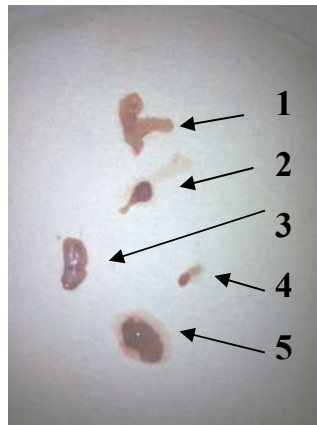
Kết quả ở bảng 3.11 cho thấy:

- Lô chuột công dùng testosteron, trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ tăng rõ rệt so với lô 1 ($p < 0,001$).

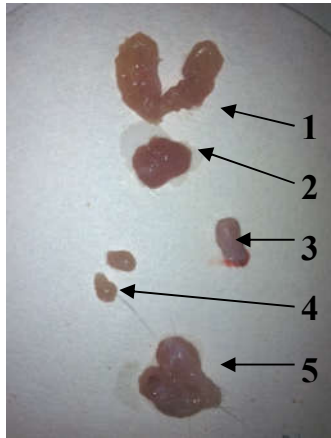
- Lô chuột uống OS35 liều 50 mg/kg/ngày chỉ có tác dụng làm tăng trọng lượng cơ nâng hậu môn – hành hang có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$), trọng lượng các cơ quan khác không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 1 ($p > 0,05$).

- Lô chuột uống OS35 liều 150 mg/kg/ngày có tác dụng làm tăng trọng lượng đầu dương vật và cơ nâng hậu môn – hành hang có ý nghĩa thống kê so với lô 1 ($p < 0,05$), trọng lượng các cơ quan khác không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 1 ($p > 0,05$).

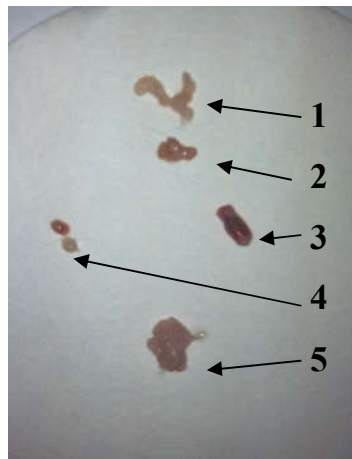
- Lô chuột uống OS35 liều 250 mg/kg/ngày có tác dụng làm tăng trọng lượng túi tinh, đầu dương vật và cơ nâng hậu môn – hành hang có ý nghĩa thống kê so với lô 1 ($p < 0,05$), trọng lượng các cơ quan khác không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 1 ($p > 0,05$).



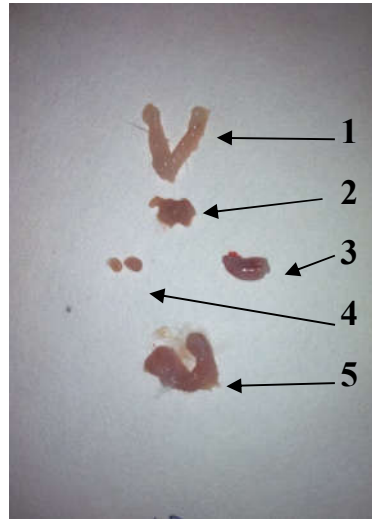
Hình 3.7. Hình ảnh các cơ quan sinh dục phụ chuột cống đực non thiếu lô uống dung môi



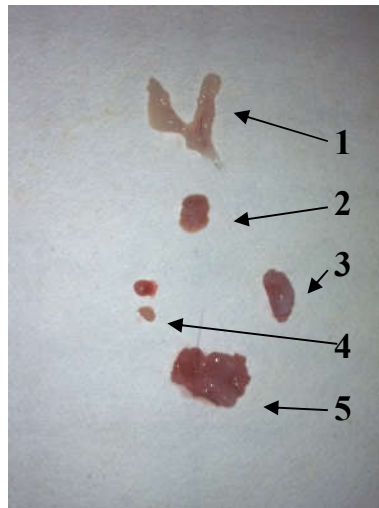
**Hình 3.8. Hình ảnh các cơ quan sinh dục phụ chuột cống đực non thiến
lô dùng testosterone**



**Hình 3.9. Hình ảnh các cơ quan sinh dục phụ chuột cống đực non thiến
lô uống OS35 50 mg/kg**



**Hình 3.10. Hình ảnh các cơ quan sinh dục phụ chuột cống đực non thiếu
lô uống OS35 150 mg/kg**



**Hình 3.11. Hình ảnh các cơ quan sinh dục phụ chuột cống đực non thiếu
lô uống OS35 250 mg/kg**

Ghi chú cho các hình 3.7 đến 3.11: 1. Túi tinh; 2. Tuyến tiền liệt;
3. Đầu dương vật; 4. Tuyến Cowper; 5. Cơ nâng hậu môn – hành hang

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của OS35 lên nồng độ testosterone trong máu chuột công đực non thuần

Lô	n	Nồng độ testosterone (nmol/l)
Lô 1: dung môi	7	0,14 ± 0,04
Lô 2: Testosteron	8	31,73 ± 7,91
p ₂₋₁		< 0,01
Lô 3: OS35 50mg/kg	7	0,17 ± 0,04
p ₃₋₁		> 0,05
p ₃₋₂		< 0,01
Lô 4: OS35 150mg/kg	7	0,62 ± 0,17
p ₄₋₁		< 0,05
p ₄₋₂		< 0,01
Lô 5: OS35 250mg/kg	7	3,69 ± 1,04
p ₅₋₁		< 0,05
p ₅₋₂		< 0,01

Kết quả ở bảng 3.12 cho thấy:

- Ở lô chuột dùng testosteron, nồng độ testosterone trong máu tăng cao rõ rệt so với lô 1 ($p < 0,01$).
- Ở lô chuột uống OS35 liều 50 mg/kg/ngày, nồng độ testosterone trong máu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 1 ($p > 0,05$).
- Ở lô chuột uống OS35 liều 150 mg/kg/ngày và liều 250 mg/kg/ngày, nồng độ testosterone trong máu tăng có ý nghĩa thống kê so với lô 1 ($p < 0,05$).

3.3. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chức năng cương dương

3.3.1. Đánh giá tác dụng của OS35 trên khả năng cương dương ở thỏ đực trưởng thành

Bảng 3.12. Cân nặng thỏ trong nghiên cứu chức năng cương dương

Lô	n	Cân nặng (kg)
Lô 1: Sildenafil	6	2,00 ± 0,06
Lô 2: OS35 60mg/kg	6	1,97 ± 0,04
p ₃₋₁		> 0,05

Kết quả ở bảng 3.13 cho thấy trọng lượng thỏ ở các lô thỏ nghiên cứu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của OS35 lên chiều dài dương vật của thỏ

Lô	n	Chiều dài dương vật (mm)					
		5 phút	10 phút	15 phút	20 phút	25 phút	30 phút
Lô 1: Sildenafil	6	8,92 ± 0,46	11,15 ± 0,83	14,00 ± 0,94	15,47 ± 1,46	14,62 ± 1,92	12,72 ± 1,13
Lô 2: OS35 60mg/kg	6	11,11 ± 2,23	13,17 ± 1,69	14,61 ± 0,93	14,82 ± 2,27	10,58 ± 1,17	9,25 ± 2,61
p ₃₋₁		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.14 cho thấy chiều dài dương vật thỏ đo được ở các thời điểm 5 phút, 10 phút, 15 phút, 20 phút, 25 phút và 30 phút sau khi dùng thuốc không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa lô dùng OS35 với lô dùng sildenafil ($p > 0,05$).



Hình 3.12. Hình ảnh cương dương của thỏ lô 1 dùng sildenafil ở thời điểm 15 phút sau khi dùng thuốc



Hình 3.13. Hình ảnh cương dương của thỏ lô 2 dùng OS35 liều 60 mg/kg ở thời điểm 15 phút sau khi dùng thuốc

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của OS35 lên thời gian cương dương của thỏ

Lô	n	Thời gian cương dương (phút)
Lô 1: Sildenafil	6	43,33 ± 6,96
Lô 2: OS35 60mg/kg	6	38,33 ± 5,68
p ₃₋₁		> 0,05

Kết quả ở bảng 3.15 cho thấy thời gian cương dương trên thỏ ở 2 lô nghiên cứu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.3.2. Đánh giá tác dụng của OS35 lên áp lực thể hang (ICP) trên chuột cống đực trưởng thành

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của OS35 lên ICP nền trước khi kích thích dây thần kinh hang

Lô	n	ICP nền trước kích thích thần kinh (mmHg)			
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 15 phút	Sau uống thuốc 30 phút	Sau uống thuốc 45 phút
Lô 1: sildenafil	8	19,70 ± 1,36	30,47 ± 2,87 (↑54,7%)	30,90 ± 3,01 (↑56,9%)	30,22 ± 3,24 (↑53,3%)
p _{trước-sau}			< 0,05	< 0,05	< 0,05
Lô 2: OS35 150mg/kg	7	23,63 ± 1,54	31,51 ± 3,87	31,02 ± 1,32 (↑31,6%)	32,31 ± 1,09 (↑36,7%)
p _{trước-sau}			> 0,05	< 0,05	< 0,05
p ₂₋₁		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.16 cho thấy:

- Ở thời điểm trước khi uống thuốc và các thời điểm nghiên cứu sau khi uống thuốc, ICP nền trước khi kích thích dây thần kinh hang ở cả 2 lô không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Lô chuột uống sildenafil, ICP nền trước khi kích thích dây thần kinh hang ở các thời điểm 15, 30 và 45 phút đều tăng có ý nghĩa thống kê so với trước khi uống thuốc ($p < 0,05$).

- Lô chuột uống OS35, ICP nền trước khi kích thích dây thần kinh hang ở thời điểm 15 phút có xu hướng tăng nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê so với trước khi uống thuốc ($p > 0,05$); còn ở thời điểm 30 và 45 phút đều tăng có ý nghĩa thống kê so với trước khi uống thuốc ($p < 0,05$).

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của OS35 lên ICP cực đại sau khi kích thích dây thần kinh hang

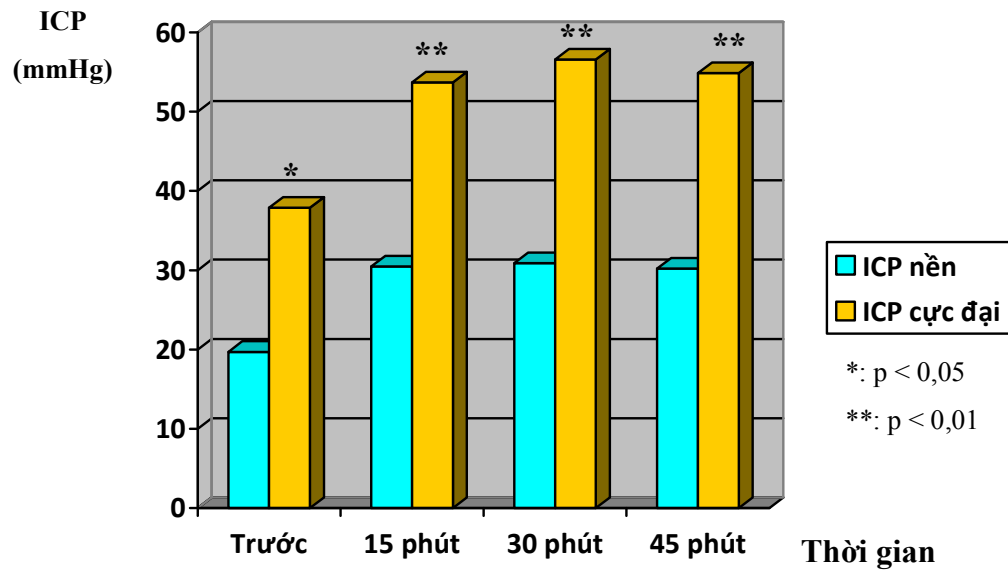
Lô	n	ICP cực đại sau khi kích thích thần kinh (mmHg)			
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 15 phút	Sau uống thuốc 30 phút	Sau uống thuốc 45 phút
Lô 1: sildenafil	8	37,89 ± 6,78	53,69 ± 6,19 (↑41,7%)	56,60 ± 6,26 (↑49,4%)	54,86 ± 7,40 (↑44,8%)
$p_{\text{trước-sau}}$			≤ 0,01	≤ 0,05	≤ 0,01
Lô 2: OS35 150mg/kg	7	43,14 ± 4,10	58,52 ± 5,22 (↑35,7%)	55,57 ± 3,97 (↑28,8%)	59,43 ± 4,72 (↑37,8%)
$p_{\text{trước-sau}}$			≤ 0,01	≤ 0,01	≤ 0,01
p_{2-1}		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.17 cho thấy:

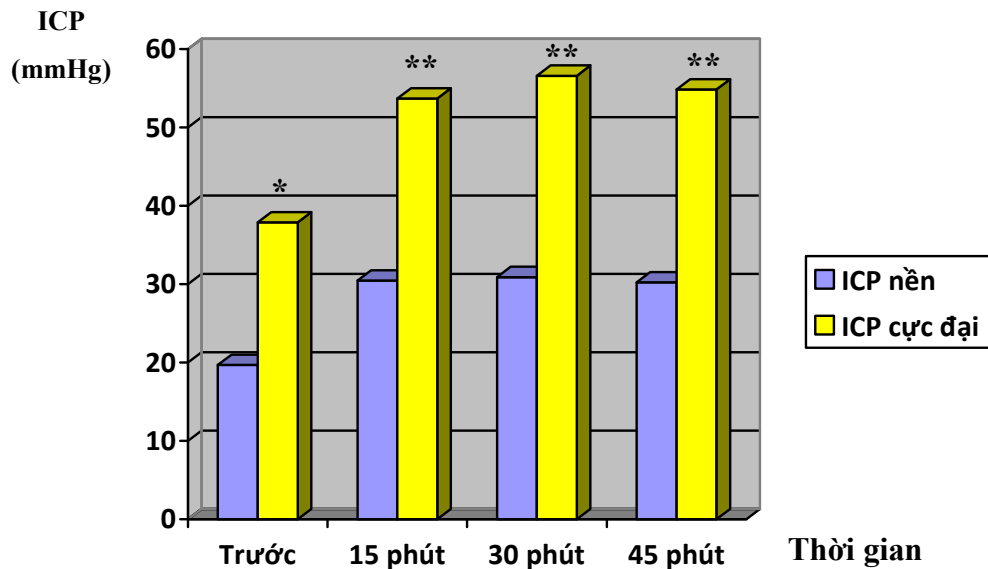
- Ở thời điểm trước khi uống thuốc, ICP cực đại sau khi kích thích dây thần kinh hang ở cả 2 lô không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Ở cả lô chuột uống sildenafil và lô chuột uống OS35, ICP cực đại sau khi kích thích dây thần kinh hang ở các thời điểm 15, 30 và 45 phút đều tăng

cao rõ rệt so với trước khi uống thuốc ($p < 0,05$ và $p < 0,01$) và không có sự khác biệt khi so sánh 2 lô với nhau ($p > 0,05$).



Biểu đồ 3.1. Ảnh hưởng của sildenafil lên ICP cực đại sau khi kích thích điện thần kinh hang so với ICP nền



Biểu đồ 3.2. Ảnh hưởng của OS35 lên ICP cực đại sau khi kích thích điện thần kinh hang so với ICP nền

Kết quả ở biểu đồ 3.1 và 3.2 cho thấy:

Sau khi kích thích điện dây thần kinh hang, ở thời điểm trước khi uống thuốc, giá trị ICP cực đại tăng lên có ý nghĩa thống kê so với ICP nền ($p < 0,05$). Ở cả 2 lô chuột dùng sildenafil và OS35 tại các thời điểm sau khi uống thuốc 15 phút, 30 phút và 45 phút, giá trị ICP cực đại tăng rõ rệt so với ICP nền ($p < 0,01$).

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của OS35 lên thời gian đáp ứng với kích thích dây thần kinh hang

Lô	n	Thời gian đáp ứng với kích thích thần kinh (giây)			
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 15 phút	Sau uống thuốc 30 phút	Sau uống thuốc 45 phút
Lô 1: sildenafil	8	90,81 ± 21,41	157,26 ± 22,28 (↑73,2%)	179,74 ± 24,32 (↑97,9%)	124,23 ± 19,52 (↑36,8%)
$p_{\text{trước-sau}}$			< 0,05	< 0,05	< 0,05
Lô 2: OS35 150mg/kg	7	129,08 ± 16,36	172,97 ± 40,09	151,46 ± 18,65 (↑17,3%)	119,32 ± 20,03
$p_{\text{trước-sau}}$			> 0,05	< 0,05	> 0,05
p_{2-1}		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.18 cho thấy:

- Ở thời điểm trước khi uống thuốc và các thời điểm nghiên cứu sau khi uống thuốc, thời gian đáp ứng với kích thích dây thần kinh hang ở cả 2 lô không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Lô chuột uống sildenafil, thời gian đáp ứng với kích thích dây thần kinh hang ở các thời điểm 15, 30 và 45 phút đều tăng có ý nghĩa thống kê so với trước khi uống thuốc ($p < 0,05$).

- Lô chuột uống OS35, thời gian đáp ứng với kích thích dây thần kinh hang ở thời điểm 15 phút và 45 phút có xu hướng tăng nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê so với trước khi uống thuốc ($p > 0,05$); còn ở thời điểm 30 phút tăng có ý nghĩa thống kê so với trước khi uống thuốc ($p < 0,05$).

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của OS35 lên huyết áp động mạch trung bình

Lô	n	Huyết áp động mạch trung bình (mmHg)			
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 15 phút	Sau uống thuốc 30 phút	Sau uống thuốc 45 phút
Lô 1: sildenafil	8	106,89 ± 7,53	106,08 ± 8,58	101,35 ± 5,82	100,52 ± 6,14
$p_{\text{trước-sau}}$			> 0,05	> 0,05	> 0,05
Lô 2: OS35 150mg/kg	7	108,60 ± 3,28	105,16 ± 2,32	104,21 ± 1,81	102,39 ± 2,10
$p_{\text{trước-sau}}$			> 0,05	> 0,05	> 0,05
p_{2-1}		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.19 cho thấy:

Ở cả 2 lô chuột uống sildenafil và OS35, huyết áp động mạch trung bình 15, 30 và 45 phút sau khi uống thuốc đều không thay đổi so với trước khi uống thuốc và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa 2 lô với nhau ($p > 0,05$).

**Bảng 3.19. Ảnh hưởng của OS35 lên
chỉ số ICP cực đại/ huyết áp động mạch**

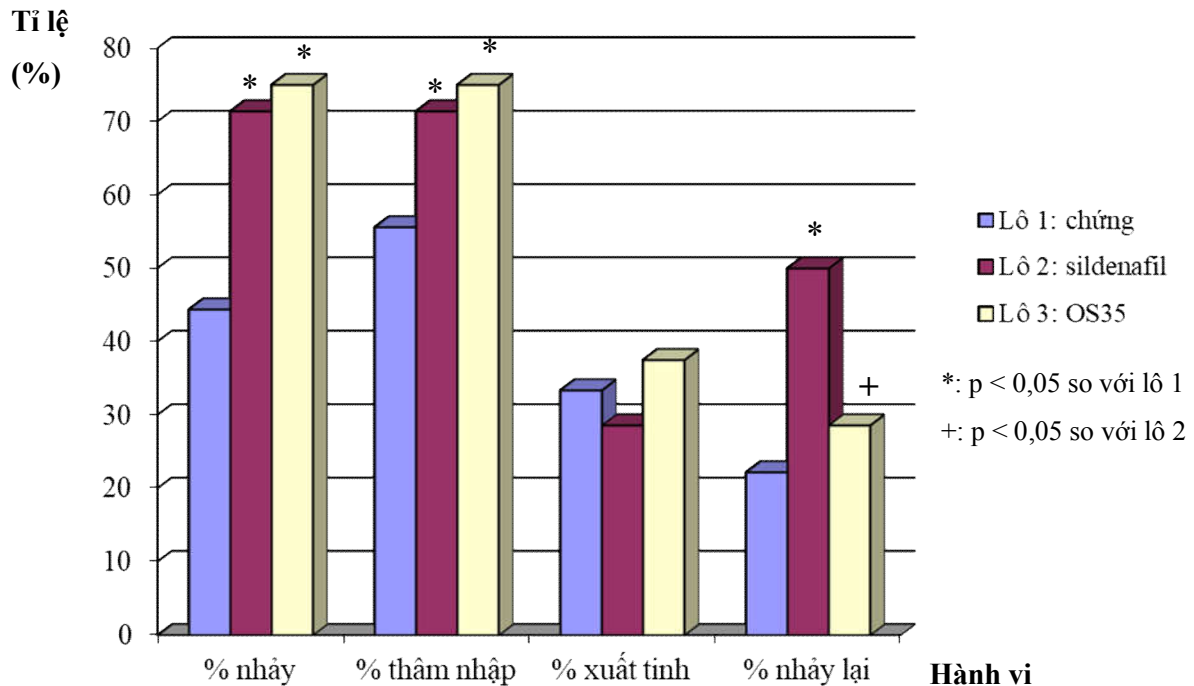
Lô	n	ICP cực đại/ huyết áp động mạch			
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 15 phút	Sau uống thuốc 30 phút	Sau uống thuốc 45 phút
Lô 1: sildenafil	8	0,35 ± 0,05	0,52 ± 0,14	0,56 ± 0,05	0,53 ± 0,04
$p_{\text{trước-sau}}$			<u>< 0,01</u>	<u>< 0,01</u>	<u>< 0,01</u>
Lô 2: OS35 150mg/kg	7	0,40 ± 0,03	0,56 ± 0,05	0,53 ± 0,04	0,58 ± 0,05
$p_{\text{trước-sau}}$			<u>< 0,01</u>	<u>< 0,01</u>	<u>< 0,01</u>
p_{2-1}		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.20 cho thấy:

- Ở thời điểm trước khi uống thuốc, chỉ số ICP cực đại/ huyết áp động mạch trung bình ở cả 2 lô không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Ở cả lô chuột uống sildenafil và lô chuột uống OS35, chỉ số ICP cực đại/ huyết áp động mạch trung bình ở các thời điểm 15, 30 và 45 phút đều tăng cao rõ rệt so với trước khi uống thuốc ($p < 0,01$) và không có sự khác biệt khi so sánh 2 lô với nhau ($p > 0,05$).

3.4. Đánh giá tác dụng của OS35 trên hành vi tình dục trên chuột cống trắng đực trưởng thành



Biểu đồ 3.3. Ảnh hưởng của OS35 lên tỉ lệ chuột nhảy, chuột thâm nhập, chuột xuất tinh và chuột nhảy lại sau xuất tinh ở chuột cống đực trưởng thành

Nhận xét: Kết quả ở biểu đồ 3.3 cho thấy:

- Lô chuột uống sildenafil có tỉ lệ chuột nhảy, tỉ lệ chuột thâm nhập và tỉ lệ chuột nhảy lại tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$); tỉ lệ chuột xuất tinh không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$).

- Lô chuột uống OS35 có tỉ lệ chuột nhảy, tỉ lệ chuột thâm nhập tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$) và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chuột uống sildenafil ($p > 0,05$); trong khi tỉ lệ chuột xuất tinh và tỉ lệ chuột nhảy lại không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$).

Bảng 3.20. Ảnh hưởng của OS35 lên số lần nhảy (MF), số lần thâm nhập (IF) ở chuột cống đực trưởng thành

Lô	n	Số liệu biểu diễn dưới dạng median (min – max)	
		Số lần nhảy	Số lần thâm nhập
Lô 1: dung môi	9	0 (0 – 1)	9 (0 – 29)
Lô 2: sildenafil	7	1 (0 – 1)	26 (22 – 30)
p ₂₋₁		> 0,05	<u>< 0,05</u>
Lô 3: OS35 150mg/kg	8	1 (0 – 1)	24 (1 – 36)
p ₃₋₁		> 0,05	<u>< 0,05</u>

Kết quả ở bảng 3.21 cho thấy

Chuột ở cả 2 lô uống sildenafil và OS35 đều có số lần thâm nhập tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$).

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của OS35 lên thời gian nhảy (ML), thời gian thâm nhập (IL) ở chuột cống đực trưởng thành

Lô	n	Thời gian (giây)	
		Thời gian nhảy	Thời gian thâm nhập
Lô 1: dung môi	9	1019,40 ± 308,60	844,11 ± 302,62
Lô 2: sildenafil	7	32,20 ± 5,93	391,16 ± 282,71
p ₂₋₁		<u>< 0,05</u>	<u>< 0,05</u>
Lô 3: OS35 150mg/kg	8	18,00 ± 10,27	52,50 ± 21,38
p ₃₋₁		<u>< 0,05</u>	<u>< 0,05</u>

Kết quả ở bảng 3.22 cho thấy:

Chuột ở cả 2 lô uống sildenafil và OS35 đều có thời gian nhảy, thời gian thâm nhập giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$).

Bảng 3.22. Ảnh hưởng của OS35 lên thời gian xuất tinh (EL) và thời gian nhảy lại (PEI) ở chuột cống đực trưởng thành

Lô	n	Thời gian (giây)	
		Thời gian xuất tinh	Thời gian nhảy lại
Lô 1: dung môi	9	1461,00 ± 171,29	1321,40 ± 239,38
Lô 2: sildenafil	7	1674,00 ± 80,17	1358,80 ± 281,50
p ₂₋₁		> 0,05	> 0,05
Lô 3: OS35 150mg/kg	8	1166,80 ± 218,65	857,33 ± 299,89
p ₃₋₁		> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.23 cho thấy:

Chuột ở cả 2 lô uống sildenafil và OS35 đều có thời gian xuất tinh và thời gian nhảy lại chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng (p > 0,05).

