

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN ĐẶT VẤN ĐỀ

Suy giảm chức năng sinh dục nam 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. Hiện nay, một xu hướng phổ biến là phát hiện và nghiên cứu các thuốc điều trị có nguồn gốc từ dược liệu. Quả Xà sàng (tên khoa học là *Cnidium monnieri* (L.) Cuss.), là một dược liệu có sẵn ở Việt Nam được sử dụng từ lâu đời để điều trị suy giảm sinh dục ở nam giới. Tuy nhiên, ở nước ta và trên thế giới, cho đến nay vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về độc tính và tác dụng điều trị của quả Xà sàng. Vì vậy, 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:

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.

Tính cấp thiết của luận án

Suy giảm chức năng sinh dục ở nam giới là một tình trạng bệnh lý thường gặp và ngày càng tăng ở nam giới; ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng cuộc sống của người bệnh. Việc tìm kiếm các thuốc an toàn, hiệu quả có nguồn gốc dược liệu có tác dụng điều trị bệnh lý này là rất cần thiết, đặc biệt ở một nước có nguồn dược liệu dồi dào và nền y học cổ truyền lâu đời như ở Việt Nam. Quả Xà sàng là một dược liệu có sẵn ở Việt Nam, được ghi nhận trong các tài liệu y dược học cổ truyền có tác dụng cường dương, ích thận, chữa liệt dương. Cho đến nay, ở nước ta cũng như trên thế giới có ít nghiên cứu về an toàn và hiệu quả của dược liệu này. Bên cạnh đó, việc sử dụng nguyên liệu nghiên cứu là cao chiết cồn của quả Xà sàng (trong đó osthol chiếm 35%), một dạng bào chế hiện đại hóa thuốc y học cổ truyền, dẫn đến thuận lợi hơn cho người bệnh trong quá trình điều trị.

Những đóng góp mới của luận án

Luận án cung cấp những bằng chứng khoa học chứng minh tính an toàn và hiệu quả điều trị của chế phẩm OS35 (chiết xuất từ Quả Xà sàng). Bằng những thực nghiệm trên động vật (chuột nhắt, chuột cống, thỏ), luận án chứng minh OS35 tương đối an toàn; đồng thời đã khẳng định được tác dụng và định hướng được cơ chế tác dụng gây cương dương, tăng cường hành vi tình dục của OS35. Ngoài ra, OS35 còn được chứng minh có hoạt tính androgen, có tác dụng cải thiện chức năng sinh sản và hình thái cơ quan sinh dục trên chuột cống đực gây suy giảm sinh sản; từ đó, làm tăng thêm giá trị điều trị của Xà sàng và lưu ý các nhà lâm sàng trong sử dụng thuốc.

Luận án áp dụng 2 phương pháp mới để đánh giá ảnh hưởng của OS35 trên chức năng cương dương, bao gồm: đánh giá khả năng cương trên thỏ tỉnh theo

phương pháp của Hans Gerhard Volgen và đo áp lực thể hang trên chuột cống gây mê theo phương pháp của Mehta.

Bộ cục của luận án

Luận án có 161 trang, bao gồm các phần: đặt vấn đề (2 trang), tổng quan (37 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (17 trang), kết quả (53 trang) bao gồm 37 bảng, 7 biểu đồ, 22 hình, bàn luận (49 trang), kết luận (2 trang), kiến nghị (1 trang). Luận án có 141 tài liệu tham khảo (tiếng Anh và tiếng Việt).

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Khái niệm suy sinh dục nam

Suy giảm chức năng sinh dục nam là một tình trạng bệnh lý bao gồm: giảm 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.

1.2. Các thuốc điều trị suy giảm chức năng sinh dục nam theo y học hiện đại

Luận án này tổng quan các kiến thức về các thuốc thường được sử dụng để điều trị suy sinh dục nam, bao gồm: liệu pháp bổ sung hormon testosterone, các thuốc ức chế phosphodiesterase V 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. 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.

1.2.1.2. Chống chỉ định

- 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).

1.2.2. Thuốc điều trị rối loạn cương dương: Thuốc ức chế phosphodiesterase V

1.2.2.1. Cơ chế tác dụng thuốc ức chế PDEV

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.

1.2.2.2. Chỉ định và chống chỉ định của thuốc ức chế PDEV

- Chỉ định: 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.

- Chống chỉ định:

+ Quá mẫn với các thành phần nào của 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 mạc sắc tố do rối loạn PDEV võng mạc di truyền).

1.3. Tổng quan về Xà sàng

1.3.1. Xà sàng

Xà sàng có tên khoa học là *Cnidium monnieri* (L.) Cuss., thuộc họ Hoa tán *Umbelliferae*. Thành phần chính trong quả Xà sàng là osthol. 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. Liều dùng 4 đến 12 g dưới dạng thuốc sắc uống riêng hoặc phối hợp với các vị thuốc khác.

1.3.2. Các nghiên cứu về quả Xà sàng liên quan đến sinh dục, sinh sản

James Chen và cs. (2000): osthol làm giãn cơ trơn thể hang, có thể do cơ chế làm tăng giải phóng NO từ nội mạc hoặc do ức chế PDE. Yuan J. và cs (2004): osthol làm tăng nồng độ testosterone, LH, FSH và hoạt độ NOS trên chuột cống đực non thiếu. Xie Jin-xian (2007): osthol làm tăng nồng độ testosterone trong máu và tăng biểu hiện của receptor androgen ở tinh hoàn trên chuột gây suy giảm sinh sản bằng cyclophosphamid.

Chương 2.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu: Chế phẩm OS35 là cao chiết còn 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 TCCS, chứa osthol chiếm 35% với hệ suất chiết là 3%. Dung môi pha thuốc là dung dịch CMC 0,5%.

2.2. Đối tượng nghiên cứu: Chuột nhắt trắng chủng *Swiss*, chuột cống trắng chủng *Wistar*, thỏ chủng *Newzealand White*.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nghiên cứu độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của OS35

2.3.1.1. Độc tính cấp của OS35 theo đường uống trên chuột nhắt trắng:

Chuột nhắt trắng 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. 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. Nếu chuột chết, mổ chuột để đánh giá đại thể các tổn thương của các cơ quan. Xác định LD₅₀