3.5. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chuột cống trắng đực bị gây suy giảm sinh sản bởi natri valproat

3.5.1. Đánh giá tác dụng bảo vệ của OS35 trên chuột cống trắng đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

3.5.1.1. Ảnh hưởng lên trọng lượng các cơ quan sinh dục

Bảng 3.23. Ảnh hưởng của OS35 lên trọng lượng các cơ quan sinh dục ở chuột công đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình bảo vệ

Lô	n	Trọng lượng cơ quan sinh dục (mg/100g thể trọng)					Cơ nâng hạ môn – hành hang
		Tinh hoàn	Túi tinh	Tuyến Cowper	Đầu dương vật	Tuyến tiền liệt	
Lô 1- NaCl + CMC	10	0,946 ± 0,056	0,221 ± 0,023	0,028 ± 0,002	0,037 ± 0,001	0,116 ± 0,009	0,275 ± 0,022
Lô 2 - Valproat + CMC	9	0,583 ± 0,057	0,141 ± 0,019	0,021 ± 0,002	0,039 ± 0,002	0,065 ± 0,007	0,270 ± 0,014
p ₂₋₁		< 0,001	< 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,001	> 0,05
Lô 3 - Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày	13	0,627 ± 0,047	0,163 ± 0,010	0,023 ± 0,002	0,038 ± 0,002	0,082 ± 0,008	0,274 ± 0,021
p ₃₋₁		< 0,001	< 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,01	> 0,05
p ₃₋₂		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.24 cho thấy:

- Chuột ở lô 2 – mô hình (uống natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần liên tục) có trọng lượng tinh hoàn, túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper giảm rõ rệt so với lô 1 (chứng sinh học) ($p < 0,001$ và $p < 0,05$).

- Chuột ở lô 3 (uống natri valproat 500 mg/kg/ngày và OS35 150 mg/kg/ngày trong 7 tuần liên tục) trọng lượng các cơ quan sinh dục cũng tăng so với lô 2 (gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat 7 tuần) nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.5.1.2. Ảnh hưởng lên mật độ và độ di động của tinh trùng

Bảng 3.24. Ảnh hưởng của OS35 lên mật độ tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng sống ở chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình bảo vệ

Lô	n	Mật độ và tỉ lệ tinh trùng	
		Mật độ tinh trùng ($10^6/\text{mL}$)	Tỉ lệ tinh trùng sống (%)
Lô 1- NaCl + CMC	10	235,13 ± 15,08	85,88 ± 1,64
Lô 2 - Valproat + CMC	9	110,78 ± 18,94	64,56 ± 4,09
p ₂₋₁		<u>< 0,01</u>	<u>< 0,001</u>
Lô 3 - Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày	13	187,09 ± 11,28	79,45 ± 2,09
p ₃₋₁		<u>< 0,05</u>	<u>< 0,05</u>
p ₃₋₂		<u>< 0,01</u>	<u>< 0,01</u>

Kết quả ở bảng 3.25 cho thấy:

- Chuột ở lô 2 có mật độ tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng sống giảm rõ rệt so với lô 1 (chứng sinh học) ($p < 0,01$ và $p < 0,001$).

- Chuột ở lô 3 (uống OS35 150 mg/kg/ngày cùng với natri valproat trong 7 tuần liên tục) có mật độ tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng sống tăng cao rõ rệt so với lô 2 (uống natri valproat và dung môi pha thuốc CMC trong 7 tuần liên tục) ($p < 0,01$).

Bảng 3.25. Ảnh hưởng của OS35 lên mức độ di động của tinh trùng ở chuột công đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình bảo vệ

Lô	n	Tỉ lệ di động/ tiến tới (%)			
		Có tiến tới	Tiến tới nhanh	Không tiến tới	Không di động
Lô 1- NaCl + CMC	8	39,63 ± 2,18	35,50 ± 2,15	5,88 ± 0,44	54,50 ± 2,31
Lô 2 - Valproat + CMC	9	17,78 ± 2,93	10,33 ± 2,12	8,00 ± 0,82	74,22 ± 3,38
p ₂₋₁		< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,001
Lô 3 - Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày	11	30,00 ± 2,78	21,27 ± 2,53	5,00 ± 0,50	65,00 ± 2,71
p ₃₋₁		< 0,05	< 0,01	< 0,05	< 0,05
p ₃₋₂		< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,05

Kết quả ở bảng 3.26 cho thấy:

- Chuột ở lô 2 có tỉ lệ tinh trùng có tiến tới, tỉ lệ tinh trùng tiến tới nhanh giảm rõ rệt so với lô 1 (chứng sinh học) ($p < 0,01$, $p < 0,001$); trong khi đó, tỉ lệ tinh trùng không tiến tới, tỉ lệ tinh trùng không di động tăng rõ rệt so với lô 1 ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$).

- Chuột ở lô 3 (uống OS35 150 mg/kg/ngày cùng với natri valproat trong 7 tuần liên tục) có tỉ lệ tinh trùng có tiến tới, tỉ lệ tinh trùng tiến tới nhanh tăng rõ rệt so với lô 2 (uống natri valproat và dung môi pha thuốc trong 7 tuần); trong khi đó, tỉ lệ tinh trùng không tiến tới và tỉ lệ tinh trùng không di động giảm rõ rệt có ý nghĩa thống kê so với lô 2 ($p < 0,05$, $p < 0,01$).

**Bảng 3.26. Ảnh hưởng của OS35 lên hình thái của tinh trùng ở chuột công
đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat
trên mô hình bảo vệ**

Lô	n	Tỉ lệ bình thường (%)	Tỉ lệ bất thường (%)		
			Đầu	Cổ	Đuôi
Lô 1- NaCl + CMC	8	48,88 ± 1,43	25,50 ± 0,94	12,00 ± 0,87	13,63 ± 0,89
Lô 2 - Valproat + CMC	9	22,67 ± 1,03	38,11 ± 1,03	16,67 ± 0,97	22,56 ± 1,80
p ₂₋₁		<u>< 0,001</u>	<u>< 0,001</u>	<u>< 0,05</u>	<u>< 0,01</u>
Lô 3 - Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày	11	41,18 ± 1,66	30,73 ± 1,70	12,73 ± 1,18	15,36 ± 1,06
p ₃₋₁		<u>< 0,01</u>	<u>< 0,05</u>	> 0,05	> 0,05
p ₃₋₂		<u>< 0,001</u>	<u>< 0,01</u>	<u>< 0,05</u>	<u>< 0,01</u>

Kết quả ở bảng 3.27 cho thấy:

- Chuột ở lô 2 có tỉ lệ tinh trùng bình thường giảm rõ rệt so với lô 1 (chứng sinh học) ($p < 0,001$); trong khi đó, tỉ lệ tinh trùng bất thường ở đầu, cổ, đuôi tăng rõ rệt so với lô 1 ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$).

- Chuột ở lô 3 (uống OS35 150 mg/kg/ngày cùng với natri valproat trong 7 tuần liên tục) có tỉ lệ tinh trùng bình thường tăng đáng kể so với lô 2 ($p < 0,001$); trong khi đó, tỉ lệ tinh trùng bất thường ở đầu, cổ, đuôi giảm rõ rệt có ý nghĩa thống kê so với lô 2 ($p < 0,05$, $p < 0,01$) nhưng vẫn chưa đạt được chỉ số bình thường ở lô 1 (chứng sinh học).

Bảng 3.27. Ảnh hưởng của OS35 lên nồng độ testosterone trong máu chuột công đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình bảo vệ

Lô	n	Nồng độ testosterone (nmol/l)
Lô 1- NaCl + CMC	8	17,12 ± 2,00
Lô 2 - Valproat + CMC	9	8,89 ± 1,70
p ₂₋₁		≤ 0,05
Lô 3 - Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày	11	14,16 ± 1,71
p ₃₋₁		> 0,05
p ₃₋₂		≤ 0,05

Kết quả ở bảng 3.28 cho thấy:

- Nồng độ testosterone trong máu chuột lô 2 (mô hình) giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$).

- Nồng độ testosterone trong máu chuột lô 3 dùng OS35 150 mg/kg và natri valproat 7 tuần tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,05$) và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$).

3.5.1.3. Ảnh hưởng lên hình thái mô học của tinh hoàn

Lô 1 – Chứng sinh học: các ống sinh tinh tròn căng, vỏ xơ mỏng, đa số các ống có lòng hẹp, chứa nhiều tinh trùng. Biểu mô tinh dày, có đủ các loại tế bào dòng tinh: tinh nguyên bào, tinh bào, tiền tinh trùng và tinh trùng. Mô kẽ thưa thớt, các mạch máu trong mô kẽ nhỏ (hình 1, hình 2 phần phụ lục 2).

Lô 2 – Gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat 500 mg/kg/ngày và dung môi pha thuốc CMC 0,5% trong 7 tuần: các ống sinh tinh đa số tròn căng, một số thành nhăn nheo. Các ống sinh tinh vỏ mỏng, lòng rộng, nhiều ống không có tinh trùng. Những ống có tinh trùng với số lượng ít, biểu mô tinh mỏng, chủ yếu là tinh nguyên bào số với số lượng ít. Số ống sinh tinh có

tiền tinh trùng rất ít, bào tương của tế bào dòng tinh thoái hóa hốc nặng nề. Mô kẽ tăng sinh nhiều tế bào, các mạch máu sung huyết chứa đầy hồng cầu (hình 3, hình 4 phần phụ lục 2)

Lô 3 – Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày: 62,5% số chuột trong lô có tinh hoàn với mô kẽ bình thường, biểu mô tinh dày, đầy đủ các loại tế bào với cấu trúc bình thường, mô kẽ bình thường (hình 5, hình 6 phần phụ lục 2).

Bảng 3.28. Ảnh hưởng của OS35 lên kích thước ống sinh tinh ở chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình bảo vệ

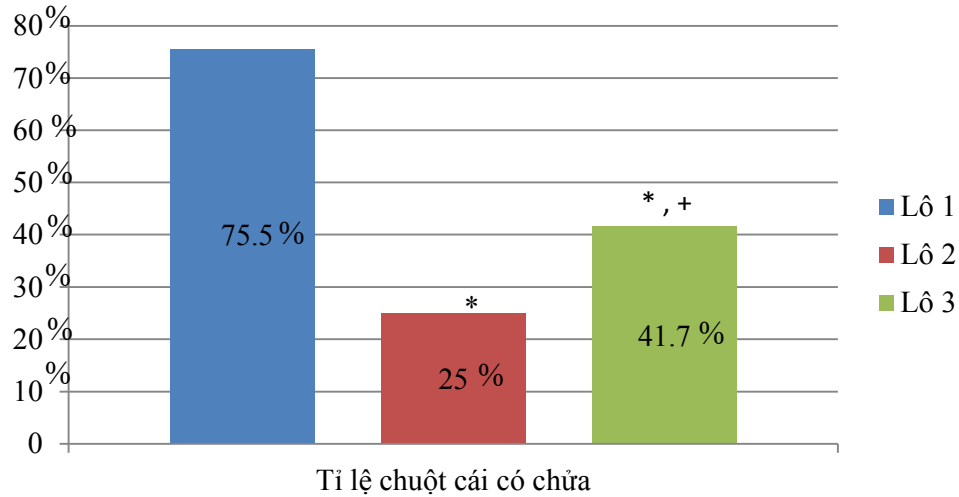
Lô	n	Kích thước ống sinh tinh
Lô 1- NaCl + CMC	10	128,21 ± 2,72
Lô 2 - Valproat + CMC	8	92,62 ± 3,27
p ₂₋₁		≤ 0,001
Lô 3 - Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày	10	112,04 ± 2,84
p ₃₋₁		≤ 0,001
p ₃₋₂		≤ 0,001

Kết quả ở bảng 3.29 cho thấy:

- Ở lô 2 (gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat và dung môi pha thuốc CMC trong 7 tuần liên tục), kích thước ống sinh tinh giảm rất rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,001$).

- Ở lô 3 (uống OS35 + natri valproat), kích thước ống sinh tinh tăng rõ rệt so với lô mô hình, tuy nhiên vẫn thấp hơn so với lô chứng ($p < 0,001$).

3.5.1.4. Tác dụng bảo vệ của OS35 trên các chỉ số nghiên cứu ở chuột cống cái ghép với chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat



*: p so với lô 1 $< 0,05$

+: p so với lô 2 $< 0,05$

Biểu đồ 3.4. Ảnh hưởng của OS35 lên tỉ lệ chuột cái có chửa trên mô hình bảo vệ

Bảng 3.29. Ảnh hưởng của OS35 lên số hoàng thể, số thai đậu và số thai phát triển bình thường trên mô hình bảo vệ

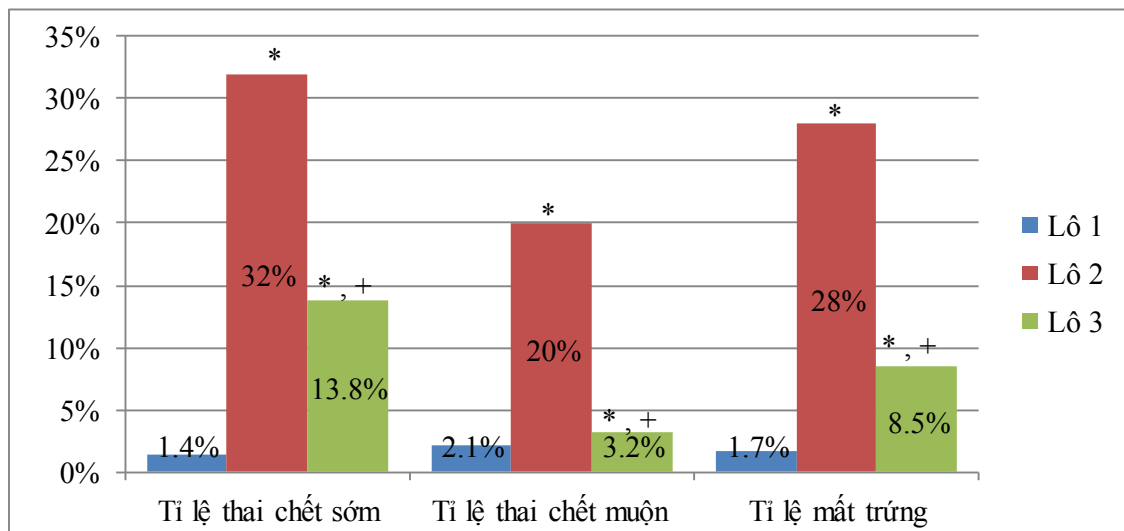
Chỉ số nghiên cứu	Lô nghiên cứu					
	Lô 1	Lô 2	p_{2-1}	Lô 3	p_{3-1}	p_{3-2}
Số hoàng thể/ 1 chuột mẹ	10,14 ± 1,57	9,50 ± 2,12	> 0,05	10,20 ± 1,69	> 0,05	> 0,05
Số thai đậu/1 chuột mẹ	10,00 ± 1,73	6,50 ± 0,71	≤ 0,01	9,40 ± 2,22	> 0,05	≤ 0,05
Số thai phát triển bình thường/ 1 chuột mẹ	9,71 ± 2,06	5,00 ± 1,41	≤ 0,001	7,80 ± 1,93	≤ 0,05	≤ 0,05

Kết quả ở biểu đồ 3.4 và bảng 3.30 cho thấy:

- Số hoàng thể/ 1 chuột mẹ không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa các lô với nhau ($p > 0,05$).

- Ở lô 2 (gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat và dung môi pha thuốc CMC trong 7 tuần liên tục), tỉ lệ chuột cái có thai, số thai đậu, số thai phát triển bình thường trung bình/1 chuột mẹ giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$).

- Ở lô 3 (uống OS35 + natri valproat), tỉ lệ chuột cái có thai, số thai đậu, số thai phát triển bình thường trung bình/1 chuột mẹ tăng có ý nghĩa thống kê so với lô 2 ($p < 0,05$).



*: p so với lô 1 $< 0,05$

+: p so với lô 2 $< 0,05$

Biểu đồ 3.5. Ảnh hưởng của OS35 lên tỉ lệ thai chết sớm, chết muộn và tỉ lệ mất trứng ở chuột cái trên mô hình bảo vệ

Kết quả ở biểu đồ 3.5 cho thấy:

- Ở lô 2 (gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat và dung môi pha thuốc CMC trong 7 tuần liên tục), tỉ lệ thai chết sớm, tỉ lệ thai chết muộn và tỉ lệ mất trứng tăng rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$).

- Ở lô 3 (uống OS35 + natri valproat): tỉ lệ thai chết sớm, chết muộn, mất trứng giảm rõ so với lô 2 ($p < 0,05$).

3.5.2. Đánh giá tác dụng phục hồi của OS35 trên cấu trúc và chức năng sinh sản của chuột cống trắng đực trưởng thành gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

3.5.2.1. Ảnh hưởng lên trọng lượng các cơ quan sinh dục

Bảng 3.30. Ảnh hưởng của OS35 lên trọng lượng các cơ quan sinh dục của chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình phục hồi

Lô	n	Trọng lượng cơ quan sinh dục (mg/100g thể trọng)					
		Tinh hoàn	Túi tinh	Tuyến Cowper	Đầu dương vật	Tuyến tiền liệt	Cơ nâng hậu môn – hành hang
Lô 1- NaCl + CMC	8	0,924 ± 0,068	0,206 ± 0,026	0,027 ± 0,002	0,037 ± 0,001	0,115 ± 0,011	0,267 ± 0,027
Lô 2 - Valproat + CMC	8	0,693 ± 0,034	0,132 ± 0,010	0,022 ± 0,001	0,037 ± 0,002	0,092 ± 0,004	0,280 ± 0,020
p ₂₋₁		< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05
Lô 3 - Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày	12	0,697 ± 0,038	0,145 ± 0,011	0,024 ± 0,002	0,035 ± 0,002	0,100 ± 0,008	0,283 ± 0,017
p ₃₋₁		< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p ₃₋₂		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.31 cho thấy:

- Chuột ở lô 2 (uống dung môi pha thuốc CMC 0,5% trong 10 ngày sau uống natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần): trọng lượng của tinh hoàn,

túi tinh, tuyến Cowper và tuyến tiền liệt giảm rõ rệt so với lô 1 (chứng sinh học) với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

- Chuột ở lô 3 (uống OS35 150mg/kg/ngày trong 10 ngày sau uống natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần): trọng lượng các cơ quan sinh dục không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 2 ($p > 0,05$).

3.5.2.2. Ảnh hưởng lên mật độ và mức độ di động của tinh trùng

Bảng 3.31. Ảnh hưởng của OS35 lên mật độ tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng sống của chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình phục hồi

Lô	n	Mật độ và tỉ lệ tinh trùng	
		Mật độ tinh trùng (triệu/mL)	Tỉ lệ tinh trùng sống (%)
Lô 1- NaCl + CMC	8	222,63 ± 19,42	84,63 ± 1,67
Lô 2 - Valproat + CMC	8	136,50 ± 7,38	72,63 ± 2,74
p ₂₋₁		<u>< 0,01</u>	<u>< 0,01</u>
Lô 3 - Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày	8	137,50 ± 10,54	76,63 ± 2,92
p ₃₋₁		<u>< 0,05</u>	<u>< 0,05</u>
p ₃₋₂		> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.32 cho thấy:

- Chuột ở lô 2 có mật độ tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng sống giảm rõ rệt so với lô 1 (chứng sinh học) ($p < 0,01$).

- Chuột ở lô 3 (uống OS35 150mg/kg/ngày trong 10 ngày sau uống natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần) có mật độ tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng sống không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 2 ($p > 0,05$).

Bảng 3.32. Ảnh hưởng của OS35 lên mức độ di động của tinh trùng ở chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình phục hồi

Lô	n	Tỉ lệ di động/ tiến tới (%)			
		Có tiến tới	Tiến tới nhanh	Không tiến tới	Không di động
Lô 1- NaCl + CMC	8	42,25 ± 2,18	38,00 ± 2,19	6,25 ± 0,41	51,50 ± 2,21
Lô 2 - Valproat + CMC	8	24,13 ± 2,63	20,00 ± 2,38	6,00 ± 1,18	69,88 ± 2,88
p ₂₋₁		< 0,001	< 0,001	> 0,05	< 0,01
Lô 3 - Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày	8	38,25 ± 2,62	32,13 ± 2,72	5,88 ± 0,81	55,88 ± 2,95
p ₃₋₁		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p ₃₋₂		< 0,05	< 0,01	> 0,05	< 0,05

Kết quả ở bảng 3.33 cho thấy:

- Chuột ở lô 2 có tỉ lệ tinh trùng có tiến tới và tỉ lệ tinh trùng tiến tới nhanh giảm rõ rệt so với lô 1 (chứng sinh học) ($p < 0,001$); tỉ lệ tinh trùng không di động tăng rõ rệt so với lô 1 ($p < 0,01$); riêng tỉ lệ tinh trùng không tiến tới có xu hướng giảm, mặc dù không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

- Chuột ở lô 3 (uống OS35 150mg/kg/ngày trong 10 ngày sau uống natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần) có tỉ lệ tinh trùng có tiến tới và tiến tới nhanh tăng rõ rệt so với lô 2 ($p < 0,05$; $p < 0,01$); tỉ lệ tinh trùng không di động cũng giảm rõ rệt với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tỉ lệ tinh trùng không tiến tới có xu hướng giảm nhẹ ($p > 0,05$).

**Bảng 3.33. Ảnh hưởng của OS35 lên hình thái của tinh trùng ở chuột công
đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat
trên mô hình phục hồi**

Lô	n	Tỉ lệ bình thường (%)	Tỉ lệ bất thường (%)		
			Đầu	Cổ	Đuôi
Lô 1- NaCl + CMC	8	50,63 ± 1,12	25,75 ± 1,22	11,63 ± 0,91	12,00 ± 1,05
Lô 2 - Valproat + CMC	9	27,75 ± 1,21	36,88 ± 1,43	15,75 ± 1,52	19,63 ± 0,84
p ₂₋₁		<u>< 0,001</u>	<u>< 0,001</u>	<u>< 0,05</u>	<u>< 0,001</u>
Lô 3 - Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày	11	42,63 ± 0,96	32,25 ± 1,42	11,63 ± 1,03	13,50 ± 1,38
p ₃₋₁		<u>< 0,01</u>	<u>< 0,01</u>	> 0,05	> 0,05
p ₃₋₂		<u>< 0,001</u>	<u>< 0,01</u>	<u>< 0,05</u>	<u>< 0,01</u>

Kết quả ở bảng 3.34 cho thấy:

- Chuột ở lô 2 có tỉ lệ tinh trùng bình thường giảm rõ rệt so với lô 1 ($p < 0,001$); trong khi đó, tỉ lệ tinh trùng bất thường ở đầu, cổ, đuôi tăng rõ rệt so với lô 1 ($p < 0,05$, $p < 0,001$).

- Chuột ở lô 3 (uống natri valproat 7 tuần, sau đó, uống OS35 150 mg/kg/ngày trong 10 ngày) có tỉ lệ tinh trùng bình thường tăng đáng kể so với lô 2 ($p < 0,001$); trong khi đó, tỉ lệ tinh trùng bất thường ở đầu, cổ, đuôi giảm rõ rệt có ý nghĩa thống kê so với lô 2 ($p < 0,05$, $p < 0,01$).

Bảng 3.34. Ảnh hưởng của OS35 lên nồng độ testosterone trong máu chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình phục hồi

Lô	n	Nồng độ testosterone (nmol/l)
Lô 1- NaCl + CMC	8	16,78 ± 3,03
Lô 2 - Valproat + CMC	9	10,17 ± 1,06
p ₂₋₁		≤ 0,05
Lô 3 - Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày	11	14,34 ± 1,59
p ₃₋₁		> 0,05
p ₃₋₂		≤ 0,05

Kết quả ở bảng 3.35 cho thấy:

- Nồng độ testosterone trong máu chuột lô 2 (mô hình) giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$).

- Nồng độ testosterone trong máu chuột lô 3 dùng OS35 150 mg/kg trong 10 ngày sau khi dùng natri valproat 7 tuần tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,05$).

3.5.2.3. Ảnh hưởng lên hình thái mô học của tinh hoàn

Lô 1– Chứng sinh học (chuột đực cho uống nước muối sinh lý trong 7 tuần và uống dung môi pha thuốc CMC 0,5% trong 10 ngày): các ống sinh tinh tròn căng, vỏ xơ mỏng; đa số các ống có lòng hẹp, chứa nhiều tinh trùng. Biểu mô tinh dày, có đủ các loại tế bào dòng tinh: tinh nguyên bào, tinh bào, tiền tinh trùng và tinh trùng. Mô kẽ thưa thớt, các mạch máu trong mô kẽ nhỏ (hình 7 phần phụ lục 2)

Lô 2 – Lô mô hình (gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat 500 mg/kg/ngày 7 tuần, sau đó uống dung môi pha thuốc CMC 0,5% 10 ngày): các ống sinh tinh có vỏ xơ mỏng, thành căng tròn, lòng hẹp, nhiều ống có tinh

trùng, có đủ các loại tế bào dòng tinh. Các tế bào có thoái hóa hốc mức độ vừa đến nặng. Mô kẽ phù nề, khoảng gian bào rất rộng (hình 8, hình 9 phần phụ lục 2).

Lô 3– Lô phục hồi (natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần, sau đó uống OS35 150mg/kg/ngày trong 10 ngày): các ống sinh tinh có vỏ xơ mỏng, thành căng, lòng hẹp, nhiều ống có tinh trùng. Biểu mô tinh dày, đủ các loại tế bào dòng tinh. Mô kẽ phù nề, các tế bào có thoái hóa hốc mức độ nhẹ đến vừa (hình 10, hình 11 phần phụ lục 2)

Bảng 3.35. Ảnh hưởng của OS35 lên kích thước ống sinh tinh ở chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình phục hồi

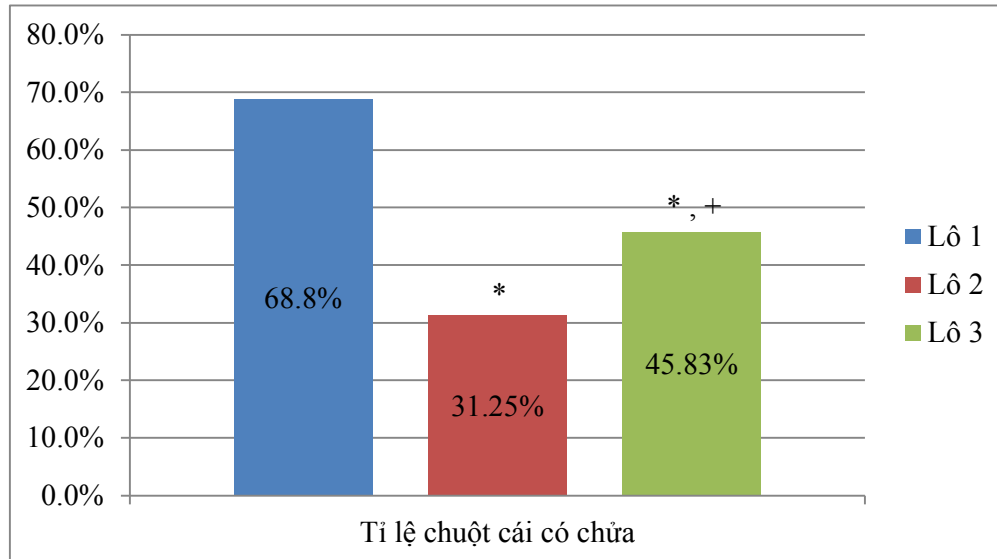
Lô	n	Kích thước ống sinh tinh
Lô 1- NaCl + CMC	10	127,13 ± 2,69
Lô 2 - Valproat + CMC	8	115,67 ± 3,54
p ₂₋₁		<u>< 0,01</u>
Lô 3 - Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày	10	125,53 ± 1,65
p ₃₋₁		> 0,05
p ₃₋₂		<u>< 0,05</u>

Kết quả ở bảng 3.36 cho thấy:

- Kích thước ống sinh tinh chuột lô 2 (mô hình) giảm rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,01$).

- Kích thước ống sinh tinh chuột lô 3 dùng OS35 150 mg/kg trong 10 ngày sau khi dùng natri valproat 7 tuần tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,05$) và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$).

3.5.2.4. Ảnh hưởng lên tỉ lệ chuột cái có chửa, số hoàng thể, số thai đậu và số thai phát triển bình thường



*: p so với lô 1 $< 0,05$

+: p so với lô 2 $< 0,05$

Biểu đồ 3.6. Ảnh hưởng của OS35 lên tỉ lệ chuột cái có chửa trên mô hình phục hồi

Bảng 3.36. Ảnh hưởng của OS35 lên số hoàng thể, số thai đậu và số thai phát triển bình thường trên mô hình phục hồi

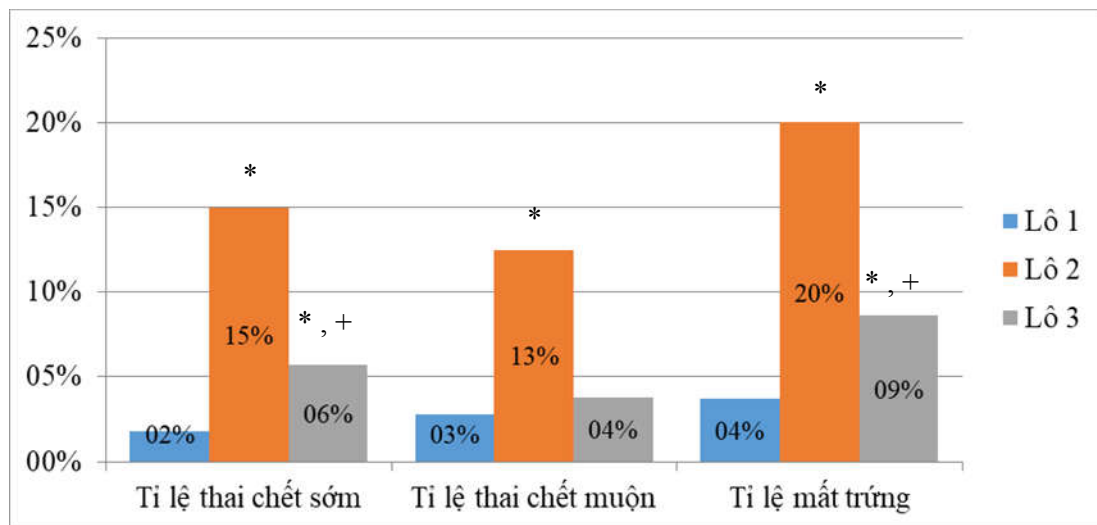
Chỉ số nghiên cứu	Lô nghiên cứu					
	Lô 1	Lô 2	p_{2-1}	Lô 3	p_{3-1}	p_{3-2}
Số hoàng thể/ 1 chuột mẹ	10,27 ± 1,56	9,60 ± 1,52	> 0,05	10,36 ± 2,58	> 0,05	> 0,05
Số thai đậu/1 chuột mẹ	9,91 ± 1,38	8,00 ± 2,00	< 0,01	9,55 ± 2,50	> 0,05	> 0,05
Số thai phát triển bình thường/ 1 chuột mẹ	9,45 ± 1,44	5,80 ± 1,10	< 0,001	8,64 ± 2,29	> 0,05	< 0,05

Kết quả ở biểu đồ 3.6 và bảng 3.37 cho thấy:

- Số hoàng thể trung bình trên 1 chuột mẹ không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các lô ($p > 0,05$).

- Ở lô 2, tỉ lệ chuột cái có chửa, số thai đậu/ 1 chuột mẹ và số thai phát triển bình thường/1 chuột mẹ giảm có ý nghĩa thống kê so với lô 1 (chứng sinh học) (tương ứng $p < 0,05$; $p < 0,01$ và $p < 0,001$); số hoàng thể/1 chuột mẹ giảm nhẹ so với lô 1, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Ở lô 3 (uống OS35 150mg/kg/ngày trong 10 ngày sau uống natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần), tỉ lệ chuột cái có chửa và số thai phát triển bình thường/ 1 chuột mẹ tăng rõ rệt so với lô 2 ($p < 0,05$); các chỉ số số thai đậu và



*: p so với lô 1 $< 0,05$; +: p so với lô 2 $< 0,05$

Biểu đồ 3.7. Ảnh hưởng của OS35 lên tỉ lệ thai chết sớm, chết muộn và tỉ lệ mất trứng ở chuột cái trên mô hình phục hồi

Kết quả ở biểu đồ 3.7 cho thấy:

- Ở lô 2, tỉ lệ thai chết sớm, tỉ lệ thai chết muộn và tỉ lệ mất trứng ở chuột cái tăng có ý nghĩa thống kê so với lô 1 (chứng sinh học) ($p < 0,05$).

- Ở lô 3 (uống OS35 150mg/kg/ngày trong 10 ngày sau uống natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần), tỉ lệ thai chết sớm và tỉ lệ mất trứng giảm rõ khi so sánh với lô 2, với sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tỉ lệ thai chết muộn có giảm so với lô 2, nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của OS35 trên động vật thực nghiệm

Trên thế giới cũng như ở Việt Nam, nguồn dược liệu dồi dào mở ra những cơ hội không giới hạn để phát triển thuốc mới. Phần lớn các dược liệu được sử dụng trong dân gian đều dựa vào các kinh nghiệm hoặc bằng chứng theo y học cổ truyền về tác dụng điều trị của các dược liệu đó. Tuy nhiên, có rất ít các thông tin về tính an toàn và độc tính của dược liệu. Trước đây, người ta cho rằng các dược liệu đã sử dụng lâu đời có thể được coi là an toàn và không có độc tính. Tuy nhiên, thực tế cho thấy khi sử dụng trên người, dược liệu có thể gây ra các tác dụng không mong muốn. Điều này đưa đến mối quan tâm về các độc tính có thể có khi sử dụng các dược liệu ngắn hạn hoặc dài hạn. Do đó, việc đánh giá độc tính của dược liệu trước khi sử dụng là không thể thiếu. Đánh giá độc tính trên động vật thực nghiệm là một phần nghiên cứu rất quan trọng trong quá trình phát triển thuốc mới. Trong số đó, nghiên cứu độc tính cấp và độc tính bán trường diễn thường được thực hiện. Các kết quả từ nghiên cứu độc tính cấp, bán trường diễn của dược liệu sẽ cung cấp bằng chứng cho tính an toàn trước khi sử dụng trên người.

4.1.1. Xác định độc tính cấp của OS35 theo đường uống trên chuột nhắt trắng

Theo định nghĩa của Hệ thống hòa hợp toàn cầu (Globally Harmonised System - GHS), độc tính cấp là những tác dụng không mong muốn xảy ra sau khi dùng một chất trong vòng 24 giờ [110].

Động vật thường được sử dụng loài gặm nhấm với đường dùng thường là đường dùng dự kiến sử dụng trên người [111]. Trong nghiên cứu độc tính cấp, mỗi động vật thực nghiệm được dùng thuốc trong 24 giờ, sau đó quan sát trong 1 tuần để xác định các triệu chứng độc (nếu có). Một số nghiên cứu độc

tính cấp được thiết kế để xác định LD₅₀ của thuốc thử. LD₅₀ được định nghĩa là liều gây chết 50% số động vật thực nghiệm [111],[112].

Kết quả từ nghiên cứu độc tính cấp và LD₅₀ có thể được dùng cho các mục đích như sau [112]:

- Làm cơ sở ban đầu để phân loại các chất hoặc thuốc thử về độc tính.
- Định hướng xác định liều trong các nghiên cứu tiếp theo bao gồm cả nghiên cứu độc tính dài hạn và nghiên cứu tác dụng dược lý.
- Xác định bước đầu 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.

Nghiên cứu này đánh giá độc tính cấp của OS35 trên chuột nhắt trắng khi dùng đường uống theo phương pháp Litchfield Wilcoxon [103],[104].

Kết quả cho thấy những lô chuột uống chế phẩm OS35 liều từ 1,25 g/kg thể trọng chuột trở lên có xuất hiện hiện tượng chuột chết. Từ tỉ lệ % chuột chết tương ứng với liều OS35 cho uống, xác định được LD₅₀ của OS35 theo đường uống trên chuột nhắt trắng là 4,5 (2,8 - 7,1) g/kg với $p = 0,05$.

Theo Hệ thống Hòa hợp Toàn cầu (GHS), dựa vào giá trị LD₅₀ có thể phân loại các chất thành 5 nhóm như trình bày ở bảng 4.1 [110]. Như vậy, theo bảng phân loại của GHS, OS35 được xếp vào Nhóm 5. Cũng theo GHS, các chất được xếp vào nhóm 5 là những chất có độc tính cấp tương đối thấp, tuy nhiên, trong một số trường hợp nhất định, các chất này có thể gây tổn thương cho các đối tượng nhạy cảm. Một nghiên cứu được tiến hành năm 2013 về độc tính cấp của osthonol trên chuột nhắt trắng theo đường uống cũng xác định được LD₅₀ của osthonol là 3,45 (3,03 – 4,03) g/kg với $p = 0,05$ [113]. Theo kết quả này, thuốc thử cũng được xếp vào Nhóm 5 theo phân loại của GHS.

Bảng 4.1. Phân loại các chất dùng đường uống dựa vào LD₅₀ theo GHS [110]

Giá trị LD ₅₀	Phân loại theo GHS	Thông tin bắt buộc ghi trên nhãn
≤ 5 mg/kg	Nhóm 1	NGUY HIỂM
> 5 mg/kg và ≤ 50 mg/kg	Nhóm 2	Đe dọa tính mạng nếu nuốt phải
> 50 mg/kg và ≤ 300 mg/kg	Nhóm 3	NGUY HIỂM Gây độc nếu nuốt phải
> 300 mg/kg và ≤ 2000 mg/kg	Nhóm 4	CẢNH BÁO Gây hại nếu nuốt phải
> 2000 mg/kg và ≤ 5000 mg/kg	Nhóm 5	CẢNH BÁO Có thể gây hại nếu nuốt phải
> 5000 mg/kg	Không phân loại	Không yêu cầu cảnh báo đặc biệt

Liều dùng của OS35 có tác dụng dược lý được sử dụng trong luận án này là 150 mg/kg ở chuột cống và 60 mg/kg ở thỏ; tương ứng với 20 mg/kg ở người; ngoại suy ra liều ở chuột nhất là 240 mg/kg. Liều bắt đầu có tác dụng dược lý bằng 1/5 liều bắt đầu gây chết chuột (1,25 g) và bằng 1/62,5 liều chết 100% chuột. So với LD₅₀, liều có tác dụng dược lý bằng 1/18,75. Theo Đỗ Trung Đàm, liều có tác dụng dược lý dao động trong giới hạn 1/20 đến 1/5 LD₅₀ [104].

Trong nghiên cứu độc tính cấp, ngoài việc xác định LD₅₀, các nhà nghiên cứu còn có mục đích khác là xác định bước đầu cơ quan nào có thể bị gây độc bởi thuốc thử và sơ bộ xác định cơ chế gây độc của thuốc thử đó. Trong nghiên cứu độc tính cấp của OS35, các triệu chứng độc tính cấp ở các lô có chuột chết như sau: sau khi uống, chuột ở tình trạng chậm chạp, ức chế, nằm im, không ăn uống gì. Sau 30 phút, chuột chuyển sang trạng thái khó thở,

vã bọt mép rồi dẫn đến suy hô hấp, tím vùng đầu và cổ, co giật rồi chết. Các chuột đều chết trong vòng 24 giờ sau khi uống thuốc thử. Khi mổ các chuột chết để quan sát đại thể thì quan sát thấy hiện tượng sung huyết ở tim, phổi, gan của chuột.

Một số nghiên cứu cho thấy osthonol có tác dụng đối kháng kênh calci trên tế bào cơ trơn mạch máu và tăng lượng GMP vòng ở tế bào cơ trơn mạch vành [60],[61]. Khi dùng với liều cao trong nghiên cứu độc tính cấp, OS35 có tác dụng giãn mạch quá mức. Lý giải này phù hợp với tình trạng sung huyết phổi, tim, gan khi mổ và quan sát đại thể các chuột chết.

Ở các chuột chết còn quan sát thấy hiện tượng co giật. Tuy nhiên, hiện tượng co giật này có vẻ không phải do tác dụng kích thích thần kinh trung ương của OS35. Lí do là sau khi uống thuốc, chuột không có tình trạng kích thích mà trái lại nằm im, chậm chạp, ức chế, không đi lại, ăn uống gì. Nghiên cứu của Zhou Qing (1998) và J.Singhuber (2009) cho thấy osthonol có tác dụng ức chế thần kinh trung ương, có thể do cơ chế điều biến trên receptor của chất dẫn truyền thần kinh gamma-aminobutyric (GABA), làm tăng khả năng gắn của GABA vào receptor và làm tăng tác dụng của GABA [63],[64]. Các kết quả này phù hợp với triệu chứng của chuột nhất sau khi uống OS35. Đến nay, chưa tìm thấy có nghiên cứu nào về tác dụng kích thích thần kinh trung ương của osthonol hay quả Xà sàng. Có thể, do tác dụng của osthonol trên kênh calci và GMP vòng, dẫn đến tình trạng giãn mạch toàn thân, trong đó có mạch não, gây ra tình trạng tăng áp lực nội sọ và gây ra triệu chứng co giật trên chuột.

Với những giả thuyết về cơ quan đích và cơ chế gây độc của OS35, khi sử dụng OS35 cho bệnh nhân trên lâm sàng cần chú ý đến những tác dụng không mong muốn gây ra do tình trạng giãn mạch và ức chế thần kinh trung ương.

4.1.2. Xác định độc tính bán trường diễn của OS35 theo đường uống trên chuột cống trắng

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn được thực hiện bằng cách cho động vật thí nghiệm uống thuốc thử hàng ngày liên tục trong một khoảng thời gian nhất định. Thời gian dùng thuốc thử phụ thuộc vào thời gian dùng trên lâm sàng [105],[112].

Nghiên cứu này đánh giá độc tính bán trường diễn của OS35 ở 2 liều tương đương liều dự kiến trên lâm sàng (150 mg/kg) và liều gấp 3 lần (450 mg/kg) trên chuột cống trắng theo đường uống trong 4 tuần. Cũng theo WHO, các chỉ tiêu để đánh giá độc tính bán trường diễn bao gồm: tình trạng chung và thay đổi trọng lượng, các chỉ số huyết học, các chỉ số sinh hoá đánh giá chức năng gan thận và đặc điểm giải phẫu bệnh [105].

4.1.2.1. Tình trạng chung và cân nặng của chuột cống trắng

Trong các nghiên cứu trên động vật thực nghiệm nói chung và nghiên cứu độc tính bán trường diễn nói riêng, tình trạng chung và cân nặng của động vật thực nghiệm là các chỉ số nghiên cứu bắt buộc theo dõi trước khi dùng thuốc và định kỳ trong thời gian dùng thuốc [105].

Kết quả nghiên cứu sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc cho thấy OS35 liều 150 mg/kg và 450 mg/kg trong 4 tuần không ảnh hưởng đến tình trạng chung và cân nặng của chuột. Chuột ở cả 3 lô hoạt động bình thường, ăn uống tốt, nhanh nhẹn, lông mượt, không thấy biểu hiện gì bất thường ở cả 3 lô chuột trong suốt thời gian nghiên cứu. Cân nặng của chuột ở 2 lô dùng OS35 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng trước khi uống thuốc và các thời điểm 2 tuần, 4 tuần sau khi uống thuốc.

4.1.2.2. Ảnh hưởng của OS35 đến chức năng tạo máu

Máu là một thành phần rất quan trọng của cơ thể, các thành phần của máu liên quan mật thiết đến chức năng và hoạt động của các cơ quan, bộ phận

trong cơ thể [105]. Khi có tình trạng bệnh lý xảy ra, có sự ảnh hưởng qua lại lẫn nhau giữa máu và các cơ quan khác trong cơ thể, nhưng đồng thời nó cũng phản ánh tình trạng riêng của máu và cơ quan tạo máu. Nếu thuốc ảnh hưởng đến máu và cơ quan tạo máu thì sẽ kéo theo các thành phần của máu sẽ bị thay đổi. Các chỉ số trong xét nghiệm tế bào máu ngoại vi có giá trị lớn trong việc đánh giá chức năng tạo máu [114]. Vì vậy, các xét nghiệm về số lượng hồng cầu, lượng huyết sắc tố, hematocrit, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu, số lượng tiểu cầu của chuột được tiến hành để nhằm đánh giá sự thay đổi và khả năng ảnh hưởng tới cơ quan tạo máu của thuốc [105].

Huyết sắc tố (hemoglobin) là một protein chứa sắt trong hồng cầu làm nhiệm vụ vận chuyển oxy. Huyết sắc tố làm nhiệm vụ tiếp nhận và vận chuyển oxy từ phổi về các cơ quan. Định lượng huyết sắc tố cho biết chức năng của hồng cầu. Hematocrit là tỷ lệ % thể tích hồng cầu so với máu toàn phần. Các thuốc thử ảnh hưởng đến số lượng hồng cầu hoặc thể tích tuần hoàn có thể làm thay đổi hematocrit. Thể tích trung bình hồng cầu (MCV) là tỉ lệ giữa hematocrit và số lượng hồng cầu [114],[115].

Số lượng bạch cầu là số bạch cầu có trong một đơn vị máu. Công thức bạch cầu là tỉ lệ phần trăm các loại bạch cầu trong máu. Số lượng bạch cầu và công thức bạch cầu có thể bị ảnh hưởng bởi các thuốc thử ảnh hưởng đến cơ quan tạo máu hoặc các tình trạng nhiễm khuẩn, nhiễm trùng, dị ứng, rối loạn miễn dịch... [114],[115].

Số lượng tiểu cầu là số tiểu cầu trong một đơn vị máu. Tiểu cầu có vai trò quan trọng trong quá trình đông máu - cầm máu. Đánh giá số lượng tiểu cầu góp phần đánh giá ảnh hưởng của thuốc thử lên chức năng tạo máu. Ngoài ra, các thuốc thử gây ảnh hưởng đến số lượng tiểu cầu sẽ ảnh hưởng đến quá trình đông máu - cầm máu [114],[115].

Kết quả nghiên cứu cho thấy thuốc thử OS35 liều 150 mg/kg/ngày và 450 mg/kg/ngày không làm ảnh hưởng đến số lượng hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc liên tục so với trước khi uống và so với lô chứng. Kết quả này chưa cho thấy tác động của thuốc thử OS35 với 2 mức liều nghiên cứu trên các chỉ số máu ngoại vi trong xét nghiệm huyết học.

4.1.2.3. Ảnh hưởng của OS35 trên chức năng gan, thận trên chuột cống trắng
*Ảnh hưởng của OS35 trên các chỉ số đánh giá chức năng gan, mức độ hủy hoại tế bào gan và giải phẫu bệnh gan

Nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc đối với chức năng gan rất cần thiết khi nghiên cứu độ an toàn của một thuốc [105].

Một trong những phương pháp đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan là định lượng nồng độ các enzym có nguồn gốc tại gan có trong huyết thanh [114],[115]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi định lượng hoạt độ các enzym ALT và AST trong huyết thanh trên chuột cống trắng thực nghiệm [114],[115]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy hoạt độ ALT và AST trong máu chuột cống trắng ở các lô uống thuốc thử OS35 liều 150mg/kg/ngày và 450mg/kg/ngày tại các thời điểm sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc không tăng so với trước khi uống thuốc và so với lô chứng. Như vậy, có thể nói OS35 chưa ảnh hưởng đến chỉ số đánh giá tình trạng tổn thương tế bào gan chuột cống trắng.

Gan là cơ quan có nhiều chức năng đối với quá trình chuyển hoá các chất, trong đó có chuyển hoá protein, lipid [114],[115]. Tại gan, các acid amin đã được tổng hợp thành albumin, một số globulin, một số yếu tố đông máu. Định lượng albumin trong máu sẽ đánh giá được một phần chức năng chuyển hoá protein của gan [114],[115]. Ngoài chuyển hoá protein, gan còn có chức

năng chuyển hóa lipid. Cholesterol là thành phần lipid có nhân sterol; vì gan là cơ quan chủ yếu duy trì nồng độ cholesterol cả về tổng hợp và bài tiết (theo đường mật) nên có thể dùng xét nghiệm định lượng nồng độ cholesterol trong huyết thanh để đánh giá chức năng chuyển hoá lipid của gan [114],[115]. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ albumin và cholesterol trong huyết thanh chuột cống trắng thực nghiệm ở 2 lô uống thuốc thử OS35 không thay đổi tại các thời điểm sau 2 tuần, sau 4 tuần uống thuốc liên tục so với trước khi uống thuốc và so với lô chứng. Như vậy, OS35 liều 150mg/kg/ngày và 450mg/kg/ngày dùng trên chuột cống trắng theo đường uống trong 4 tuần liên tục chưa làm ảnh hưởng đến chỉ số đánh giá chức năng chuyển hoá protein và lipid của gan.

* Ảnh hưởng của OS35 trên chỉ số đánh giá chức năng lọc của cầu thận

Thận là cơ quan tiết niệu, có vai trò quan trọng bậc nhất để đảm bảo sự hằng định nội môi. Khi đưa thuốc thử vào cơ thể có thể gây tổn thương thận, ảnh hưởng đến chức năng thận. Creatinin là chất chuyển hoá cuối cùng, sản phẩm phân huỷ của creatin phosphat, nồng độ creatinin không phụ thuộc vào chế độ ăn. Khi có tổn thương thận, creatinin tăng sớm hơn và tin cậy hơn ure nên hiện nay đây là một chỉ số thường dùng để đánh giá và theo dõi chức năng thận [114],[115]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sau 2 tuần, 4 tuần uống thuốc thử liên tục, nồng độ creatinin trong huyết thanh chuột cống trắng ở 2 lô trị không thay đổi so với trước khi uống thuốc và so với lô chứng. Như vậy, thuốc thử OS35 liều 150 mg/kg/ngày và 450 mg/kg/ngày chưa ảnh hưởng đến chỉ số đánh giá chức năng lọc của cầu thận .

* Ảnh hưởng của OS35 trên giải phẫu bệnh gan, thận trên chuột cống trắng

Kết quả nghiên cứu hình thái đại thể của gan chuột sau uống thuốc thử OS35 liều 150 mg/kg/ngày và liều 450 mg/kg/ngày trong 4 tuần cho thấy kích thước, màu sắc, mật độ bình thường, không khác biệt so với lô chứng. Nghiên

cứu cấu trúc vi thể gan ở lô 2 lô dùng OS35 cho thấy cấu trúc gan không bị đảo lộn, tĩnh mạch trung tâm tiêu thụ và vùng khoảng cửa không xơ hóa, không xâm nhập viêm, không tăng sinh ống mật, không có sự khác biệt so với lô chứng. Kết quả đại thể và vi thể tương ứng với kết quả nghiên cứu về hoạt độ AST và ALT trong huyết thanh.

Kết quả nghiên cứu hình thái đại thể của thận chuột sau uống thuốc thử OS35 liều 150 mg/kg/ngày và liều 450 mg/kg/ngày trong 4 tuần cũng cho thấy kích thước, màu sắc, mật độ bình thường, không khác biệt so với lô chứng. Nghiên cứu cấu trúc vi thể thận ở 2 lô dùng OS35 quan sát thấy trong mô đệm có các ổ xâm nhập viêm mạn tính (chủ yếu là lympho bào), tăng sinh xơ. Tuy nhiên, các cầu thận có hình thái, cấu trúc trong giới hạn bình thường, không xơ hóa, không tăng sinh tế bào. Đồng thời, xét nghiệm creatinin đánh giá chức năng thận vẫn trong giới hạn bình thường.

* Bàn luận về ảnh hưởng của OS35 trên gan, thận

Cho đến nay, nhóm nghiên cứu chưa tìm thấy nghiên cứu nào khác về độc tính bán trường diễn của dịch chiết trong ethylacetat của quả Xà sàng nói riêng và cây Xà sàng nói chung nên chưa có dữ liệu để so sánh về ảnh hưởng của OS35 trên gan, thận.

Theo kết quả nghiên cứu của các nhà khoa học Trung Quốc và Việt Nam, trong thành phần của quả Xà sàng có các hợp chất furanocoumarin như xanthotoxin, imperatorin... [55],[56],[58]. Wang X. và cs. (2012) khi nghiên cứu về ảnh hưởng của các furanocoumarin (imperatorin, isoimperatorin, xanthotoxin, psoralen và isopsoralen) theo đường uống trên chuột nhắt trắng trong 4 tuần cho thấy các furanocoumarin có biểu hiện độc tính trên gan và thận [116]. Trên gan, furanocoumarin làm tăng nồng độ AST, ALT khi cho chuột nhắt uống liên tục trong 4 tuần [116]. Mặc dù trong nghiên cứu này, OS35 cả 2 liều chưa làm thay đổi các chỉ số đánh giá mức độ hủy hoại tế bào

gan và chức năng gan nhưng vẫn nên chú ý theo dõi các chỉ số đánh giá chức năng gan cho bệnh nhân khi sử dụng trên lâm sàng.

Ngoài ra, furanocoumarin còn được một số nhà khoa học chứng minh có tác dụng ức chế cytochrom P450 (đặc biệt là CYP3A4) [116],[117],[118]. Một loại thực vật có chứa các furanocoumarin và đã được chứng minh có khả năng tương tác với nhiều thuốc, ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị cũng như tính an toàn của thuốc là quả bưởi chùm (grape fruit) [117],[118]. Do đó, khi sử dụng OS35 trên lâm sàng cần chú ý đến khả năng xảy ra tương tác thuốc, đặc biệt các thuốc chuyển hóa qua CYP3A4. Tuy nhiên, để khẳng định điều này cần có các nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng của thuốc thử OS35 trên cytochrom P450.

Theo nghiên cứu của Wang X. và cs, ảnh hưởng trên thận của furanocoumarin chủ yếu là trên các chất vận chuyển ở ống thận như OCT1, OCT2, OCTN2...[116]. Điều này có vẻ phù hợp với kết quả nghiên cứu là chỉ số đánh giá chức năng lọc của cầu thận (creatinin) vẫn nằm trong giới hạn bình thường và cấu trúc cầu thận ở cả 2 lô dùng OS35 đều nằm trong giới hạn bình thường. Mặc dù vậy, kết quả nghiên cứu trên cấu trúc vi thể của thận có gây ra viêm mô đệm mạn tính cũng đặt ra yêu cầu nếu sử dụng OS35 trên lâm sàng cần chú ý theo dõi chặt chẽ tác dụng không mong muốn trên thận, đặc biệt bệnh nhân có bệnh lý ở thận nói chung và viêm thận nói riêng. Hiệp hội Dược liệu của Hoa Kỳ cũng đưa ra thông tin thận trọng khi dùng Xà sàng cho bệnh nhân có tình trạng viêm ở thận và bệnh nhân có tiền sử kích ứng thận [119].

4.2. Đánh giá hoạt tính androgen của OS35 trên chuột cống đực non thiếu

Mô hình đánh giá hoạt tính androgen của thuốc dựa trên việc so sánh khối lượng tương đối các cơ quan sinh dục phụ đã được thực hiện từ những năm 1930. Đến năm 1953, Hershberger đã mô tả mô hình này với một số thay đổi và bổ sung [87]. Hiện nay, mô hình này được xem là mô hình thực

nghiệm có giá trị nhất và được dùng phổ biến để chứng minh hoạt tính androgen của thuốc.

Để sàng lọc hoạt tính androgen, loài động vật thường được dùng là chuột cống hoặc chuột nhắt [87],[88].

Theo OECD, khi tiến hành đánh giá hoạt tính androgen trên nhóm đối tượng chuột nhắt đực thì có hai cơ quan rất khó lấy được là tuyến tiền liệt và đầu dương vật. Tuyến tiền liệt mủn và nhỏ, rất khó bóc tách được trọn vẹn, nếu cố bóc tách sẽ cho sai số rất lớn về kết quả nghiên cứu. Đầu dương vật ở chuột nhắt kích thước nhỏ, không có mốc giải phẫu rõ ràng nên cũng cho sai số khá lớn khi tiến phân lập, bóc tách [87],[88]. Vì vậy, nghiên cứu này chọn sử dụng chuột cống đực trắng.

Nghiệm pháp Hershberger sử dụng chuột cống đực non thiếu theo OECD 441 [87] hoặc chuột cống đực non không thiếu theo OECD 115 [88]. Theo OECD 441, tiến hành thiếu chuột, loại bỏ tinh hoàn tức là loại bỏ được vai trò của testosterone nội sinh và loại bỏ cơ chế feedback của trục vùng dưới đồi – tuyến yên – tinh hoàn ngay từ khi các cơ quan sinh dục phụ chưa phát triển đầy đủ; từ đó làm tăng độ chính xác của nghiệm pháp, đặc biệt khi đánh giá các chất có hoạt tính androgen yếu. Ngoài ra, việc thiếu chuột loại bỏ cơ quan sản xuất testosterone chính của cơ thể, giúp loại bỏ sự khác biệt lớn nồng độ testosterone giữa các chuột với nhau. Vì vậy, làm giảm số lượng chuột để sàng lọc hoạt tính androgen. Theo hướng dẫn OECD 441, số lượng chuột non thiếu cho mỗi lô ít nhất là 6 chuột; trong khi tiến hành trên chuột cống đực trưởng thành hoặc dậy thì, số lượng chuột cho mỗi lô ít nhất là 15 chuột [87].

Sau khi thiếu, chuột không dùng dùng thuốc nghiên cứu ngay mà phải có một khoảng thời gian thích hợp trước khi làm nghiên cứu để các cơ quan đích giảm đến mức thấp nhất và đạt trọng lượng nền ổn định; nồng độ androgen nội sinh trong máu thấp; trục dưới đồi – tuyến yên – tinh hoàn không có khả năng bù trừ thông qua cơ chế feedback; khả năng đáp ứng của mô là cao nhất [87].

Nghiên cứu sử dụng testosterone làm thuốc chứng dương. Theo hướng dẫn của OECD, trên chuột cống đực non thiếu sử dụng testosterone propionat với liều 0,4 mg/kg/ngày tiêm dưới da trong 10 ngày. Kết quả nghiên cứu cho thấy testosterone liều như trên thể hiện rõ hoạt tính androgen trên chuột cống đực non thiếu: tăng rõ rệt trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ (túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper, đầu dương vật, cơ nâng hậu môn – hành hang) và nồng độ testosterone trong máu so với lô chuột thiếu không dùng thuốc.

Về các lô dùng OS35, cơ sở để xác định liều nghiên cứu tác dụng của OS35 như sau:

- Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của OS35 trên chuột nhắt trắng cho thấy triệu chứng độc xuất hiện ở liều từ 1,25 g/kg. LD₅₀ trên chuột nhắt trắng theo đường uống là 4,5 (2,8 - 7,1) g/kg với $p = 0,05$. Liều ban đầu để sàng lọc hoạt tính androgen ở chuột cống đực non thiếu là 50, 150 và 250 mg/kg, ngoại suy liều ở chuột nhắt là 80, 240 và 400 mg/kg, bằng khoảng 1/15, 1/5 và 1/3 liều bắt đầu xuất hiện triệu chứng độc và bằng khoảng 1/56,25, 1/18,75 và 1/11,25 LD₅₀.

- Tham khảo thêm liều dùng của một thực phẩm chức năng lưu hành ở Mỹ với thành phần cao chiết còn của quả Xà sàng (osthol chiếm 35%) với liều dùng 500 mg/lần và 2 lần/ngày.

- Lấy liều dùng quả Xà sàng là 12 g/ngày cho người trưởng thành có cân nặng khoảng 50 kg, tương đương 20 mg/kg/ngày. OS35 là cao chiết còn của quả Xà sàng với hệ số chiết 3%. Như vậy, liều OS35 tương đương là 7,2 mg/kg/ngày ở người. Hệ số ngoại suy liều ở người sang chuột cống là 6 – 8. Vậy, liều tương đương ở chuột cống là 50 mg/kg/ngày. Theo hướng dẫn của OECD, khi sàng lọc hoạt tính androgen, thuốc thử được cho uống trong 10 ngày liên tục và sử dụng ít nhất 2 lô thuốc thử với 2 liều khác nhau [87]. Nhóm

nghiên cứu đánh giá hoạt tính androgen của OS35 ở 3 mức liều: 50 mg/kg/ngày, 150 mg/kg/ngày và 250 mg/kg/ngày, uống trong 10 ngày liên tục.

Các cơ quan nghiên cứu bao gồm túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn - hành hang, đầu dương vật. Đây là các cơ quan có sự phát triển phụ thuộc nhiều vào hoạt động của androgen. Testosteron ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp protein của các cơ quan sinh dục phụ. Ở đây, testosteron biến đổi thành dehydrotestosteron, sau đó dehydrotestosteron sẽ liên kết với các receptor ở màng tế bào đích, từ đây phức hợp này sẽ kích thích hàng loạt các phản ứng tổng hợp protein trong tế bào đích, làm tăng sinh tế bào đích dẫn đến tăng trọng lượng. Theo hướng dẫn của OECD, khi khối lượng của ít nhất hai trong số năm cơ quan trên tăng lên có ý nghĩa thống kê so với các lô chuột không dùng thuốc thì thuốc được coi là có hoạt tính androgen [87].

Kết quả nghiên cứu cho thấy: khi dùng OS35 trong 10 ngày liên tục, liều 50 mg/kg/ngày chỉ làm tăng trọng lượng 1 cơ quan là cơ nâng hậu môn – hành hang, liều 150 mg/kg/ngày làm tăng trọng lượng 2 cơ quan là cơ nâng hậu môn – hành hang và đầu dương vật, còn liều 450 mg/kg/ngày làm tăng trọng lượng làm tăng trọng lượng 3 cơ quan là cơ nâng hậu môn – hành hang, đầu dương vật và tuyến Cowper. Như vậy, liều OS35 liều 50 mg/kg chưa thể hiện hoạt tính androgen, còn liều 150 mg/kg và 450 mg/kg thể hiện hoạt tính androgen trên chuột cống đực non thiến.

Dựa vào kết quả trên, liều OS35 được lựa chọn để tiếp tục sử dụng trên chuột cống cho các nghiên cứu tiếp theo là 150 mg/kg. Trên thực tế hiện nay, ở Mỹ có lưu hành một loại thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị rối loạn sinh dục nam được sản xuất từ quả Xà sàng, trong đó lượng osthol chiếm 35%. Liều dùng khuyến cáo trên người với thực phẩm chức năng này cho bệnh

nhân nam trưởng thành là mỗi ngày dùng 2 viên 500 mg. Nếu ngoại suy liều trên chuột cống cũng tương đương 150 mg/kg/ngày.

Có thể nói, phương pháp nghiên cứu hoạt tính androgen thông qua đánh giá ảnh hưởng trên trọng lượng cơ quan sinh dục phụ ở động vật thực nghiệm là một phương pháp không đòi hỏi kỹ thuật phức tạp nhưng có độ tin cậy cao, nhằm bước đầu sàng lọc tác dụng của thuốc thử, đồng thời giúp định hướng lựa chọn liều dùng cho các nghiên cứu tiếp theo. Ở Việt Nam, một số dược liệu cũng sử dụng phương pháp này để sàng lọc hoạt tính androgen như Nhục thung dung, Ba kích, Bá bệnh. Nghiên cứu của Trần Thanh Tùng và cs. (2009) cho thấy Nhục Thung dung liều 10 g/kg/ngày làm tăng trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ trên chuột cống đực non thiếu [50]. Trần Mỹ Tiên và cs. (2012) cho thấy Ba kích ở liều 50 mg/kg và 100 mg/kg/ngày làm tăng trọng lượng túi tinh, tuyến tiền liệt, cơ nâng hậu môn trên chuột nhắt đực thiếu [52]. Dương Thị Ly Hương và cs. (2012) cho thấy dịch chiết Bá bệnh liều 10 g/kg/ngày ở chuột nhắt đực và 6 g/kg/ngày ở chuột cống đực non thiếu làm tăng trọng lượng túi tinh, tuyến Cowper và cơ nâng hậu môn – hành hang [5].

Một chỉ số nghiên cứu nữa được OECD khuyến khích thực hiện trong nghiên cứu hoạt tính androgen là nồng độ testosterone trong máu chuột [87],[88]. Kết quả nghiên cứu cho thấy lô chuột đực bổ sung testosterone ngoại lai, nồng độ testosterone trong máu tăng cao rõ rệt so với lô chuột thiếu không dùng thuốc. Còn lô chuột dùng thuốc thử OS35 liều 50 mg/kg/ngày không làm thay đổi nồng độ testosterone trong máu chuột. Trong khi, OS35 liều 150 mg/kg/ngày và 250 mg/kg/ngày có tác dụng làm tăng nồng độ testosterone có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả đánh giá tác dụng của OS35 các liều trên trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ đã đề cập đến ở trên và phù hợp với kết quả của Yuan J. (2004) cho thấy osthonol làm tăng nồng độ testosterone trong máu trên chuột cống đực thiếu [8].

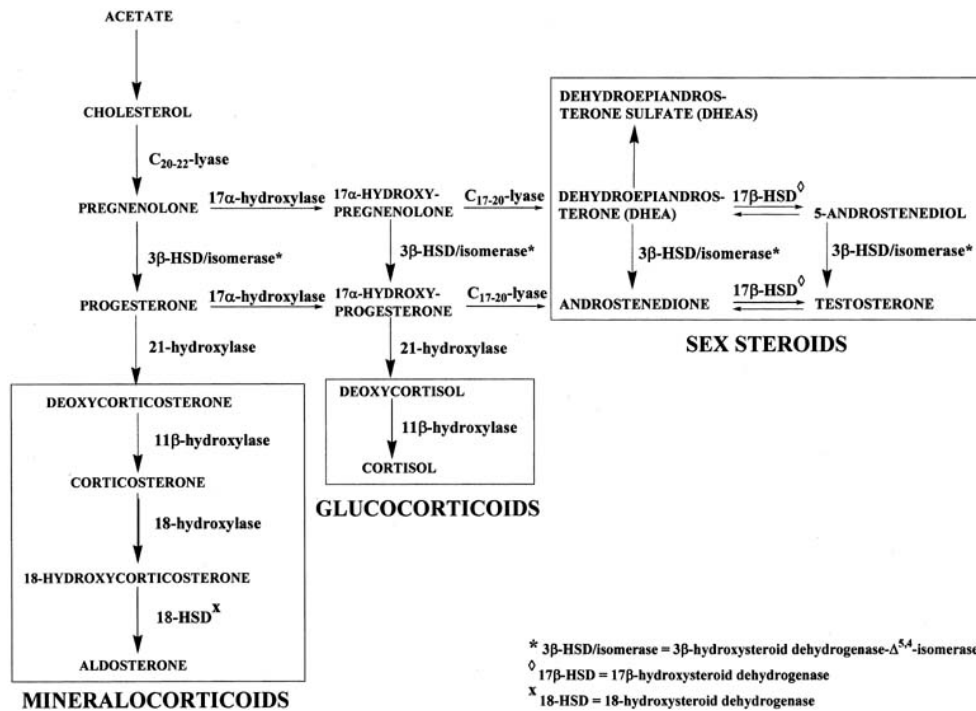
Một thuốc thử làm tăng testosterone trong máu có thể do một trong ba cơ chế sau: (1) thuốc thử có tác dụng kích thích tinh hoàn tổng hợp và bài tiết testosterone; (2) bản thân thuốc thử đóng vai trò là một testosterone ngoại lai, làm nồng độ testosterone tăng trong máu; (3) thuốc thử tác động vào con đường tổng hợp testosterone “ngoài tinh hoàn”, từ cholesterol chủ yếu là ở tuyến thượng thận.

Thuốc thử OS35 làm tăng testosterone trong máu chuột theo cơ chế nào? Với cơ chế thứ nhất, mặc dù nghiên cứu của Yuan J. (2004) cho thấy osthol làm tăng giải phóng FSH, LH nhưng nghiên cứu của chúng tôi được tiến hành trên chuột đực thiên, tức là cắt bỏ tinh hoàn 2 bên, do đó, không chứng minh được liệu OS35 có kích thích tinh hoàn sản xuất ra testosterone hay không.

Với cơ chế thứ hai, liệu bản thân OS35 có phải là một testosterone ngoại lai hay không? Các nhà khoa học đã tìm ra một sterol trong dịch chiết ethylacetat của quả Xà sàng là daucosterol [58]. Đây là một hợp chất giống sterol có nguồn gốc tự nhiên. Do đó, chưa loại trừ được khả năng làm tăng testosterone của OS35 có phải do cơ chế thứ 2 này hay không.

Với cơ chế thứ ba, liệu OS35 có làm tăng tổng hợp testosterone ở tuyến thượng thận. Trên chuột đực thiên, sự tổng hợp testosterone chủ yếu diễn ra theo con đường thượng thận.

Hình 4.1. mô tả các con đường sinh tổng hợp hormon steroid, bao gồm mineralcorticoid, glucocorticoid và các androgen, ở tuyến thượng thận.



Hình 4.1. Sinh tổng hợp mineralcorticoid, glucocorticoid và testosteron ở tuyến thượng thận [120]

ACTH kích thích sản xuất các hormon steroid từ vỏ thượng thận. ACTH gắn vào các receptor ở bề mặt tế bào, kích thích adenyl cyclase, dẫn đến tăng AMP vòng nội bào và hoạt hóa protein kinase A. ACTH nhanh chóng kích thích sự vận chuyển cholesterol tới ti thể là nơi chứa CYP450 scc (side chain cleavage enzyme) hay chính là CYP11A. Dưới sự tác động của CYP450 scc trong ti thể của tế bào, chuỗi bên của cholesterol sẽ được tách ra và tạo thành pregnenolon [121]. Androgen của vỏ thượng thận được tổng hợp khởi đầu là tác dụng của CYP450 C17, với sự hoạt hóa của enzym này các thành phần pregnenolon và progesteron được hydroxyl hóa ở vị trí 17 α . Tại ty thể của tế bào dưới tác dụng của enzym 17,20 demolase chuỗi bên có 2 nguyên tử carbon ở vị trí 17 sẽ bị tách ra khỏi thành phần của 17-hydroxy-pregnenolon để tạo thành DHEA có chứa nhóm ceto ở vị trí C17. Tiếp theo dưới tác dụng của enzym sulfokinase của thượng thận thì DHEA được chuyển

thành DHEA sulfat, đây là một quá trình thuận nghịch. Enzym 17,20 demolase cũng có tác dụng chuyển đổi từ 17-hydroxyprogesteron thành androstenedion, còn lại một phần nhỏ androstenedion được thành lập từ DHEA [16]. Androstenediol và androstenedion là hai tiền chất quan trọng tạo ra testosterone ở tuyến thượng thận.

Một số nghiên cứu chỉ ra các furanocoumarin có tác dụng ức chế cytochrom P450 (đặc biệt là CYP3A4) [116],[117],[118]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào chứng minh khả năng ức chế của chúng trên CYP450 scc và CYP450 C17 hay các enzym tham gia quá trình tổng hợp nên các androgen.

Như vậy, OS35 liều 150 mg/kg và 250 mg/kg/ngày uống trong 10 ngày có hoạt tính androgen trên chuột cống đực non thiếu. Tuy nhiên, cần thực hiện các nghiên cứu sâu hơn để khẳng định được cơ chế tác dụng của OS35 làm tăng nồng độ testosterone trong máu.

4.3. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chức năng cương dương

4.3.1. Đánh giá tác dụng của OS35 trên khả năng cương dương ở thỏ đực trưởng thành

Theo kinh nghiệm dân gian, quả Xà sàng được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân liệt dương, theo thuật ngữ y học hiện đại hiện nay là rối loạn chức năng cương. Các mô hình thực nghiệm đánh giá tác dụng của một thuốc trên khả năng cương đã được xây dựng và phát triển từ nhiều năm nay, bao gồm các nghiên cứu trên động vật tinh, trên động vật gây mê và các nghiên cứu *in vitro*.

Mặc dù hiện nay các nghiên cứu trên động vật gây mê đã được phát triển và có vai trò quan trọng trong đánh giá các biện pháp điều trị rối loạn cương, các nghiên cứu này đòi hỏi kỹ thuật phức tạp (gây mê, phẫu thuật, kích thích điện dây thần kinh hang...), nhiều máy móc, thiết bị giá thành cao, không phù hợp để sàng lọc tác dụng của một thuốc thử trong điều kiện nước

ta hiện nay. Do đó, để sàng lọc tác dụng và liều dùng của thuốc thử trên chức năng cương, không nên tiến hành trên động vật gây mê, mà nên thực hiện trên động vật tỉnh như trên thỏ hoặc chuột cống [78],[81].

Mô hình đánh giá chức năng cương trên thỏ là một mô hình rất phù hợp với mục đích sàng lọc vì những lí do sau đây:

- Thỏ là động vật thực nghiệm được sử dụng khá phổ biến để đánh giá chức năng cương vì các nhà khoa học đã chứng minh được sự tương đồng giữa quá trình co/giãn cơ tron thể hang ở thỏ và ở người [79],[123].

- Phương pháp nghiên cứu đơn giản, hợp sinh lý, không xâm lấn, không cần phẫu thuật, không cần gây mê. Thậm chí, có thể thực hiện được nhiều lần trên cùng 1 thỏ với thời gian wash-out thích hợp, nên trong một số trường hợp có thể thiết kế nghiên cứu bắt chéo (cross-over) [79].

- Có thể đánh giá được liều dùng, thời gian tác dụng và tương tác với các thuốc khác trên mô hình này [79].

- Mô hình trên thỏ tỉnh đã được sử dụng để đánh giá tác dụng gây cương của một số nhóm thuốc theo nhiều cơ chế khác nhau như thuốc ức chế PDEV (sildenafil, vardenafil), thuốc ức chế PDE III (milrinon), thuốc chẹn α -adrenergic (phentolamin) [79].

- Mô hình trên thỏ tỉnh không đòi hỏi có kích thích tình dục hoặc kích thích trực tiếp để gây cương như các mô hình trên chuột cống tỉnh cần có kích thích bằng cách sử dụng con cái động dục, apomorphin hoặc vòng kim loại lồng vào dương vật [79]. Do đó, có thể đánh giá được cả những thuốc thử có khả năng tự gây cương dương, kể cả khi không có kích thích tình dục.

Vì những lí do đó, nghiên cứu này sử dụng test cương trên thỏ tỉnh để sàng lọc tác dụng và liều dùng của thuốc thử OS35 trên chức năng cương.

4.3.1.1. Lô thỏ dùng sildenafil

Thuốc chứng dương được sử dụng là sildenafil, thuốc ức chế PDEV đầu tiên và hiện nay được dùng phổ biến để điều trị rối loạn cương.

Ở trạng thái bình thường, không quan sát thấy dương vật của thỏ. Chỉ khi có hiện tượng cương, dương vật của thỏ mới lộ ra khỏi bao che phủ bên ngoài [79],[80]. Khi đó, nghiên cứu viên mới quan sát thấy. Để tránh tình trạng dùng thước đo trực tiếp có thể chạm vào dương vật của thỏ, ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu, hình ảnh dương vật thỏ ở các thời điểm được chụp ảnh lại. Sau đó, dùng phần mềm Image J đo chiều dài dương vật. Kết quả nghiên cứu cho thấy; lô thỏ dùng thuốc thử OS35 có hiện tượng cương dương tại các thời điểm nghiên cứu từ 5 phút sau khi dùng thuốc. Chiều dài dương vật đo được và thời gian duy trì cương dương quan sát được không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô dùng sildenafil ($p > 0,05$)

Sildenafil được cấp phép đầu tiên ở Mỹ năm 1998 với cơ chế tác dụng là ức chế PDEV, làm ức chế giáng hóa AMP vòng, tăng hiệu quả của con đường NO/GMP vòng [35],[36].

PDEV là isoenzym có chủ yếu ở cơ trơn thể hang, làm nhiệm vụ thủy phân GMP vòng thành GMP. Sildenafil ức chế PDEV làm tăng nồng độ GMP vòng nội bào, gây giãn cơ trơn và cương dương [35],[36].

Cơ chế tác dụng đã được khẳng định của sildenafil là ức chế PDEV, do đó, trước đây các nhà khoa học cho rằng khi không có kích thích tình dục, sildenafil không gây giãn cơ trơn thể hang và không gây cương. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu quan sát thấy sildenafil còn có thể gây giãn cơ trơn thể hang khi không có kích thích tình dục hoặc NO ngoại sinh, tức là không phụ thuộc vào con đường NO/GMP vòng [126],[127].

Khi đánh giá tác dụng của sildenafil *in vitro* trên thể hang cô lập, sildenafil gây giãn cơ trơn thể hang khi không có NO. Ngay cả khi có mặt L-

NAME (L- nitro arginin ester, một chất ức chế nNOS, eNOS dẫn đến ức chế tổng hợp NO) hoặc OEQ (oxadiazolo quinoxalin, một chất ức chế guanyl cyclase) khả năng gây giãn cơ trơn thể hang của sildenafil không thay đổi [127].

Khi đánh giá tác dụng của sildenafil *in vivo* trên thỏ gây mê, sildenafil tiêm trực tiếp vào thể hang làm tăng ICP khi không có kích thích điện vào dây thần kinh hang và cả khi thỏ đã được tiêm L-NAME trước khi tiêm sildenafil [127].

Các kết quả này đưa đến một nhận định khoa học mới là sildenafil có khả năng gây giãn cơ trơn thể hang theo một cơ chế khác không phụ thuộc vào con đường NO/GMP vòng, ngoài cơ chế đã được biết rõ là ức chế enzym PDEV. Giả thuyết về cơ chế tác dụng của sildenafil không phụ thuộc vào con đường NO/GMP vòng giúp giải thích cho khả năng gây cương khi dùng sildenafil trên thỏ mà không cần có kích thích tình dục.

Cho đến nay, các nhà khoa học đã đưa ra một số giả thuyết để giải thích cho nhận định này. Khi ử cơ trơn thể hang cô lập với sildenafil, lượng GMP vòng trong thể hang tăng gấp 2 lần [127]. Vậy sildenafil gây ra tình trạng tích lũy GMP vòng ở thể hang; tác dụng này không phụ thuộc guanyl cyclase. Một số nhà khoa học cho rằng sildenafil có cấu trúc gần giống GMP vòng nên có thể tương tác với như GMP vòng với các protein (ngoại trừ PDEV) điều hòa GMP vòng như protein kinase G [127]. Một số nhà khoa học lại cho rằng khi GMP vòng tăng lên có thể ức chế PDE3, dẫn đến tích lũy AMP vòng và gây ra giãn cơ trơn [126],[127] Tóm lại, cho đến nay, con đường độc lập NO/GMP vòng gây giãn cơ trơn thể hang của sildenafil chưa được làm rõ và cần nhiều nghiên cứu để khẳng định cơ chế này.

4.3.1.2. Lô thỏ dùng thuốc thử OS35 liều 60 mg/kg

Liều OS35 được nghiên cứu trên thỏ là 60 mg/kg (ngoại suy từ liều 150 mg/kg trên chuột cống trắng).

Ở lô thử dùng thuốc thử OS35, kết quả cho thấy OS35 cũng gây ra tình trạng cương trên thử tương tự sildenafil. Hợp chất đã được chứng minh có tác dụng gây cương dương trong quả Xà sàng là osthol [7]. Trong thuốc thử OS35, osthol chiếm tỉ lệ 35%.

James Chen và cs. (2000) đánh giá tác dụng của osthol trên cơ trơn thể hang cô lập của thử. Kết quả cho thấy osthol có tác dụng gây giãn cơ trơn thể hang. TTX (tetrodotoxin), một chất phong bế thần kinh, không làm thay đổi sự giãn cơ trơn thể hang của osthol, vậy tác dụng của osthol không liên quan đến thần kinh mà thông qua cơ chế nội mạc mạch máu. Cơ chế tác dụng chính của osthol làm giãn cơ trơn thể hang thông qua tăng giải phóng NO từ nội mạc mạch máu. Để khẳng định điều này, các nhà nghiên cứu đã loại bỏ nội mạc mạch máu ở thể hang, kết quả cho thấy khả năng gây giãn cơ trơn thể hang của osthol bị giảm đáng kể. Kết quả tương tự cũng quan sát được khi có mặt L-NAME (chất ức chế NOS) hoặc ODQ (chất ức chế guanyl cyclase). Như vậy, chức năng nội mạc có liên quan chặt chẽ đến tác dụng của osthol [7].

Tuy nhiên, các nhà khoa học cũng nhận thấy việc loại bỏ nội mạc thể hang và sự có mặt của L-NAME hay ODQ mặc dù làm giảm đáng kể khả năng gây giãn cơ trơn thể hang của osthol nhưng không mất đi hoàn toàn mà vẫn còn một phần tác dụng. Ngoài ra, với sự có mặt của forskolin (chất hoạt hóa adenyl cyclase), tác dụng giãn cơ trơn thể hang của osthol tăng lên so với khi không có forskolin [7]. Điều này cho thấy, cơ chế tác dụng của osthol không chỉ bằng con đường NO từ nội mạc mạch máu mà còn có cả cơ chế tác dụng trực tiếp trên cơ trơn thể hang. Như vậy, thuốc thử OS35 có biểu hiện tác dụng gây cương trên thử đực. Cơ chế gây cương có thể là do tác dụng làm giãn cơ trơn thể hang của osthol thông qua tăng giải phóng NO từ nội mạc, ức chế không chọn lọc PDE, làm giảm tốc độ giáng hóa GMP vòng, AMP vòng và làm tăng tổng hợp AMP vòng nội bào [7].

4.3.2. Đánh giá tác dụng của OS35 trên áp lực thể hang (ICP) trên chuột công đực trưởng thành

Mặc dù các test cương trên động vật tỉnh (bao gồm cả test cương trên thỏ được sử dụng để sàng lọc trong nghiên cứu này) khá đơn giản, không xâm lấn, nhưng hạn chế của test này là kết quả chịu ảnh hưởng nhiều bởi ngoại cảnh và chủ quan của người quan sát, không cung cấp được thông tin về chất lượng của sự cương dương (áp lực thể hang) cũng như những thay đổi về huyết động liên quan đến đáp ứng cương [76],[82]. Vì thế, việc tiếp tục nghiên cứu tác dụng của thuốc thử trên áp lực thể hang là quan trọng và cần thiết. Phương pháp đo áp lực thể hang có thể thực hiện trên động vật gây mê hoặc trên động vật tỉnh. Trong điều kiện Việt Nam hiện nay, chưa thực hiện được đánh giá ICP trên động vật tỉnh bằng bộ cảm biến từ xa. Do đó, nghiên cứu này tiến hành đo ICP trên chuột công đực gây mê.

Nguyên tắc của phương pháp này cho phép đánh giá khả năng cương dương sau thời gian dùng thuốc thử dựa trên ICP đo được sau khi kích thích điện dây thần kinh hang. Mô hình này có thể đánh giá thuốc thử theo đường toàn thân (tiêm, uống) hoặc tại chỗ (tiêm vào thể hang) trên động vật thực nghiệm bình thường cũng như bệnh lý (như đái tháo đường, tăng huyết áp) [76],[82].

4.3.2.1. Thay đổi ICP trước khi kích thích điện dây thần kinh hang

Ở trạng thái bình thường, sự cân bằng giữa các chất dẫn truyền thần kinh từ dây thần kinh giao cảm và phó giao cảm duy trì trương lực cơ trơn thể hang. Khi không có kích thích tình dục, vẫn có một lượng nhỏ NO được giải phóng ra từ NANC và nội mô mạch máu, khi đó, lượng GMP vòng thấp. Hệ giao cảm chiếm ưu thế hơn so với hệ phó giao cảm để duy trì dương vật ở trạng thái bình thường với giá trị ICP nền (basal ICP).

Ở các thời điểm nghiên cứu (trước khi uống thuốc, 15 phút, 30 phút và 45 phút sau khi uống thuốc, ICP nền (hay giá trị ICP trước khi kích thích điện dây thần kinh hang) được ghi lại.

Lô chuột dùng sildenafil, ở thời điểm sau uống thuốc 15 phút, 30 phút và 45 phút, giá trị ICP nền (khi chưa có kích thích điện dây thần kinh hang) tăng nhẹ so với thời điểm trước khi uống thuốc. Iain và cs (2001) đánh giá tác dụng của sildenafil *in vivo* trên thỏ gây mê, tiêm trực tiếp sildenafil vào thể hang làm tăng ICP khi không có kích thích điện vào dây thần kinh hang và cả khi thỏ đã được tiêm L-NAME trước khi tiêm sildenafil [127].

Seong Choi và cs. (2002) cũng cho ra kết quả tương tự khi đánh giá ảnh hưởng của vardenafil và sildenafil trên ICP ở chuột cống [128]. Tác dụng làm tăng ICP nền khi chưa có kích thích tình dục này của sildenafil chỉ có thể giải thích được bằng nhận định của các nhà khoa học rằng bên cạnh cơ chế ức chế PDEV đã được chứng minh từ lâu, sildenafil còn có khả năng gây giãn cơ trơn thể hang theo cơ chế không phụ thuộc vào con đường NO/GMP vòng [126],[127].

Lô chuột dùng thuốc thử OS35, ở thời điểm sau uống thuốc 30 phút và 45 phút, giá trị ICP nền cũng tăng nhẹ so với khi chưa uống thuốc. Theo nghiên cứu của James Chen (2000), tác dụng gây giãn cơ trơn thể hang của osthol khi có mặt L-NAME hoặc trên thể hang loại bỏ lớp nội mạc tuy có giảm đi đáng kể, nhưng vẫn còn chứ không mất đi hoàn toàn [7]. Như vậy, ngoài cơ chế chính là tăng giải phóng NO từ nội mạc và tăng GMP vòng ở cơ trơn thể hang, osthol còn có thể tác động gây giãn trực tiếp cơ trơn thể hang theo cơ chế khác. Do đó, thuốc thử OS35 (chứa 35% osthol) có khả năng làm tăng nhẹ ICP nền so với khi chưa dùng thuốc.

Kết quả làm tăng ICP nền (khi chưa kích thích điện dây thần kinh hang) thu được từ nghiên cứu này phù hợp với tác dụng gây cương dương khi nghiên cứu trên thỏ tỉnh đã nói đến ở trên.

4.3.2.2. Thay đổi ICP sau khi kích thích điện dây thần kinh hang

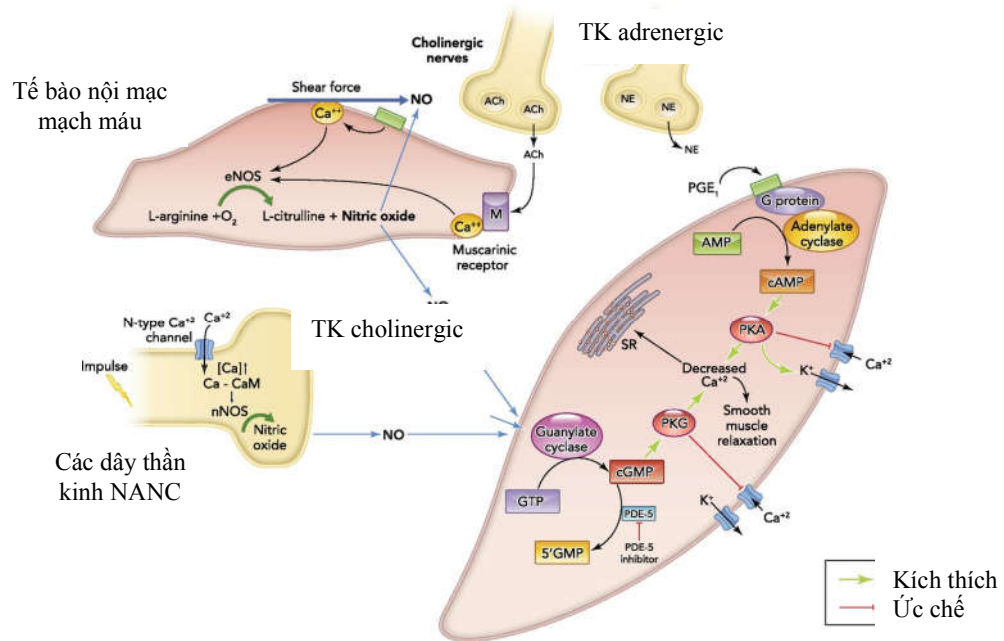
Thần kinh hang sẽ được kích thích điện bằng một bộ phận kích thích theo nhịp nối với điện cực lưỡng cực. Dòng điện kích thích dây thần kinh hang có cường độ 5 V, tần số 20 Hz, độ rộng xung 2 ms. Thời gian mỗi lần kích thích là 1 phút [76].

Ở trạng thái bình thường, khi chưa dùng thuốc thử, sau khi kích thích điện dây thần kinh hang, giá trị ICP cực đại (ICP max) của chuột tăng lên gần 2 lần so với ICP nền (lô 1 tăng từ $19,70 \pm 1,36$ (mmHg) lên $37,89 \pm 6,78$ (mmHg); chuột lô 2 tăng từ $23,63 \pm 1,54$ lên $43,14 \pm 4,10$ (mmHg)).

Cơ chế gây cương dương do kích thích điện được giải thích như sau: NO là một tín hiệu sinh lý cần thiết cho sự cương dương. Cả hai dạng biểu hiện nNOS và eNOS đều liên quan đến cương dương, nNOS khởi đầu cho sự giãn thể hang, trong khi eNOS làm dễ đạt được và duy trì sự cương dương đầy đủ. Sự kích thích điện thần kinh thể hang ở loài gặm nhấm gây nên sự tăng nhanh eNOS để đạt được sự cương dương sinh lý [83]. Kích thích thần kinh thể hang bằng điện gây ra sự tăng lâu bền ICP ngay cả sau khi đã ngừng kích thích [83].

Cơ chế gây cương dương do kích thích điện thần kinh hang tương tự khi có kích thích tình dục, NOS được hoạt hóa ở đầu tận cùng các dây thần kinh NANC (nonadrenergic, noncholinergic) và ở nội mạc mạch máu góp phần sản xuất NO và citrulin từ L-arginin. NO phân phối vào tế bào cơ trơn thể hang và gắn với guanyl cyclase, xúc tác chuyển guanin triphosphat thành GMP vòng. GMP vòng hoạt hóa protein kinase G, làm giảm nồng độ calci nội bào thông qua kênh kali hoạt hóa calci và bơm calci. Do con đường NO/GMP

vòng là con đường điều hòa chủ yếu với chức năng cương dương, bất kỳ tác nhân nào ức chế thủy phân hoặc tăng tổng hợp GMP vòng đều có thể được sử dụng để điều trị rối loạn cương [124],[125].



Hình 4.2. Cơ chế phân tử sự giãn cơ trơn dương vật [125]

Những tác nhân dược lý có khả năng làm tăng dòng máu thể hang đều có thể làm tăng sự cương dương. Các thuốc nghiên cứu có tác dụng tăng cường sự cương dương khi làm tăng giá trị ICP cực đại sau khi dùng thuốc thử so với khi không dùng thuốc.

Lô chuột dùng sildenafil có ICP cực đại ở các thời điểm sau khi uống thuốc tăng rõ rệt so với khi ICP cực đại khi chưa uống thuốc ($p < 0,01$) và tăng rõ rệt so với ICP nền tại cùng thời điểm khi chưa kích thích điện dây thần kinh hang ($p < 0,01$).

Điều này có thể dễ dàng giải thích vì cơ chế tác dụng của sildenafil là ức chế đặc hiệu enzym PDEV, enzym giáng hóa GMP vòng, dẫn đến ức chế quá trình thủy phân GMP vòng thành 5'-GMP. Kết quả dẫn đến tích lũy GMP vòng trong cơ trơn thể hang, từ đó, tăng khả năng giãn cơ trơn thể hang, tăng

ICP cực đại so với khi chưa dùng thuốc và so với giá trị ICP nền khi chưa kích thích thần kinh hang. Bên cạnh đó, cũng do sự tích lũy GMP vòng gây ra bởi sildenafil, thời gian đáp ứng với kích thích thần kinh hang ở lô chuột dùng sildenafil tại các thời điểm 15 phút ($157,26 \pm 22,28$ giây), 30 phút ($179,74 \pm 24,32$ giây) và 45 phút ($124,23 \pm 19,52$ giây) sau khi dùng thuốc đều kéo dài hơn rõ rệt so với khi chưa dùng thuốc ($90,81 \pm 21,41$ giây) ($p < 0,05$).

Lô chuột dùng OS35 cũng có ICP cực đại (sau khi kích thích điện) tăng rõ rệt so với ICP nền (khi chưa kích thích điện) tại cùng thời điểm sau khi uống thuốc thử và so với ICP cực đại khi chưa uống thuốc thử ($p < 0,01$). Thời gian đáp ứng với kích thích điện ở lô dùng OS35 cũng kéo dài có ý nghĩa thống kê so với trước khi uống thuốc ở thời điểm sau uống thuốc 30 phút và 45 phút ($p < 0,05$).

Như đã trình bày ở trên, kết quả nghiên cứu của James Chen và cs. (2000) cho thấy osthol có tác dụng làm tăng giải phóng NO từ nội mạc mạch máu ở thể hang [7]. Do đó, làm tăng cường tác dụng khi kích thích điện dây thần kinh hang. Ngoài ra, osthol còn ức chế không đặc hiệu PDE, làm tăng lượng GMP vòng, AMP vòng; hoạt hóa adenyl cyclase làm tăng tổng hợp AMP vòng. Các cơ chế này dẫn đến tăng giãn cơ trơn thể hang, tăng ICP và kéo dài thời gian đáp ứng với kích thích điện của thể hang [7].

4.3.2.3. Thay đổi huyết áp động mạch trung bình và tỉ số ICP max/ MAP

Một trong những tác dụng không mong muốn của các thuốc tác dụng tăng giải phóng NO hoặc tăng GMP vòng, AMP vòng là gây tình trạng hạ huyết áp. Do đó, bên cạnh việc đánh giá ảnh hưởng của sildenafil và OS35 trên giá trị ICP, nhóm nghiên cứu còn đánh giá ảnh hưởng của các thuốc thử này trên huyết áp động mạch trung bình và chỉ số ICP max/ MAP.

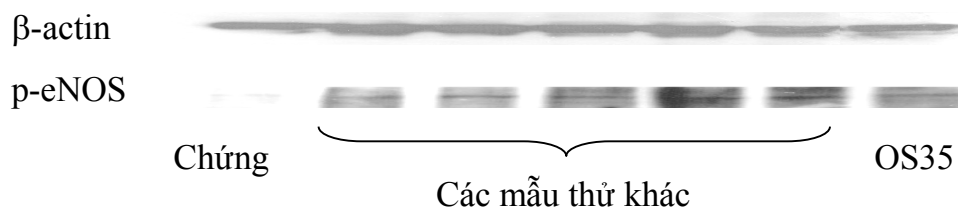
Kết quả nghiên cứu cho thấy huyết áp động mạch trung bình ở các thời điểm sau khi uống sildenafil và OS35 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với khi chưa uống thuốc ($p > 0,05$); trong khi giá trị ICP cực đại ở

tăng rõ rệt so với khi chưa uống thuốc ($p < 0,01$). Do đó, tỉ số ICP max/ MAP ở các lô dùng sildenafil và OS35 tăng rõ rệt ở các thời điểm sau khi uống thuốc so với khi chưa uống thuốc ($p < 0,01$).

Như vậy, với sildenafil liều 10 mg/kg và OS35 liều 150 mg/kg có tác dụng làm tăng khả năng cương dương, thể hiện làm tăng ICP cực đại sau khi kích thích điện thần kinh hang, nhưng chưa làm ảnh hưởng đến huyết áp động mạch.

Trong một thử nghiệm *in vitro* (chưa công bố), nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã tiến hành sàng lọc tác dụng của một số mẫu thử (trong đó có OS35) lên khả năng hoạt hóa eNOS trên tế bào ECV304 (tế bào lấy từ nội mạc tĩnh mạch rốn ở người). eNOS được hoạt hóa khi phosphoryl hóa phân tử serin 1177 (ser1177) tạo thành phospho-eNOS, gọi tắt là p-eNOS. Tác dụng của các mẫu thử được đánh giá dựa trên mức độ biểu hiện p-eNOS ở tế bào ECV304 sau khi đã được ủ với các mẫu thử tương ứng bằng kỹ thuật Western Blot. Quy trình nghiên cứu gồm 4 bước: nuôi cấy tế bào và ủ với mẫu thử; thu tế bào và chuẩn bị protein để điện di; điện di protein trên gel polyacrylamid, phát hiện protein, nhận biết p-eNOS (sử dụng kháng thể kháng p-eNOS); sử dụng β -actin làm đối chứng. Mức độ biểu hiện của p-eNOS hoặc β -actin dựa vào mật độ ánh sáng thu được tương ứng với các “dải protein” này trên phim X-quang.

Hình ảnh phân tích Western blot được thể hiện ở hình 4.3.



Hình 4.3. Hình ảnh mức độ biểu hiện của p-eNOS

Số lần tăng biểu hiện p-eNOS so với lô chứng của OS35 là 1,86 lần. Như vậy, có thể thấy OS35 có tác dụng làm tăng khả năng hoạt hóa eNOS. Do đó, làm tăng khả năng tổng hợp NO trên tế bào nội mạc mạch máu. Năm

2013, Li và cs cũng khẳng định osthonol có tác dụng tăng cường biểu hiện eNOS và sự hoạt hóa của eNOS thông qua sự phosphoryl hóa Ser-1177, kích thích giải phóng NO ở nội mô động mạch phổi.

Như vậy, khi dùng OS35 có thể dẫn đến tình trạng giãn mạch, hạ huyết áp. Trong nghiên cứu này, với liều dùng 150 mg/kg/ngày ở chuột cống trắng, OS35 chưa làm ảnh hưởng đến huyết áp ở chuột. Tuy nhiên, trong nghiên cứu độc tính cấp, khi dùng liều cao hơn nhiều lần trên chuột nhắt trắng, có hiện tượng giãn mạch rõ rệt. Vì vậy, khi sử dụng OS35 trên lâm sàng cần chú ý đến những tác dụng không mong muốn của OS35 do giãn mạch, đặc biệt là khả năng gây hạ huyết áp.

Ngoài ra, với kết quả sàng lọc này, nhóm nghiên cứu cũng định hướng cơ chế tác dụng cường dương của OS35 là do tăng khả năng hoạt hóa eNOS. Tuy nhiên, để khẳng định cơ chế này cần tiến hành thêm các nghiên cứu về tác dụng của OS35 trên eNOS ở thể tạng với các nồng độ mẫu thử khác nhau.

4.4. Đánh giá tác dụng của OS35 trên hành vi tình dục trên chuột cống đực trưởng thành

Đối với các thuốc có nguồn gốc dược liệu, hai mô hình thực nghiệm hay được áp dụng nhất để đánh giá tác dụng của thuốc trên hoạt động tình dục là nghiên cứu trên hành vi tình dục và chức năng cường dương.

Hoạt động tình dục có vai trò quan trọng trong đời sống của mỗi con người. Khi nghiên cứu về các mô hình trên động vật thực nghiệm về suy giảm sinh dục nam, chuột cống đực được coi là động vật thực nghiệm “lí tưởng” với nhiều dữ liệu nghiên cứu về hành vi tình dục và nghiên cứu dược lý. Nhiều nhà nghiên cứu cho rằng nghiên cứu hành vi tình dục ở chuột cống có nhiều giá trị để liên hệ đến người. Nguyên tắc của test hành vi tình dục là cho chuột đực đã có kinh nghiệm tình dục giao phối với chuột cái. Quan sát và ghi lại các hành vi giao phối, so sánh giữa các lô với nhau [77],[78].

Nghiên cứu tác dụng của thuốc trên hành vi tình dục là một mô hình tổng hợp, không chỉ giúp phát hiện được các thuốc có tác dụng tăng cường chức năng sinh dục, mà còn định hướng được cơ chế tác dụng của thuốc. Dựa vào sự thay đổi các chỉ số nghiên cứu, đặc biệt là ML, IF, EL hay PEI mà có các hướng nghiên cứu tiếp theo phù hợp. Mô hình này không yêu cầu máy móc kỹ thuật phức tạp, có thể tiến hành được ở điều kiện nước ta.

Nghiên cứu hành vi tình dục sử dụng chuột đực trưởng thành vì chuột đực chỉ hoàn thành hành vi giao cấu khi có sự bình thường của trục dưới đồi-tuyến yên- tuyến sinh dục. Trước khi đưa vào nghiên cứu tác dụng của thuốc, chuột phải trải qua 3 đợt tập luyện (để làm quen với test hành vi và khởi động phản xạ tình dục) và 4 đợt sàng lọc. Từ kết quả của 4 đợt sàng lọc này, chuột được đánh giá khả năng hoạt động tình dục của mỗi chuột và phân loại thành những chuột đạt và không đạt. Những chuột đạt là những chuột hoàn thành cả 4 đợt sàng lọc. Những chuột không đạt là những chuột không hoàn thành từ ít nhất 1 đợt trở lên đều được coi là có hoạt động tình dục kém và đưa vào đánh giá tác dụng của thuốc nghiên cứu [77].

Hành vi tình dục của chuột gồm 3 hoạt động chính là ***nhảy (tiếp cận), thâm nhập và xuất tinh***.

4.4.1. Ảnh hưởng trên hoạt động nhảy (mounting)

Hoạt động nhảy phản ánh sự hoạt hóa tình dục hay sự thức tỉnh tình dục, gắn liền với khái niệm ham muốn tình dục (libido) ở người. Thông số đánh giá hoạt động nhảy là tỉ lệ chuột nhảy, số lần nhảy (MF) và ML (thời gian nhảy). Trong số đó, ML là chỉ số quan trọng đánh giá ham muốn tình dục [77],[78].

Ham muốn tình dục là nhu cầu của cơ thể với hoạt động tình dục và thường biểu hiện bằng hoạt động tìm kiếm tình dục. Ham muốn tình dục chịu sự chi phối, điều hòa của nhiều yếu tố bao gồm hormon, thần kinh, tâm thần;

trong đó có một yếu tố rất quan trọng là testosterone [1],[2],[3]. Kết quả nghiên cứu cho thấy sildenafil và thuốc thử OS35 làm tăng tỉ lệ chuột nhảy và rút ngắn thời gian nhảy có ý nghĩa thống kê so với lô chứng không dùng thuốc ($p < 0,05$). Sử dụng sildenafil và đơn liều OS35 ngay trước khi cho chuột thực hiện hành vi tình dục không ảnh hưởng đến nồng độ testosterone trong cơ thể. Vậy bằng cách nào sildenafil và OS35 làm thay đổi các chỉ số đánh giá ham muốn tình dục?

Một số bằng chứng khoa học chứng minh vai trò của hệ dopaminergic trung ương trong điều hòa hành vi tình dục, trong đó có ham muốn tình dục ở người và động vật. Một số thuốc chủ vận dopaminergic như apomorphin, bromocriptin... có thể gây cương dương; dùng tiền chất của dopamin là levodopa có thể làm tăng ham muốn tình dục (libido), cương dương hoặc xuất tinh về đêm ở 20-30% bệnh nhân Parkinson đang điều trị bằng các thuốc này. Các thuốc kháng dopaminergic có thể làm giảm ham muốn tình dục, rối loạn cương dương đến 50% các trường hợp [129],[130]. Dopamin được coi là chất trung gian hóa học chính điều hòa chức năng tình dục [129]. Như vậy, một thuốc tác dụng trên hệ dopaminergic trung ương hoặc ảnh hưởng đến sự giải phóng dopamin có thể ảnh hưởng đến chức năng tình dục nói chung và ham muốn tình dục nói riêng.

Trong nghiên cứu này, sildenafil làm giảm chỉ số ML có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$). Kết quả tương tự cũng thu được từ nghiên cứu của nhiều tác giả khác như Tajuddin (2005) [131], A.M.Senbel (2008) [132], Gerda (2015) [133], Joseph O.E. (2017) [134] v.v... Để giải thích tác dụng này của sildenafil, các nhà khoa học đã đưa ra giả thuyết về tác dụng của sildenafil trên thần kinh trung ương, cụ thể là trên hệ dopaminergic trung ương [135],[136]. Nghiên cứu của D.Giuliani và cs. (2002) trên chuột cống đực xuất tinh bình thường và chuột cống đực xuất tinh chậm, sildenafil có tác

dụng làm tăng cường ham muốn tình dục (tăng MF, giảm ML). Tác dụng làm tăng ham muốn tình dục này bị ức chế khi cho chuột dùng eticloprid, một chất đối kháng dopaminergic [135]. Năm 2013, Kyratsas C. làm rõ hơn tác dụng này bằng cách dùng sildenafil cho chuột cống đực, sau đó định lượng dopamin và các chất chuyển hóa của dopamin bằng HPLC ở khu vực tiền thị giữa (medial preoptic area (mPOA)) và nhân cạp (nucleus accumbens (NAcc)). Kết quả cho thấy sildenafil làm tăng hoạt động của hệ dopaminergic ở khu vực tiền thị giữa và nhân cạp. Từ kết quả này, các tác giả nhận định sildenafil có thể có tác dụng trên con đường thần kinh trung ương liên quan đến điều hòa thức tỉnh tình dục (sexual arousal) [136].

Như vậy, ngoài cơ chế ức chế PDEV đã biết rõ và đã được khẳng định của sildenafil, trong những năm gần đây, các nhà khoa học đã đưa ra một số giả thuyết về các cơ chế tác dụng khác của sildenafil, trong đó, có giả thuyết sildenafil không chỉ tác dụng ở ngoại biên mà còn cả ở trung ương. Mặc dù cần nhiều nghiên cứu cụ thể và chi tiết hơn để chứng minh, các giả thuyết này đã mở ra các hướng nghiên cứu mới và hứa hẹn mở rộng ứng dụng lâm sàng của sildenafil.

Ở lô chuột dùng thuốc thử OS35 cũng thu được kết quả tương tự, OS35 liều 150 mg/kg làm tăng tỉ lệ chuột nhảy và rút ngắn thời gian nhảy (ML). Vậy OS35 làm thay đổi các chỉ số đánh giá ham muốn tình dục của chuột cống đực như thế nào? Như trên đã nhắc đến, osthol, thành phần chính của quả Xà sàng, đã được đánh giá có tác dụng làm tăng giải phóng NO từ nội mạc ở thể hang [7], nên chưa loại trừ được khả năng osthol còn có tác dụng tăng giải phóng NO từ tế bào cơ trơn mạch máu. Ngoài ra, Wang và cs. (2008) thấy rằng osthol và imperatorin trong quả Xà sàng có tác dụng làm tăng giải phóng glutamat từ các neuron [137]. Sau đó, Lin và cs. (2012) cho rằng tác dụng làm tăng giải phóng glutamat của osthol liên quan đến hoạt hóa

con đường phụ thuộc GMP vòng/PKG [138]. Vậy, NO và glutamat có liên quan như thế nào đến ham muốn tình dục?

Khu vực tiền thị trước có vai trò quan trọng trong điều hòa hành vi tình dục ở chuột đực nói chung và ham muốn tình dục nói riêng [136],[139]. Khi kích thích lên các receptor của dopamin ở khu vực này sẽ làm tăng ham muốn tình dục. Tiêm trực tiếp các chất chủ vận dopamin vào khu vực tiền thị trước làm tăng ham muốn/ hành vi tình dục, ngược lại, khi tiêm chất đối kháng dopamin vào khu vực này sẽ gây giảm khả năng giao cấu, phản xạ tình dục và ham muốn tình dục của chuột [139]. Mặt khác, các nhà khoa học cũng nhận thấy khi chuột đực tiếp xúc với chuột cái đang động dục, lượng dopamin ở khu vực tiền thị trước tăng lên ở thời điểm trước khi giao cấu và trong suốt quá trình giao cấu [139]. Các yếu tố chính điều hòa giải phóng dopamin ở khu vực tiền thị trước là các kích thích giác quan và hormon testosterone. Ngoài ra, kết quả của nhiều nghiên cứu cho thấy NO và glutamat cũng có tác dụng này [139]. Như vậy, đây có thể là một giả thuyết về cơ chế tác dụng của thuốc thử OS35 làm tăng ham muốn tình dục ở chuột cống đực.

4.4.2. Ảnh hưởng trên hoạt động thâm nhập (intromission)

Hoạt động thâm nhập cần có sự cương dương. Quá trình cương dương cần có sự phối hợp của quá trình giãn mạch, các hormon và yếu tố thần kinh. Do đó, hoạt động thâm nhập đặc trưng cho sức mạnh tình dục (potency) hay hiệu quả giao cấu [77]. Các chỉ số đánh giá hoạt động thâm nhập là tỉ lệ chuột thâm nhập và số lần thâm nhập (IF). Trong đó quan trọng nhất là IF. Chỉ số IF không chỉ thể hiện khả năng cương dương mà còn thể hiện khả năng duy trì cương dương để tiến hành giao hợp và là tiền đề cho hiện tượng xuất tinh [77],[78]. Chỉ số IL (thời gian đạt đến thâm nhập) thì phản ánh ham muốn tình dục hơn là sức mạnh tình dục.

Kết quả nghiên cứu cho thấy sildenafil làm tăng tỉ lệ chuột đực có hiện tượng thâm nhập, tăng số lần thâm nhập (IF) so với lô không dùng thuốc ($p < 0,05$). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với cơ chế tác dụng của sildenafil là ức chế PDEV, làm tăng lượng GMP vòng gây giãn mạch máu đến thể hang, tăng áp lực thể hang, tăng khả năng cương dương [35],[36]. Tác dụng tăng số lần thâm nhập, tăng cường hiệu quả giao cấu và cải thiện chức năng cương của sildenafil cũng được ghi nhận trong các nghiên cứu khi sử dụng sildenafil làm thuốc chứng dương [131],[132],[133],[134].

Ở lô chuột dùng OS35 150 mg/kg, tỉ lệ chuột thâm nhập và số lần thâm nhập tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$). Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu tác dụng của OS35 trên áp lực thể hang ở chuột đực. Như vậy, sau khi dùng thuốc, do tác dụng tăng giải phóng NO từ nội mạc, tăng lượng GMP vòng, AMP vòng của osthol ở cơ trơn thể hang, tăng lượng máu đến dương vật, tăng khả năng cương dương [7], nên làm tăng khả năng và sức mạnh giao cấu của chuột công đực.

Ngoài chỉ số IF (số lần thâm nhập), OS35 còn làm giảm thời gian đạt đến thâm nhập (IL). Chỉ số IL vừa phản ánh hiệu quả giao cấu, vừa phản ánh ham muốn tình dục. Như vậy, OS35 không chỉ làm tăng hiệu quả giao cấu, mà còn làm tăng ham muốn tình dục (như đã trình bày ở mục 4.3.3.1). Điều này đưa đến giả thuyết về tác dụng trên hoạt động tình dục của OS35 không chỉ ở ngoại vi mà cả ở trung ương.

4.4.3. Ảnh hưởng trên hoạt động xuất tinh (ejaculation)

Hoạt động xuất tinh là sự phóng ra của tinh dịch qua một chuỗi hiện tượng phức hợp xảy ra vào giai đoạn cuối của cuộc giao hợp. Đối với nam giới, xuất tinh là sự kết thúc của quá trình giao hợp. Sau khi xuất tinh, người nam giới đã thỏa mãn hoàn toàn; trong khi ở nữ giới, khoái cảm còn duy trì một thời gian dài rồi mới giảm xuống từ từ. Một cuộc giao hợp trọn vẹn làm

tăng sự hòa hợp khăng khít của mỗi cặp vợ- chồng, xuất tinh quá sớm làm cho người phụ nữ chưa đủ thời gian nhận cảm các khoái cảm để thỏa mãn hoàn toàn; ngược lại, xuất tinh chậm hoặc không xuất tinh cũng khiến cho người nam giới không đạt được khoái cảm dẫn đến trạng thái căng thẳng, bực bội, người phụ nữ có tâm trạng chịu đựng, chán chường. Trên thực nghiệm, ít có những đánh giá trên rối loạn xuất tinh, đặc biệt rối loạn xuất tinh sớm.

Thời gian sau xuất tinh (PEI) là khoảng thời gian để chuột hồi sức lại sau mỗi loạt giao cấu, và cũng là chỉ số đánh giá sự ham muốn tình dục [77],[78]. Thông thường mỗi chuột đực có thể thực hiện được 6-8 loạt giao cấu trong mỗi lần ghép đôi, giữa các đợt giao cấu, chuột thường nghỉ khoảng 4-7 phút. Tuy nhiên, nếu để chuột giao cấu liên tục, chuột sẽ rất mệt và thời gian hồi sức có thể lên đến 2 tuần [77],[78]. Do vậy, để có thể dùng chuột đực một cách thường xuyên, chỉ nên kết thúc thí nghiệm sau khi đã ghi được PEI lần thứ nhất.

Có nhiều yếu tố chi phối quá trình xuất tinh. Trong đó, phải nói đến vai trò quan trọng của hormon testosterone. Bệnh nhân suy giảm testosterone có thể rơi vào tình trạng rối loạn xuất tinh, xuất tinh muộn hoặc không xuất tinh [1],[2].

Kết quả nghiên cứu cho thấy liều đơn OS35 150 mg/kg chưa làm thay đổi thời gian xuất tinh ở chuột cống đực. Thời gian nhảy lại sau xuất tinh có xu hướng giảm, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô không dùng thuốc.

Trong luận án này, thuốc thử OS35 đã được chứng minh có hoạt tính androgen ở chuột cống đực non thiếu (như đã trình bày ở mục 4.2.1). Năm 2004, Yuan J. cũng nhận thấy, osthonol có khả năng làm tăng sản xuất FSH, LH và testosterone [8]. Do đó, chưa thể phủ nhận tác dụng của OS35 trên quá trình xuất tinh ở chuột cống đực trưởng thành. Để đánh giá đúng tác dụng này, cần

ngiên cứu ảnh hưởng của OS35 trên hành vi tình dục với khoảng thời gian sử dụng thuốc kéo dài, chứ không chỉ là sử dụng liều đơn trước khi giao cấu.

4.5. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chuột cống trắng đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

4.5.1. Lí do lựa chọn natri valproat để gây suy giảm sinh sản trên chuột cống đực

Trên thực tế, những bệnh nhân nam chỉ tìm đến bác sĩ và các cơ sở y tế khi họ có bệnh lý suy giảm sinh sản với mong muốn nhận được biện pháp điều trị thích hợp. Do đó, bên cạnh các phương pháp nghiên cứu trên động vật thực nghiệm bình thường, các nhà nghiên cứu còn xây dựng và áp dụng những mô hình nghiên cứu trên động vật gây suy giảm sinh sản, từ đó, đánh giá tác dụng của thuốc nghiên cứu trong điều trị suy giảm sinh sản nam. Các phương pháp được sử dụng để gây suy giảm sinh sản ở động vật thực nghiệm bao gồm: suy giảm sinh sản do đột biến, tuổi, bệnh lý toàn thân, stress, tia xạ, hóa chất và thuốc.

Hiện nay, các nghiên cứu mô phỏng bệnh lý suy giảm sinh sản trên thế giới thường sử dụng mô hình chuột suy giảm sinh sản do gây đột biến gen. Mô hình này rất giá trị để nghiên cứu về bệnh lý suy giảm sinh sản ở nam giới với độ chính xác và độ tin cậy cao. Tuy nhiên, mô hình này chưa thấy được áp dụng và tiến hành trong nghiên cứu ở Việt Nam.

Các mô hình gây suy giảm sinh sản do tuổi, bệnh lý toàn thân, stress thường đòi hỏi kỹ thuật phức tạp, thời gian kéo dài, động vật thí nghiệm ngoài tình trạng suy giảm sinh sản còn có nhiều bệnh lý hoặc rối loạn kèm theo. Còn các mô hình gây suy giảm sinh sản do tia xạ hoặc hóa chất thường gây ra tình trạng suy giảm sinh sản nặng, kèm theo suy giảm miễn dịch, suy chức năng của nhiều cơ quan khác, có thể dẫn đến tử vong, tỉ lệ động vật thí nghiệm chết trong quá trình nghiên cứu thường cao.

Chính vì những lí do trên, trong luận án này, chúng tôi sử dụng biện pháp gây suy giảm sinh sản bằng thuốc. Có một số thuốc có thể gây ảnh hưởng đến chức năng sinh sản với đích tác dụng của thuốc là từ vùng dưới đồi – tuyến yên, gây ra bệnh cảnh suy giảm sinh sản gần với bệnh lý suy giảm sinh sản thứ phát của nam giới. Một trong những thuốc được sử dụng là natri valproat, mặc dù chưa rõ natri valproat gây suy giảm sinh sản theo cơ chế trung ương, ngoại vi hay cả hai [97].

Natri valproat là một thuốc chống động kinh được sử dụng rộng rãi trên lâm sàng cho nhiều loại động kinh như động kinh cơn lớn, cơn nhỏ, trạng thái động kinh mùa giập...[140]. Natri valproat đã được chứng minh làm giảm nồng độ FSH, LH và testosterone máu trên cơ quan sinh sản của chuột thực nghiệm khi sử dụng lâu dài với liều cao hơn liều điều trị [106]. Nghiên cứu của Bairy và cs. (2010) về độc tính sinh sản của natri valproat đã chứng minh, natri valproat với liều 200 mg/kg/ngày và 400 mg/kg/ngày cho chuột cống trắng uống liên tục trong 60 ngày đã làm giảm rõ số lượng tinh trùng lấy từ đuôi mào tinh, độ di động của tinh trùng, tăng tỉ lệ tinh trùng có hình thái bất thường và làm thoái hóa nặng các tế bào biểu mô của tinh hoàn [109]. Nghiên cứu của Nishimura và cs. (2000) cũng cho thấy với liều 500 mg/kg/ngày dùng trong 7 tuần, natri valproat làm giảm các chỉ số sinh sản, cũng như làm giảm số lượng tinh trùng, giảm tốc độ di động của tinh trùng, thay đổi hình thái và cấu trúc tinh hoàn của chuột cống đực trưởng thành [106]. Vì vậy, trong luận án này, natri valproat liều 500 mg/kg/ngày được sử dụng như một tác nhân gây suy giảm sinh sản cho chuột thực nghiệm, trên cơ sở đó đánh giá tác dụng bảo vệ của OS35 trên cấu trúc và chức năng của cơ quan .

Ở Việt Nam, liều dùng này cũng đã được tác giả Dương Thị Ly Hương và Trần Thanh Tùng sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của Bá bệnh, Nhục thung dung trên chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat [5],[50].

4.5.2. Đánh giá tác dụng bảo vệ của thuốc thử OS35 trên chuột cống trắng đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

4.5.2.1. Tác dụng bảo vệ của OS35 trên các chỉ số nghiên cứu ở chuột cống đực

* Ảnh hưởng lên trọng lượng các cơ quan sinh dục

Việc đánh giá trọng lượng tinh hoàn và các cơ quan sinh dục phụ có thể gián tiếp phản ánh nồng độ testosterone và chức năng tinh hoàn khi trọng lượng các cơ quan này rất nhạy cảm với androgen.

Ở lô 2 (chuột đực bị gây suy giảm sinh sản, cho uống natri valproat 500 mg/kg/ngày và dung môi pha thuốc CMC 0,5% trong 7 tuần), các chỉ số nghiên cứu về trọng lượng các cơ quan sinh dục ở chuột đực (bao gồm tinh hoàn, túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper, đầu dương vật, cơ nâng hậu môn – hành hang) biểu hiện tình trạng suy giảm rõ rệt so với lô 1 – chứng sinh học với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (với $p < 0,05$). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó về độc tính trên cơ quan sinh sản của natri valproat [108]. Với kết quả nghiên cứu ở lô 3, sử dụng natri valproat 500 mg/kg/ngày và OS35 150mg/kg/ngày trong 7 tuần cho thấy, trọng lượng các cơ quan sinh dục được khảo sát của chuột đực không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 2 ($p > 0,05$).

Khi nghiên cứu hoạt tính androgen trên chuột cống đực non thiếu, trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ của chuột dùng OS35 tăng có ý nghĩa thống kê so với lô không dùng thuốc ($p < 0,05$) (như đã trình bày ở mục 4.2). Sự khác biệt về kết quả này có thể do sự khác nhau về đối tượng động vật nghiên cứu. Chuột sử dụng để gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat là chuột chuột đực trưởng thành, các cơ quan sinh dục đã phát triển hoàn thiện và ít bị ảnh hưởng bởi các thuốc tác động thông qua androgen hơn so với chuột cống non thiếu.

* Ảnh hưởng lên mật độ và độ di động của tinh trùng

Số lượng tinh trùng, đánh giá gián tiếp qua mật độ tinh trùng, là một trong những chỉ số rất nhạy để đánh giá quá trình sinh tinh, bởi đó là kết quả tổng hợp của tất cả các giai đoạn sinh tinh trong tinh hoàn, bất cứ một sự bất thường nào trong quá trình sinh tinh đều có thể ảnh hưởng đến số lượng tinh trùng [90]. Giảm số lượng tinh trùng, hay giảm mật độ tinh trùng có thể gây vô sinh. Tinh trùng sau khi được sản sinh từ tế bào kẽ của tinh hoàn sẽ di chuyển ra mào tinh và trưởng thành ở đó [18]. Do vậy, cần lấy tinh trùng từ đuôi mào tinh để phân tích.

Kết quả nghiên cứu cho thấy ở lô 2 (lô mô hình), natri valproat làm giảm rõ rệt mật độ tinh trùng ở đuôi mào tinh ($p < 0,01$) và tỉ lệ tinh trùng sống (với $p < 0,001$) so với lô chứng. Trong khi đó, các chỉ số mật độ tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng sống ở lô dùng OS35 trong 7 tuần được cải thiện có ý nghĩa thống kê so với lô 2 ($p < 0,01$). Tuy nhiên sử dụng OS35 kèm theo vẫn chưa đưa các chỉ số này về mức bình thường khi có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa mật độ tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng sống khi so sánh với lô chứng sinh học. Bairy và cs. đã nhận định natri valproat ảnh hưởng đến tế bào mầm của tinh trùng, từ đó ảnh hưởng đến các giai đoạn phát triển khác nhau của tinh trùng, trong đó ảnh hưởng mạnh nhất đến tinh nguyên bào, từ đó làm suy giảm đáng kể số lượng tinh trùng được sản xuất; ngoài ra, sự giảm nồng độ testosterone trong tinh hoàn cũng là nguyên nhân dẫn đến giảm số lượng tinh trùng, bởi testosterone rất cần thiết cho quá trình sản xuất và hình thành của tinh trùng [109].

Sự di động của tinh trùng là một yếu tố quan trọng quyết định đến khả năng sinh sản, vì vậy, việc đánh giá độ di động tinh trùng là một tiêu chí quan trọng trong việc đánh giá chất lượng tinh trùng [90]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, natri valproat 500 mg/kg/ngày làm tỉ lệ tinh trùng có tiến tới giảm đi 2

lần so với lô chứng sinh học (lần lượt là 17,78 % và 39,63%) và tỉ lệ tinh trùng tiến tới nhanh giảm hơn 3 lần (10,33% và 35,50%) ($p < 0,001$); đồng thời làm tăng tỉ lệ tinh trùng không tiến tới (8,00 %) và tỉ lệ tinh trùng không di động (74,22%) so với lô chứng (5,88% tinh trùng không tiến tới, 54,50% tinh trùng không di động). Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu về độ di động của tinh trùng khi sử dụng cùng liều natri valproat trên chuột của Nishimura và cs. (2000) [108]. Natri valproat được biết là can thiệp vào chức năng của ti thể, cơ quan có vai trò quan trọng trong việc cung cấp năng lượng cho tế bào hoạt động [109]. Sự ảnh hưởng của natri valproat tới chức năng của ti thể có thể là nguyên nhân làm giảm độ di động của tinh trùng. Bên cạnh đó, nồng độ androgen cũng đóng vai trò quan trọng khi androgen điều hòa tổng hợp phần lớn các protein của mào tinh, ảnh hưởng đến sự trưởng thành của tinh trùng [18].

Việc sử dụng thêm OS35 trong 7 tuần cho chuột đực ở lô 3 đã cải thiện đáng kể các chỉ số này theo chiều hướng tích cực, với tỉ lệ tinh trùng có tiến tới và tỉ lệ tinh trùng tiến tới nhanh tăng gấp đôi, trong khi đó tỉ lệ tinh trùng không tiến tới và tỉ lệ tinh trùng không di động giảm lần lượt là 37,5% và 12,4% khi so sánh với các chỉ số tương ứng với lô 2 ($p < 0,05$). Tuy nhiên, OS35 vẫn chưa đưa được các chỉ số này về bình thường khi so sánh với các chỉ số tương ứng ở lô chứng sinh học. Vì vậy, ảnh hưởng của OS35 lên độ di động của tinh trùng đơn thuần thông qua tác dụng làm tăng nồng độ testosterone trong máu hay còn có ảnh hưởng đến chức năng ti thể thì cần những nghiên cứu sâu hơn về vấn đề này.

* Ảnh hưởng lên hình thái tinh trùng

Những bất thường về hình thái tinh trùng có thể là nguyên nhân dẫn đến tỉ lệ tinh trùng sống giảm và khả năng di động giảm. Vì thế, đánh giá hình thái tinh trùng là một trong những chỉ tiêu quan trọng cho biết chất lượng tinh trùng. Kết

quả nghiên cứu cho thấy các chuột dùng natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần liền làm giảm rõ rệt tỉ lệ tinh trùng bình thường và tăng rõ rệt tỉ lệ tinh trùng bất thường (bao gồm cả bất thường ở đầu, cổ và đuôi).

Lô chuột dùng OS35 150 mg/kg/ngày trong 7 tuần có tỉ lệ tinh trùng bình thường được cải thiện rõ rệt, trong khi tỉ lệ tinh trùng bất thường ở đầu, cổ, đuôi đều giảm có ý nghĩa thống kê so với lô gây mô hình bằng natri valproat, không dùng thuốc thử.

* Ảnh hưởng lên nồng độ testosterone trong máu

Kết quả nghiên cứu cho thấy, nồng độ testosterone trong máu chuột ở lô mô hình giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$). Điều này hoàn toàn phù hợp với tình trạng suy giảm về trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ thuộc androgen cũng như sự suy giảm về mật độ tinh trùng, tỉ lệ tinh trùng sống và các chỉ số đánh giá mức độ di động của tinh trùng.

Ở lô chuột dùng OS35, nồng độ testosterone trong máu tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,05$). Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu tác dụng của OS35 làm tăng mật độ tinh trùng, tăng tỉ lệ tinh trùng sống, tỉ lệ tinh trùng có tiến tới, tiến tới nhau và giảm tỉ lệ tinh trùng không tiến tới, không di động so với lô mô hình.

Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Xie Jin-xian (2007) trên chuột nhắt trắng gây suy sinh sản bằng cyclophosphamid, osthon có tác dụng làm tăng testosterone trong máu [8].

* Ảnh hưởng lên hình thái mô học của tinh hoàn và kích thước ống sinh tinh

Kết quả nghiên cứu hình thái tinh hoàn cho thấy, ở lô 2, natri valproat đã phá hủy nghiêm trọng cấu trúc tinh hoàn, rất ít các tế bào dòng tinh trong lòng ống sinh tinh, hầu như không thấy tinh trùng và tiền tinh trùng, tinh nguyên bào chỉ còn một lớp mỏng, các tế bào bị thoái hóa hốc nặng nề. Kích thước ống sinh tinh cũng giảm rất rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,001$). Kết quả nghiên

cứu này phù hợp với nghiên cứu trước đó của Bairy và cộng sự [109]. Điều này là do natri valproat tác động mạnh đến các tế bào mầm của tinh trùng, đặc biệt là tinh nguyên bào, dẫn đến ảnh hưởng đến các giai đoạn phát triển khác nhau của tinh trùng.

Kết quả mô học ở lô 3 cho thấy, OS35 dùng trong 7 tuần có xu hướng duy trì sự toàn vẹn cấu trúc tinh hoàn, 62,5% số chuột trong lô có hình ảnh mô học tinh hoàn giống với lô 1 – chứng sinh học, với biểu mô tinh dày, đủ các loại tế bào, các tế bào có cấu trúc bình thường và mô kẽ bình thường. Điều này cho thấy tác dụng làm tăng biệt hóa và trưởng thành của OS35 lên các tế bào tiền tinh trùng, có thể thông qua tác dụng làm tăng nồng độ testosterone trong máu. Kích thước ống sinh tinh cũng tăng rất rõ rệt so với lô mô hình ($p < 0,001$).

Như vậy, các kết quả của nghiên cứu này cho thấy thuốc thử OS35 được sử dụng với liều 150mg/kg/ngày trong 7 tuần trên chuột cống đực trưởng thành bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat thể hiện tác dụng làm tăng số lượng và chất lượng tinh trùng, tăng nồng độ testosterone trong máu, cải thiện hình ảnh mô học tinh hoàn chuột.

4.5.2.2. Tác dụng bảo vệ của OS35 trên các chỉ số nghiên cứu ở chuột cống cái ghép với chuột cống đực gây suy sinh sản bằng natri valproat

Chuột cống đực ở các lô được ghép với chuột cái trưởng thành khỏe mạnh để đánh giá gián tiếp khả năng sinh sản của chuột cống đực trưởng thành thông qua các chỉ số đánh giá khả năng thụ thai và phát triển phôi thai của chuột cống cái.

* Ảnh hưởng lên tỉ lệ chuột cái có chửa, số hoàng thể, số thai đậu và số thai phát triển bình thường

Kết quả nghiên cứu cho thấy số lượng hoàng thể/1 chuột mẹ ở 3 lô nghiên cứu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Điều này cho phép

đánh giá chất lượng chuột cái ở các lô nghiên cứu là như nhau. Hoàng thể do một ít tế bào hạt còn lại ở vỏ nang vỡ biến đổi thành sau khi có hiện tượng phóng noãn ở buồng trứng, có màu vàng khi nhìn tươi, không nhuộm .

Tỉ lệ có chửa ở lô chuột cái được ghép với chuột đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat 500 mg/kg/ngày giảm 3 lần so với tỉ lệ có chửa ở lô chuột cái được ghép với chuột công đực ở lô chứng sinh học, với tỉ lệ lần lượt là 25% và 75% ($p < 0,05$). Số thai đậu/1 chuột mẹ và số thai phát triển bình thường/1 chuột mẹ cũng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 lô chuột cái này: ở lô chuột cái ghép với chuột công đực lô 1, trung bình 1 chuột mẹ đậu 10 thai với hầu hết các thai đậu phát triển bình thường; trong khi đó, ở lô chuột cái ghép với chuột công đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat (lô 2), số thai đậu giảm gần một nửa (6,5 thai đậu/1 chuột mẹ) và chỉ khoảng 77% số thai đậu này phát triển bình thường

Ở lô chuột cái ghép với chuột công đực lô dùng OS35, tỉ lệ chuột cái có chửa cải thiện đáng kể, 41,7% số chuột cái ghép có thai so với 25,0% ở lô 2 ($p < 0,05$). Số thai phát triển bình thường/1 chuột mẹ ở lô này cũng tăng hơn so lô chuột cái ghép với chuột công đực lô 2 (7,80 thai phát triển bình thường/1 chuột mẹ) với $p < 0,05$. Thuốc thử OS35 có xu hướng làm tăng số thai đậu/1 chuột mẹ (9,40 thai đậu/1 chuột mẹ), mặc dù sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê.

* Ảnh hưởng lên tỉ lệ thai chết sớm, thai chết muộn và tỉ lệ mất trứng.

3 chỉ số tỉ lệ thai chết sớm, tỉ lệ thai chết muộn và tỉ lệ mất trứng ở chuột cái ghép với chuột công đực ở lô chứng sinh học đều ở mức thấp, lần lượt là 1,4%; 2,1% và 1,7%. Các chỉ số này đã tăng rõ rệt ở lô chuột cái ghép với chuột công đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần (32%, 20% và 28%). Với lô chuột cái ghép với chuột công đực dùng OS35, các chỉ số này được cải thiện đáng kể, chỉ còn 13,8% thai chết sớm, 3,2% thai chết muộn và 8,5% mất trứng ($p < 0,05$).

Rõ ràng những tác dụng bất lợi của natri valproat lên các cơ quan sinh sản cũng như lên số lượng, chất lượng tinh trùng của chuột cống đực đã ảnh hưởng nghiêm trọng đến các chỉ số đánh giá khả năng thụ thai và phát triển phôi thai của chuột cái. Từ các kết quả nghiên cứu nêu trên, với sự tăng đáng kể tỉ lệ thụ thai ở chuột cái, số thai đậu/1 chuột mẹ, số thai phát triển bình thường/1 chuột mẹ, giảm các chỉ số về tỉ lệ mất trứng, tỉ lệ thai chết sớm, tỉ lệ thai chết muộn ở lô chuột cái ghép với chuột đực lô 3 khi so sánh với lô mô hình, có thể đánh giá một cách gián tiếp tác dụng cải thiện số lượng và chất lượng tinh trùng ở chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat của OS35 với liều 150mg/kg/ngày dùng trong 7 tuần.

Như vậy, có thể OS35 với liều 150mg/kg/ngày với tác dụng làm tăng nồng độ testosterone trong máu đã làm cải thiện số lượng và chất lượng tinh trùng ở chuột cống đực trưởng thành bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat, từ đó cải thiện các chỉ số đánh giá khả năng thụ thai và phát triển phôi thai ở chuột cái ghép với chuột đực bị gây suy giảm.

4.5.3. Đánh giá tác dụng phục hồi của thuốc thử OS35 trên chuột cống trống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Nghiên cứu của Bairy và cộng sự (2010) về độc tính sinh sản của natri valproat đã chỉ ra rằng, natri valproat gây ra những biến đổi tiêu cực trên các chỉ số độ di động của tinh trùng, số lượng tinh trùng, tỉ lệ tinh trùng có hình thái bất thường và hình thái mô học của tinh hoàn. Những biến đổi này kéo dài kể cả sau khi đã dừng thuốc và có tính chất hồi phục [109]. Cụ thể, khi cho chuột uống natri valproat với liều 200mg/kg/ngày hoặc 400mg/kg/ngày trong 60 ngày liên tục, sự giảm số lượng tinh trùng sẽ kéo dài đến hết tuần thứ 7 sau khi đã dừng thuốc và hồi phục trở lại bình thường so với nhóm chứng vào tuần thứ 15. Những biến đổi trên chỉ số độ di động của tinh trùng, tỉ lệ tinh trùng có hình thái bất thường và hình thái mô học của tinh hoàn cũng kéo

dài đến tuần thứ 5 hoặc thứ 7 sau dừng thuốc tùy thuộc liều natri valproat đã được dùng, và hồi phục hoàn toàn vào tuần thứ 10 sau dừng thuốc đối với độ di động của tinh trùng và tuần thứ 15 sau dừng thuốc đối với hình thái mô học của tinh hoàn [109].

Mô hình thực nghiệm được tiến hành nhằm đánh giá và so sánh tác dụng hồi phục trên cấu trúc và chức năng cơ quan sinh sản ở chuột đã bị suy giảm sinh sản của OS35 với quá trình tự phục hồi của chuột sau dùng thuốc gây suy giảm.

4.5.3.1. Tác dụng phục hồi của OS35 trên các chỉ số nghiên cứu ở chuột cống đực

* Ảnh hưởng lên trọng lượng các cơ quan sinh dục

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các chỉ số trọng lượng cơ quan sinh dục ở lô 2 giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học. Kết quả này cho phép đánh giá gián tiếp nồng độ testosterone trong máu chuột bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat sau 10 ngày ngừng thuốc vẫn ở mức thấp so với ngưỡng bình thường, khi mà trọng lượng các cơ quan sinh dục rất nhạy cảm với androgen. Điều này phù hợp với nghiên cứu của P. Vijay và cộng sự (2008), đã chỉ ra rằng ảnh hưởng của natri valproat lên nồng độ testosterone kéo dài kể cả sau khi đã dừng thuốc, bắt đầu hồi phục từ tuần thứ 7 và đạt ngưỡng bình thường vào tuần thứ 15 sau dừng thuốc [141].

Việc sử dụng OS35 trong 10 ngày sau khi dừng thuốc natri valproat có xu hướng làm tăng trọng lượng các cơ quan sinh dục, mặc dù chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$).

* Ảnh hưởng lên mật độ và độ di động của tinh trùng

Kết quả nghiên cứu cho thấy ở lô mô hình, natri valproat làm giảm rõ mật độ tinh trùng ở đuôi mào tinh cũng như tỉ lệ tinh trùng sống ($p < 0,01$ và $p < 0,001$). So với lô 2 – mô hình bảo vệ, cả hai chỉ số này ở có xu hướng tăng nhẹ sau khi chuột được ngừng sử dụng natri valproat 10 ngày.

Ở lô chuột dùng OS35 trong 10 ngày, mật độ tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng sống tăng nhẹ so với lô mô hình, tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Vì thời gian một chu kỳ sinh tinh của chuột cống đực khoảng 8 tuần, chúng tôi cho rằng, thời gian sử dụng OS35 trên chuột chỉ có 10 ngày, chưa đủ để thể hiện tác dụng phục hồi số lượng tinh trùng. Cần những nghiên cứu tiến hành trong khoảng thời gian dài hơn để so sánh đầy đủ tác dụng của OS35 với quá trình tự phục hồi của cơ quan sinh sản ở chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản.

Nghiên cứu các chỉ số đánh giá độ di động của tinh trùng, ở lô mô hình, tỉ lệ tinh trùng tiến tới nhanh và tỉ lệ tinh trùng có tiến tới giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học (giảm lần lượt là 32,64% và 44,08% so với lô chứng), trong khi tỉ lệ tinh trùng không di động lại tăng rõ rệt. So sánh với các chỉ số đánh giá độ di động của tinh trùng ở lô chuột bị gây suy giảm sinh sản mô hình bảo vệ, các chỉ số này có xu hướng cải thiện theo hướng tích cực, với sự tăng tỉ lệ tinh trùng tiến tới nhanh và tỉ lệ tinh trùng có tiến tới, giảm tỉ lệ tinh trùng không tiến tới và tỉ lệ tinh trùng không di động. Khi so sánh với kết quả nghiên cứu của Bairy và cộng sự (2010), cũng nhận thấy sự khác biệt tương tự như khi so sánh kết quả về độ di động của tinh trùng [109].

Việc sử dụng OS35 trong 10 ngày sau khi ngừng natri valproat đã cho kết quả theo chiều hướng tích cực, với tỉ lệ tinh trùng có tiến tới và tỉ lệ tinh trùng tiến tới nhanh tăng đáng kể so với lô 2, về gần mức bình thường so với lô chứng sinh học; kèm theo đó tỉ lệ tinh trùng không di động giảm rõ rệt so với lô 2.

* Ảnh hưởng lên hình thái tinh trùng

Kết quả nghiên cứu tương tự như khi đánh giá tác dụng bảo vệ. Lô chuột dùng OS35, tỉ lệ tinh trùng bình thường tăng, tỉ lệ tinh trùng bất thường giảm có ý nghĩa thống kê so với lô gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat.

* Ảnh hưởng lên nồng độ testosterone trong máu

Kết quả nghiên cứu tương tự như khi đánh giá tác dụng bảo vệ. Ở lô chuột dùng OS35, nồng độ testosterone trong máu tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,05$).

Nồng độ testosterone ở lô mô hình có xu hướng tăng lên hơn so với lô mô hình – bảo vệ. Điều này phù hợp với những thay đổi theo chiều hướng tích cực về các chỉ số đánh giá số lượng và chất lượng tinh trùng, kích thước ống sinh tinh ở lô mô hình sau khi ngừng natri valproat 10 ngày.

* Ảnh hưởng lên hình thái mô học của tinh hoàn và kích thước ống sinh tinh

Kết quả nghiên cứu tiêu bản mô học tinh hoàn cho thấy, sau 10 ngày ngưng sử dụng natri valproat, hình ảnh mô học và kích thước ống sinh tinh của chuột ở các lô mô hình – phục hồi (ngừng natri valproat trong 10 ngày) đã có một số cải thiện so với chuột ở lô mô hình - bảo vệ (lấy tiêu bản tinh hoàn ngay sau 7 tuần cho uống natri valproat), với các ống sinh tinh đủ các tế bào dòng tinh, tuy nhiên vẫn thấy sự phù nề ở mô kẽ, khoảng gian bào rộng với hình ảnh thoái hóa học của các tế bào dòng tinh ở mức độ từ vừa đến nặng. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Bairy và cộng sự (2010) ở tiêu bản mô học tinh hoàn của chuột cống đực trưởng thành sau 2 tuần ngưng sử dụng natri valproat liều 200mg/kg/ngày và 400mg/kg/ngày [109]. Việc sử dụng OS35 10 ngày sau khi ngừng natri valproat đã tác động tương đối đến quá trình phục hồi trên kích thước ống sinh tinh và hình ảnh mô học của tinh hoàn chuột, với biểu mô tinh dày, đầy đủ các tế bào dòng tinh, đặc biệt giảm mức độ thoái hóa của các tế bào dòng tinh. Sự thoái hóa của các tế bào dòng tinh vẫn còn có thể do thời gian dùng thuốc chưa đủ lâu để dẫn đến sự hồi phục hoàn toàn trên hình thái mô học tinh hoàn chuột, cần có những nghiên cứu tiến hành trong khoảng thời gian dài hơn để đánh giá được tác động lâu dài của chế phẩm OS35 trên quá trình hồi phục của chuột bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat.

4.5.3.2. Tác dụng phục hồi của OS35 trên các chỉ số nghiên cứu ở chuột cống cái ghép với chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Kết quả nghiên cứu cho thấy số lượng hoàng thể/1 chuột mẹ ở 3 lô nghiên cứu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Điều này cho phép đánh giá chất lượng chuột cái ở các lô nghiên cứu là như nhau.

Sử dụng OS35 150mg/kg/ngày trong 10 ngày cho chuột cống đực sau thời gian dùng natri valproat gây suy giảm sinh sản đã làm tăng đáng kể tỉ lệ chuột cái mang thai và số thai phát triển bình thường trung bình trên 1 chuột mẹ, làm giảm tỉ lệ mất trứng, tỉ lệ thai chết sớm, tỉ lệ thai chết muộn so với lô mô hình.

Các kết quả này phù hợp với tác dụng cải thiện của OS35 trên quá trình phục hồi độ di động của tinh trùng, nồng độ testosterone trong máu, kích thước mô học tinh hoàn và hình thái tinh hoàn trên chuột cống đực.

Những kết quả đánh giá khả năng thụ thai và phát triển phôi thai ở chuột cái cho thấy gián tiếp những dấu hiệu khả quan về tác dụng phục hồi chức năng sinh sản của OS35 ở chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat. Mặc dù tác dụng phục hồi của OS35 trên mật độ tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng sống không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, nhưng việc tăng rõ rệt tỉ lệ tinh trùng tiến tới nhanh, tỉ lệ tinh trùng có tiến tới, giảm tỉ lệ tinh trùng không tiến tới và tinh trùng không di động dưới ảnh hưởng của OS35 phù hợp với những cải thiện ghi nhận trên các chỉ số đánh giá khả năng thụ thai và phát triển phôi thai ở chuột cái. Như vậy, có thể kết luận việc sử dụng thêm OS35 làm quá trình hồi phục chức năng sinh sản ở chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat diễn ra tốt hơn và nhanh hơn quá trình tự hồi phục của chuột.

4.5.4. Bàn luận về cơ chế tác dụng của OS35 trên chuột gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Sinh sản là kết quả của quá trình kết hợp giữa tinh trùng với trứng. Quá trình sinh tinh được điều hòa thông qua cơ chế nội tiết dưới sự điều khiển của hệ thống vùng dưới đồi - tuyến yên - tinh hoàn. Các hormon tham gia điều tiết quá trình sinh tinh là FSH, LH, androgen.

Trên tinh hoàn, FSH kích thích ống sinh tinh phát triển, kích thích tế bào Sertoli nằm ở thành ống sinh tinh phát triển và bài tiết các chất tham gia quá trình sản sinh tinh trùng và sản xuất hormon inhibin (A và B). FSH gắn với các receptor gắn với protein G, hoạt hóa adenyl cyclase, protein kinase A và calci. Nếu không có tác dụng này, tinh tử không trở thành tinh trùng được [142].

LH kích thích tế bào Leydig nằm giữa các ống sinh tinh phát triển và sản xuất testosterone. LH gắn vào các receptor màng bào tương gắn với các protein xuyên màng, thông qua protein kinase gây phosphoryl hóa [142].

Androgen tham gia vào các giai đoạn khác nhau của quá trình sản xuất và trưởng thành của tinh trùng nên rất quan trọng đối với sự sinh sản, cần thiết để duy trì quá trình sản sinh tinh trùng.

Natri valproat ức chế sản xuất các hormon hướng sinh dục, dẫn tới nồng độ testosterone giảm xuống, giảm quá trình sinh tinh, giảm số lượng và chất lượng tinh trùng, phá hủy cấu trúc tinh hoàn trên chuột cống đực trưởng thành, dẫn đến giảm tỉ lệ thụ thai và sự phát triển phôi thai ở chuột cái ghép với chuột đực suy giảm sinh sản. Kết quả nghiên cứu cho thấy thuốc thử OS35 có tác dụng bảo vệ và phục hồi trên các chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat.

Tác giả Yuan J. (2004) nhận thấy osthonol có tác dụng làm tăng tiết FSH, LH trong máu trên chuột cống đực thiếu khi dùng trong 20 ngày [8]. Từ đó đặt ra giả thuyết về cơ chế tác dụng của OS35 đối với chức năng sinh sản ở

chuột cống đực có thể là kích thích lên tuyến yên trước, làm tăng tiết FSH, LH, từ đó, làm tăng sản xuất testosterone. Giả thuyết này càng được củng cố bởi kết quả nghiên cứu từ tác giả Qui L.P cho thấy ngoài các gonadotropin, osthonol còn có tác dụng làm tăng nồng độ của các hormon tuyến yên là TSH và ACTH trong máu [65],[122].

Cơ chế kích thích tuyến yên trước của quả Xà sàng nói chung và hợp chất osthonol nói riêng đến nay chưa được chứng minh. Tuy nhiên, nghiên cứu của S.J.Wang (2008) cho thấy osthonol và imperatoxin từ quả Xà sàng có tác dụng tăng giải phóng glutamat ở thần kinh trung ương [137]. Có nhiều vị trí gắn của glutamat được xác định ở tuyến yên trước, đồng thời, các gen biểu hiện receptor của glutamat cũng được tìm thấy ở tuyến thượng thận, tuyến giáp, tinh hoàn [143]. Như vậy, glutamat biểu hiện tác dụng lên các tuyến đích này trực tiếp bằng cách gắn lên các receptor tại đây hay gián tiếp bằng cách kích thích tuyến yên sản xuất ra các hormon ACTH, TSH, FSH, LH. Câu trả lời đến nay chưa rõ và cần những nghiên cứu sâu hơn để tìm ra cơ chế tác dụng.

4.5.5. Bàn luận về tác dụng của OS35 với lý luận và thực tiễn sử dụng quả Xà sàng trên lâm sàng theo y học cổ truyền

Trong y học cổ truyền, quả Xà sàng có vị cay đắng, tính bình; quy kinh thận. Công dụng là cường dương, ích thận tử phong táo thấp. Chủ trị liệt dương.

Theo lý luận y học cổ truyền, Thận bao gồm Thận âm, Thận dương. Thận tàng tinh. Tinh hoa được vị thu nhận, hóa tàng chứa nơi Thận. Tinh hoa của mọi tạng phủ cũng được tàng chứa nơi Thận. Rối loạn chức năng này dẫn đến các dấu hiệu di mộng tinh, liệt dương ở nam giới. Như vậy, quả Xà sàng quy kinh thận, vì vậy, Xà sàng được sử dụng để điều trị các rối loạn chức năng sinh dục và chức năng sinh sản ở nam giới.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chứng minh được tác dụng tăng cường của Xà sàng trên chức năng cương dương và hành vi tình dục của chuột cống đực trưởng thành; cũng như cho thấy Xà sàng có hoạt tính androgen và tăng cường khả năng sinh sản ở chuột cống đực bị suy giảm sinh sản. Như vậy, kết quả nghiên cứu phù hợp với lý luận y học cổ truyền về Xà sàng và bước đầu cung cấp bằng chứng trên thực nghiệm cho việc sử dụng Xà sàng trên thực tế lâm sàng để điều trị tình trạng suy giảm chức năng sinh dục – sinh sản ở nam giới. Bên cạnh đó, với việc sử dụng nguyên liệu nghiên cứu là chế phẩm OS35 dưới dạng bào chế hiện đại và tiện sử dụng cũng góp phần nâng cao tính ứng dụng, khả năng tiếp cận và tuân thủ điều trị của người bệnh với các dược liệu y học cổ truyền nói chung và quả Xà sàng nói riêng.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu về tính an toàn và tác dụng điều trị rối loạn sinh dục nam của cao chiết cò của quả Xà sàng (gọi tắt là OS35) trên đây, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1. Xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của OS35 trên động vật thực nghiệm

1.1. Độc tính cấp của OS35 trên chuột nhắt trắng theo đường uống

Ở những lô chuột uống OS35 liều từ 1,25 g/kg thể trọng chuột trở lên, xuất hiện chuột chết trong vòng 24 giờ sau khi uống. Xác định được LD₅₀ của OS35 trên chuột nhắt trắng theo đường uống là:

$$LD_{50} = 4,5 (2,8 - 7,1) \text{ g/kg với } p = 0,05$$

1.2. Độc tính bán trường diễn của OS35 trên chuột cống trắng theo đường uống

OS35 liều 150 mg/kg/ngày và 450 mg/kg/ngày uống trong 28 ngày liên tục không làm ảnh hưởng đến tình trạng chung, cân nặng, các chỉ số đánh giá chức năng tạo máu, chức năng gan, mức độ hủy hoại tế bào gan và chức năng lọc của thận, không ảnh hưởng đến giải phẫu bệnh gan. Tuy nhiên, trên hình ảnh mô bệnh học thận có hiện tượng viêm mạn tính.

2. Đánh giá hoạt tính androgen, tác dụng trên chức năng cương dương và hành vi tình dục của OS35 trên động vật thực nghiệm

2.1. Hoạt tính androgen của OS35

OS35 liều 150 mg/kg/ngày và 250 mg/kg/ngày có hoạt tính androgen trên chuột cống đực non thiếu: OS35 liều 150 mg/kg/ngày có tác dụng làm tăng trọng lượng 2 cơ quan (đầu dương vật và cơ nâng hậu môn – hành hang); OS35 liều 250 mg/kg/ngày có tác dụng làm tăng trọng lượng 3 cơ quan (túi tinh, đầu dương vật và cơ nâng hậu môn – hành hang).

2.2. Tác dụng trên chức năng cương dương của OS35

- **Trên thỏ:** Chiều dài dương vật ở các thời điểm 5 phút, 10 phút, 15 phút, 20 phút, 25 phút và 30 phút sau khi uống OS35 liều 60 mg/kg và thời gian đáp ứng cương tương đương với lô dùng sildenafil liều 4,5 mg/kg.

- **Trên chuột cống đực:** OS35 liều 150 mg/kg có tác dụng làm tăng ICP nền ở thời điểm 30 phút và 45 phút sau khi uống; làm tăng ICP cực đại, thời gian đáp ứng và chỉ số ICP/ huyết áp động mạch trung bình sau khi kích thích điện dây thần kinh hang ở thời điểm 15 phút, 30 phút và 45 phút sau khi uống so với khi chưa uống nhưng không ảnh hưởng đến huyết áp động mạch trung bình ở chuột.

- **Trên hành vi tình dục:** OS35 liều 150 mg/kg uống 15 phút trước khi giao cấu có tác dụng làm tăng tỉ lệ chuột nhảy, tỉ lệ chuột thâm nhập, số lần thâm nhập và rút ngắn thời gian nhảy, thời gian thâm nhập so với lô chứng không dùng thuốc.

3. Đánh giá tác dụng của OS35 trên chuột cống trắng gây suy giảm sinh sản bởi natri valproat

3.1. Tác dụng bảo vệ

OS35 liều 150 mg/kg/ngày uống trong 7 tuần liên tục có tác dụng làm tăng mật độ tinh trùng, tỉ lệ tinh trùng sống, tỉ lệ tinh trùng có tiến tới, tiến tới nhanh, giảm tỉ lệ tinh trùng không tiến tới, không di động, tăng nồng độ testosterone trong máu, tăng kích thước ống sinh tinh, cải thiện hình thái mô học tinh hoàn trên chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần; và tăng tỉ lệ thụ thai và sự phát triển phôi thai của chuột cái ghép với các chuột đực này so với lô mô hình.

3.2. Tác dụng phục hồi

OS35 liều 150 mg/kg/ngày uống trong 10 ngày sau khi uống natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần có tác dụng cải thiện các chỉ số nghiên cứu trên chuột cống đực và chuột cống cái tương tự tác dụng bảo vệ, ngoại trừ mật độ tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng sống không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình.

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu về tính an toàn và tác dụng điều trị rối loạn sinh dục nam của cao chiết cò của quả Xà sàng (gọi tắt là OS35) trên đây, chúng tôi đưa ra một số kiến nghị như sau:

1. Cần thực hiện các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác dụng của OS35.
2. Cần xác định độc tính trên sinh sản và di truyền của OS35.
3. Nếu sử dụng OS35 trên bệnh nhân, cần theo dõi sát các tác dụng không mong muốn trên tim mạch (đặc biệt tác dụng không mong muốn do giãn mạch) và theo dõi định kỳ chức năng thận, thận trọng khi sử dụng cho bệnh nhân viêm thận hoặc có bệnh lý nào khác ở thận.

CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Tạp chí Nghiên cứu Y học số 90 (5) - 2014, trang 51-57, tên bài: “*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*”
2. Tạp chí Dược học số 458 - 2014, trang 43 - 48, tên bài: “*Nghiên cứu độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của chế phẩm OS35 chiết xuất từ quả Xà sàng (*Cnidium monnieri* (L.) Cuss. trên động vật thực nghiệm*”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fouad R.Kandeel, Vivien K.T. Koussa et al. (2001). Male Sexual Function and Its Disorders: Physiology, Pathophysiology, Clinical Investigation, and Treatment. *Endocrine Reviews*, 22(3), 342-388.
2. Trần Quán Anh, Nguyễn Bửu Triều (2012). *Bệnh học giới tính nam*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
3. Andre T. Guay, Richard F. Spark et al. (2003). America Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the Evaluation and Treatment of Male Sexual Dysfunction: A Couple's Problems. *Endocrine Practice*, 9(1), 7-93.
4. Bộ Môn Y Học Cổ Truyền, Trường Đại Học Y Hà Nội (2006). *Y học cổ truyền (Đông Y)*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
5. 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, Chuyên ngành Dược lý và độc chất học, Trường Đại học Y Hà Nội.
6. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, trang 82.
7. James Chen, Wen-fei Chiou, Chen-Chih Chen and Chieh-Fu Chen (2000), Effect of the plant-extract osthol on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue in vitro, *The Journal of Urology*, Vol.163, 1975-1980.
8. Yuan J., Xie J., Li A., Zhou F. (2004). Effects of Osthole on Androgen level and nitric oxide synthetase activity in castrated rats. *Zhong Yao Cai*, 27(7), 504-506.
9. Xie Jin-xian, Wang Nai-ping, Li Ping, Li Shang-qiu, Yuan Juan-li, Li Weineng (2007), Effects of Osthole on Serum Testosterone and the Testis Androgen receptor (AR) in the reproduction system disturbance mice, *Liaoning Journal of Traditional Chineses Medicine*.

10. Keith A.Montgomery (2008). Sexual Desire Disorders. *Psychiatry*, 5(6), 50-53.
11. K.Hatzimouratidis, I.Eardley et al. (2015). *Guidelines on Male Sexual Dysfunction: Erectile dysfunction and premature ejaculation*. European Association of Urology.
12. G.M. Colpi et al. (2014). *Guidelines on Ejaculation Disorders*. European Association of Urology.
13. Rowland et al. (2010). Disorders of orgasm and ejaculation in men. *J Sex Med*, 7(4 Pt 2), 1668-1686.
14. A.Salonia et al. (2015). *Guidelines on Priapism*. European Association of Urology.
15. Harvey J., Judith Ab. (2009), Andropause in the Aging Male, *The Journal for Nurse Practitioners*, March, 207-212.
16. Laurens L.Brunton (2010). Chapter 41. Androgens. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basic of Therapeutics*, 12th edition. McGraw-Hill, 1573-1583.
17. Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội (2005). *Dược lý học lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
18. G.R.Dohle, S.Arver, C.Bettocchi, T.H.Jones, S.Kliesch, M.Punab (2015), *Guidelines on Male Hypogonadism*, European Association of Urology.
19. Moon du G, et al. The efficacy and safety of testosterone undecanoate (Nebido(R)) in testosterone deficiency syndrome in Korean: a multicenter prospective study. *J Sex Med*, 7(6), 2253-2260.
20. Amanatkar HR, et al. (2014). Impact of exogenous testosterone on mood: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Ann Clin Psychiatry*, 26(1), 19-32.

21. Schubert M., Minnemann T., and Hubler D. (2004). Intramuscular testosterone undecanoate: pharmacokinetic aspects of a novel testosterone formulation during long-term treatment of men with hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 5429-5432.
22. Swerdloff RS, et al. (2005). Transdermal androgens: pharmacology and applicability to hypogonadal elderly men. *J Endocrinol Invest*, 28(3 Suppl), 112-116.
23. Lakshman KM, et al. (2009). Safety and efficacy of testosterone gel in the treatment of male hypogonadism. *Clin Interv Aging*, 4, 397-412.
24. Wang C, et al. (2004). New testosterone buccal system (Striant) delivers physiological testosterone levels: pharmacokinetics study in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(8), 3821-3829.
25. Medras M, et al. (2006). Breast cancer and long-term hormonal treatment of male hypogonadism. *Breast Cancer Res Treat*, 96(3), 263-263.
26. Basaria S, et al. (2010). Adverse events associated with testosterone administration. *N Engl J Med*, 363(2), 109-122.
27. Finkle WD, et al. (2014). Increased risk of non-fatal myocardial infarction following testosterone therapy prescription in men. *PLoS One*, 9(1), 85803.
28. Vigen R, et al. (2013). Association of testosterone therapy with mortality, myocardial infarction, and stroke in men with low testosterone levels. *JAMA*, 310(17), 1829-1836.
29. Shores MM, et al. (2012). Testosterone treatment and mortality in men with low testosterone levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 97(6), 2050-2058.

30. Baillargeon J, et al. (2014). Risk of Myocardial Infarction in Older Men Receiving Testosterone Therapy. *Ann Pharmacother*, 48(9), 1138-1142.
31. Corona G, et al. (2014). Cardiovascular risk associated with testosterone-boosting medications: a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Saf*, 13(10), 1327-1351.
32. Gruenewald DA. and Matsumoto AM. (2003). Testosterone supplementation therapy for older men: potential benefits and risks. *JAGS*, 51, 101-113.
33. Borst SE. and Mulligan T. (2007). Testosterone replacement therapy for older men. *Clinical Interventions in Aging*, 2(4), 561-566.
34. Stanworth RD. and Jones TH. (2008). Testosterone for the aging male; current evidence and recommended practice. *Clinical Interventions in Aging*, 3 (1), 25-42.
35. H.P. Rang, M.M. Dale et al. (2012). Chapter 32. The Reproductive System. *Rang and Dale's Pharmacology*. Elsevier, Churchill Living Stone, 7th edition, 417-431.
36. Goldstein I, et al. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. (2002). *J Urol* 2002, 167(2 Pt 2), 1197-1203.
37. Curran M, et al. (2003). Tadalafil. *Drugs*, 63(20), 2203-2212.
38. Chung E, et al. (2011). A state of art review on vardenafil in men with erectile dysfunction and associated underlying diseases. *Expert Opin Pharmacother* , 12(8), 1341-1348.
39. Kyle JA, et al. (2013). Avanafil for erectile dysfunction. *Ann Pharmacother*, 47(10), 1312-1320.
40. Grossman E, Rosenthal T, Peleg E, Goldstein DS (1993). Oral yohimbine increases blood pressure and sympathetic nervous outflow in hypertensive patients. *J Cardiovasc Pharmacol*, 22, 22-26.

41. Coombs PG, et al. (2012). A review of outcomes of an intracavernosal injection therapy programme. *BJU Int*, 110(11), 1787-1791.
42. Porst H, et al. (2010). SOP conservative (medical and mechanical) treatment of erectile dysfunction. *J Sex Med*, 10(1), 130-171.
43. Padma-Nathan H, et al. (1997). Treatment of men with erectile dysfunction with transurethral alprostadil. Medicated Urethral System for Erection (MUSE) Study Group. *N Engl J Med*, 336(1), 1-7.
44. Costa P, et al. (2012). Intraurethral alprostadil for erectile dysfunction: a review of the literature. *Drugs*, 72(17), 2243-2252.
45. Padma-Nathan H, et al. (2006). An integrated analysis of alprostadil topical cream for the treatment of erectile dysfunction in 1732 patients. *Urology*, 68(2), 386-391.
46. Bechara A, et al. (1997). Comparative study of papaverine plus phentolamine versus prostaglandin E1 in erectile dysfunction. *J Urol*, 157(6), 2132-2132.
47. McMahon CG, et al. (1999). A comparison of the response to the intracavernosal injection of papaverine and phentolamine, prostaglandin E1 and a combination of all three agents in the management of impotence. *J Urol*, 162(6).
48. Khoa Y học cổ truyền, Đại học Y Hà Nội (2012). *Bệnh học nội khoa Y học cổ truyền*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
49. Đậu Xuân Cảnh (2007). *Nghiên cứu tác dụng của hải mã và sâm Việt Nam lên hình thái - chức năng của tinh hoàn chuột cống trắng trưởng thành*, Luận án Tiến sĩ Y học, Chuyên ngành Bệnh học nội khoa, Trường Đại học Y Hà Nội.
50. Trần Thanh Tùng (2009). *Nghiên cứu độc tính và tác dụng của cao lỏng Thung dung (Cistanche Deserticola Y.G.Ma) lên cấu trúc chức năng cơ quan sinh sản động vật thực nghiệm*, Luận văn Thạc sĩ Y học, Chuyên ngành Dược lý và độc chất học, Trường Đại học Y Hà Nội.

51. Đoàn Minh Thụy, Quán Hoàng Lâm và cs. (2010). Tác dụng của viên nang Hồi xuân hoàn trên chức năng tinh hoàn ở chuột cống trắng. *Tạp chí Dược học*, 408, 10-13.
52. Trần Mỹ Tiên, Nguyễn Mai Thanh Tâm, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương (2012). Nghiên cứu tác dụng hướng sinh dục nam của Ba kích (*Morinda Officinalis How.*). *Tạp chí nghiên cứu Y học TP. Hồ Chí Minh*, 16(1), 192-198.
53. 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, Số chuyên đề y học giới tính (Sexual medicine)*, 675-681.
54. 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 văn Tiến sĩ Y học, Chuyên ngành Y học cổ truyền, Viện Y học cổ truyền Quân đội.
55. J.Zhao et al. (2011). Chromones and Coumarins From the Dried Fructus of *Cnidium Monnieri*. *Fitoterapia*, 82(5), 767-771.
56. Lei Liu, Yin Wang, Hai Liang Xin, Guo Rong Fan, Qiao Yan Zhang (2012). Chemical diversity of *Cnidium monnieri* Cusson in China assessed reversed phase - high performance liquid chromatography (RP-HPLC) analysis, *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(13), 2559-2566.
57. Zhong-Rong Zhang, Wing Nang Leung, Ho Yee Cheung, Chung Wai Chan (2015). Osthole: A review on its Bioactivities, Pharmacological Properties, and Potential as Alternative Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

58. Dien PH, Nhan NT, Le Thuy HT, Quang DN (2012). Main constituents from the seeds of Vietnamese *Cnidium monnieri* and cytotoxic activity. *Nat Prod Res*, 26(22), 2107-2111.
59. Hoàng Duy Tuấn, Trần Văn Nhủ (2010). *Từ điển tra cứu Đông Y Dược*, Nhà xuất bản Tổng hợp Đồng Nai, 587.
60. Matthew Lai Yin Chan, Wendy Keung, Dennis K.Y.Yeung, Susan W.S. Leung, C.M.Che and Ricky Y.K.Man (2007). The vasorelaxation effect of osthole, derived from *Radix Angelicae Pubescentis*, in porcine coronary artery. *The FASEB Journal*, 21:878.10.
61. F. Fusi, G. Sgaragli, L. M. Ha, N. M. Cuong, and S. Saponara (2012). Mechanism of osthole inhibition of vascular Ca(v)1.2 current. *European Journal of Pharmacology*, 680,1-3,22-27.
62. Xian-Yue Wang, Wen-Peng Dong, Sheng-Hui Bi et.al., (2013). Protective effects of osthol against myocardial ischemia/ reperfusion injury in rats. *International Journal of Molecular Medicine*, 32 (2).
63. Zhou Qing et al. (1998). The Inhibitory Effects of Osthol on Central Nervous System. *Journal of Gannan Medical College*,02.
64. J. Singhuber, I. Baburin, G. F. Ecker, B. Kopp, and S. Hering (2011). Insights into structure–activity relationship of GABA_A receptor modulating coumarins and furanocoumarins. *Eur J Pharmacol*, 668(1-2), 57-64.
65. Quin LP, Zhang HM, Zhang WD (1996). Effect of osthole and total coumarins of *Fructus Cnidii* on thyroid hormone and thyrotropic hormone in kidney-yang deficiency rats. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 16(9), 552-553.

66. Song Fang, Xie Mei-lin, Zhu Lu-jia, et.al. (2008), Regulatory Mechanism of Osthol on Lipid Metabolism in Alcohol-Induced Fatty Liver Rats. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 24(7):979.
67. Liang et al. (2009). Osthole, a potential antidiabetic agent, alleviates hyperglycemia in db/db mice. *Chemico-Biological Interactions*, 181, 3, 309-315.
68. Li QN, Liang NC, Wu T, Wu Y, Xie H, Huang GD, Mo LE (1994). Effects of total coumarins of *Fructus Cnidii* on skeleton of ovariectomized rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 15(6), 528-532.
69. Wenping Zhang, Dongming Ma, Qiduo Zhao, Torao Ishida (2010). The effect of the major components of *Fructus Cnidii* on osteoblast *in vitro*. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 3(1), 32-37.
70. Matsuda H, Ido Y, Hirata A, Ino Y, Naruto S, Amamiya T, Kubo M (2002). Antipruritic effect of *Cnidium Monnieri* Fructus (fruits of *Cnidium monnieri* CUSSON). *Biol Pharm Bull*, 25(2), 260-263.
71. Wei Jia, Wen-yuan Gao, Nai-qiang Cui, Pei-gen Xiao (2003). Anti-inflammatory effects of an herbal medicine (*Xuan-Ju* agent) on carrageenan- and adjuvant-induced paw edema in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, vol 89, issue 1, 139-141.
72. Jinshu Yin¹, Haiyun Shi, Xiaorong Li, Xueyan Wang (2016). Anti-allergic effect of *Fructus Cnidii* ethanol extracts. *Biomedical Research*; 27 (2), 373-376.
73. Szu-Yuan Chou, Chun-Sen Hsu, Kun-Teng Wang, Min-Chieh Wang, Ching-Chiung Wang (2006). Antitumor effects of Osthol from *Cnidium monnieri*: an *in vitro* and *in vivo* study. *Phytotherapy Research*, 21(3), 226-230.

74. Zhang L, Jiang G, Yao F, He Y, Liang G, et al. (2012). Growth Inhibition and Apoptosis Induced by Osthole, A Natural Coumarin, in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* 7(5).
75. Lintao Wang, Yanyan Peng, Kaikai Shi, Haixiao Wang, Jianlei Lu, Yanli Li, Changyan Ma (2012). Osthole inhibits proliferation of human breast cancer cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *The Journal of Biomedical Research*, 27.
76. Ramandeep Singh, Ashraf Ali, G. Jeyabalan, Alok Semwal, Jaikishan (2013). An overview of the current methodologies used for evaluation of aphrodisiac agents. *Journal of Acute Disease*, 85-91.
77. Ågmo A. (1997). Protocol Male rat sexual behavior. *Brain Research Protocols*, 1, 203-209.
78. Hull E. M., Dominguez J. M. (2007). Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav*, 52 (1), 45-55.
79. E.Bischoff and K.Schneider (2001). A conscious-rabbit model to study vardenafil hydrochloride and other agents that influence penile erection. *International Journal of Impotence Research*, 13, 230-235.
80. Hans Gerhard Volgen (2008). Chapter A: Cardiovascular activity. *Drug discovery and evaluation: Pharmacological assays*, 3rd edition, Springer, 237-238.
81. Gordon McMurray, James H. Casey & Alasdair M. Naylor (2006). Animal models in urological disease and sexual dysfunction. *British Journal of Pharmacology*, 147, S62-S79.
82. Mehta N., Sikka S., and Rajasekaran M. (2008). Rat as an Animal Model for Male Erectile Function Evaluation in Sexual Medicine Research. *J Sex Med*, 5, 1278-1283.

83. Rehman J., Christ G., Melman A., et al. (1998). Intracavernous pressure responses to physical and electrical stimulation of the cavernous nerve in rats. *Urology*, 51 (4), 640-644.
84. Palese MA. et al. (2003). A castrated mouse model of erectile dysfunction. *Journal of andrology*, 24 (5), pp: 699-703.
85. B Grotthus, T Piasecki, M Pieniewska, P Marszalik, J Kwiatkowska, M Skrzypiec-Spring and A Szelag (2006). The Influence of prolonged β -blockers treatment on male rabbit's sexual behavior and penile microcirculation. *International Journal of Impotence Research* 19, 49-54.
86. Tocharus C. (2006). *Butea superba* Roxb. enhances penile erection in rats. *Phytother Res*, 20 (6), 484-489.
87. OECD 441 (2006). OECD guidelines for the testing of chemicals: Hershberger Bioassay in Rats: A Short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties.
88. OECD 115 (2009). OECD guidelines for the testing of chemical: Hershberger Bioassay in Rats: A Short – term Screening Assay for (Anti) Androgenic Properties.
89. Myung SO. et al. (2007). Effects of *Rubus coreanus* on sperm parameters and cAMP-responsive element modulator (CREM) expression in rat testes. *Journal of Ethnopharmacology*, 114, 463-467.
90. Kojima Y. et al. (2002). Spermatogenesis, fertility and sexual function behavior in a hypospadiac mouse model. *The journal of Urology*, 167, 1532-1537.
91. Sumanta Kumar Goswami, Mohammed Naseeruddin Inamdar, Rohitash Jamwal, Shekhar Detha (2013). Efficacy of *Cinnamomum cassia* Blume in age-induced sexual dysfunction of rats. *J Young Pharm*, 5(4), 148-153.

92. Thawatchai Prabsattroo, Jintanaporn Wattanathorn, Sitthichai Iamsaard, Supaporn Muchimapura and Wipawee Thukhammee (2012). Moringa Oleifera Leaves Extract Attenuates Male Sexual Dysfunction. *American Journal of Neuroscience*, 3(1),17-24.
93. J.H., P. (2009). Effects of heat stress on mamalian reproduction. *Phil. Trans. R. Soc. B*,364, 3341-3350.
94. Hou Y, Wang X, Lei Z et al. (2015). Heat-stress-induced metabolic changes and altered male reproductive function. *J Proteome Res*, 14(3), 1495-503.
95. Jiang Z, Xu B, Yang M, Li Z, Zhang Y, Jiang D (2013). Protection by hydrogen against gamma ray-induced testicular damage in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 112(3), 186-191.
96. Wahab N.A., Heriza W.N., et al. (2010). The effect of *Eurycoma Longifolia* Jack on spermatogenesis in estrogen-treated rats. *Clinics*,65, 93 - 98.
97. Nishimura T., Yonezawa H. . (2000). Effects of natri valproat acid on fertility and reproductive organs in male rats. *The Journal of Toxicological Sciences*,25(2), 85-93.
98. Van Thiel D.H., Lester R., et al. (1975). Alcohol-induced testicular atrophy: An experimental model for hypogonadism occuring in chronic alcoholic men. *Gastroenterology*,69, 326-358.
99. Mariane Magalhães Zanchi, Vanusa Manfredini, Daniela dos Santos Brum et.al., (2015). Green tea infusion improves cyclophosphamide-induced damage on male mice reproductive system. *Toxicology Reports*,2, 252-260.
100. Duangporn J..(2011). Mouse models in male fertility research. *Asian Journal of Andrology*,13, 139-151.

101. Ebling FJ., Nwagwu MO., Baines H., et al. (2006). The hypogonadal (hpg) mouse as a model to investigate the estrogenic regulation of spermatogenesis. *Human Fertility*, 9 (3), 127-135.
102. Walters KA., Simanainen U., and Handelsman DJ. (2010). Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Human Reproduction Update*, 16 (5), 543-558.
103. Litchfield, Wilcoxon (1948). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, pp. 99 – 113.
104. Đỗ Trung Đàm (1996). *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
105. World Health Organisation (2000). General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine.
106. Soliman G.A., Abla A.B.D., Meguid E. (1999). Effects of antiepileptic drugs carbamazepine and sodium valproat on fertility of male rats. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 106, 110-113.
107. Benjamin L.H. (1968). Sexual reflexes and mating behavior in the male rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 65(3), 453-460.
108. Nishimura T., Sakai M., Yonezawa H. (2000). Effects of natri valproat acid on fertility and reproductive organs in male rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 25(2), 85-93.
109. Bairy L., Paul V., Rao Y. (2010). Reproductive toxicity of sodium valproat in male rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 42(2), 90-94.
110. United Nations (2011). Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), 4th edition.

111. Shayne C.Gad (2002). Chapter 5: Acute toxicity testing in Drug safety evaluation. *Drug Safety Evaluation*, 2nd edition, John Wiley and Sons, Inc., New York, 130-175.
112. David Arome, Enechide Chinedu (2014). The importance of toxicity testing. *J.Pharm.BioSci*, 4, 146-148.
113. Li Weineng, Xiao Gang, Lu Di, Xie Jinxian (2013). LD(50) determination of osthole in mice. *Journal of Modern Medicine and Health*, 2013-10.
114. Nguyễn Thế Khánh, Phạm Tử Dương (2001). *Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
115. Vũ Đình Vinh (2001), *Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hoá*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
116. Wang X., Lou YJ, Wang MX, Shi YW, Xu HX, Kong LD (2012). Furocoumarins affect hepatic cytochrome P450 and renal organic ion transporter in mice. *Toxicol Lett.*, 209(1), 67-77.
117. Ho PC, Saville DJ, Wanwimolruk S (2001). Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarin and related compounds. *J Pharm Pharm Sci.*, 4(3), 2117-227.
118. Guo LQ, Yamazoe Y. (2004). Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarin in grapefruit juice and herbal medicine. *Acta Pharmacol Sin.*, 25(2), 129-136.
119. Zoe Gardner, Michael McGuffin (2013). *American Herbal Products Association's Botanical Safety Handbook*, 2nd edition, CPC Press, New York, 241-242.
120. Frank Z. Stanczyk (2009). Production, Clearance and Measurement of Steroid Hormones. *Glob.libr.women's med.*, (ISSN: 1756-2228) 2009; DOI 10.3843/GLOWM.10278.

121. Hanukoglu I., Feuchtwanger R., Hanukoglu A. (1990). Mechanism of corticotropin and cAMP induction of mitochondrial cytochrome P450 system enzymes in adrenal cortex cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(33), 20602-20608.
122. Quin LP., Zhang JQ., Shi HP. (1997). Effects of coumarins from *Cnidium monnieri* on the function of pituitary-adrenocortical axis in kidney yang deficiency rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 17(4), 227-229.
123. Taub HC., Lerner SE. (1994). Relationship between contraction and relaxation in human and rabbit corpus cavernosum. *Urology*, 2, 698-671.
124. Christ G. J. and Lue T. (2004). Physiology and biochemistry of erections. *Endocrine*, 23(2-3), 93-100.
125. Lue T.F. (2000). Erectile dysfunction. *N Engl J Med*, 342, 1802-1813.
126. Stief C.G., Uckert S., Becker A.J., Harringer W., Truss M.C., Forssmann W.G., Jonas U. (2000). Effects of sildenafil on cAMP and cGMP levels in isolated human cavernous and cardiac tissue. *Urology*, 55, 146-150.
127. Iain W.M, Noel N.K. Kwweonsik M., Irwin G., Abdulmaged M.T. (2001). Intracavernosal sildenafil facilitates Penile erection independent of nitric oxide pathway. *Journal of Andrology*, 22(4), 623-628.
128. Seong C., Luke O.C., Kweonsik M., Noel N.K. et al (2002). Efficacy of vardenafil and sildenafil in facilitating penile erection in an animal model. *Journal of Andrology*, 23(1), 232-237.
129. F. Giuliano and J. Allard (2001). Dopamine and sexual function. *International Journal of Impotence Research*, 13(3), S18-28.

130. Heaton JP. (2000). Central neuropharmacological agents and mechanisms in erectile dysfunction: the role of dopamine. *Neurosci Biobehav Rev*, 24, 561-569.
131. Tajuddin, Shamshad A., Abdul L et al. (2005). An experimental study of sexual function improving effect of *Myristica fragrans* Houtt. (nutmeg). *BMC Complement Altern Med*, 5:16. doi: 10.1186/1472-6882-5-16.
132. A.M. Senbel and T.Mostafa (2008). Yohimbine enhances the effect of sildenafil on erectile process in rats. *International Journal of Impotence Research*, 20, 409-417.
133. Gerda Fouche, Anthony J.A., Olubunmi A.W. et al. (2015). Effect of the aqueous extract of the aerial parts of *Monsonia angustifolia* E.Mey.Ex.A.Rich., on the sexual behavior of male Wistar rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15:353. doi: 10.1186/s12906-015-0880-4.
134. Joseph O.Erabor and Mac Donald Idu (2017). Aphrodisiac potentials of the ethanol extract of *Aloe barbadensis* Mill. Root in male Wistar rats. *BMC Complement Altern Med.*, 17:360, doi: 10/1186/s12906-017-1866-1.
135. D. Giuliani, A. Ottani and F.Ferrari (2002). Influence of sildenafil on copulatory behaviour in sluggish or normal ejaculator male rats: a central dopamine mediated effect?. *Neuropharmacology*, 42(4), 562-567.
136. Kyratsas C., Dalla C., Anderzhanova E. et al. (2013). Experimental evidence for sildenafil's action in the central nervous system: dopamine and serotonin changes in the medial preoptic area and nucleus accumbens during sexual arousal. *J Sex Med*, 10(3), 719-729.

137. S.J. Wang, T.Y.Lin, C.W.Lu, and W.J.Huang (2008). Osthole and imperatorin, the active constituents of *Cnidium monnieri* (L.) Cusson, facilitate glutamate release from rat hippocampal nerve terminals. *Neurochemistry International*, vol. 53, no. 6-8, 416-423.
138. T.Y.Lin, C.W.Lu, W.J.Huang, and S.J.Wang (2012). Involvement of the cGMP pathway in the osthole-facilitated glutamate release in rat hippocampal nerve endings. *Synapse*, vol. 66, no. 3, pp. 232-239.
139. Juan M.D., Elaine M.H. (2005). Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. *Physiology and Behavior*, 86, 356-368.
140. National Institute for Health and Care Excellence (2012). "The epilepsies: the diagnosis and management of the epilepsies in adults and children in primary and secondary care", 137, 23-40.
141. Vijay P., Yeshwanth R., Bairy K.L., et al. (2008). The effect of sodium valproate on the biochemical parameters of reproductive function in male albino Wistar rats. *Indian J Pharmacol.*, 40(6), 248-250.
142. Guyton and Hall (2006). Unit XIV. Endocrinology and Production. *Textbook of Medical Physiology*. Elsevier Saunders, Philadelphia, 828-1052.
143. Sayaka Aizawa, Takafumi Sakai, Ichiro Sakata (2015). Chapter 5. The role of glutamine and glutamic acid in the pituitary gland involvement in Thyroid-Stimulating Hormone release. *Glutamine in Clinical Nutrition*. Hamana Press, London, 67-76.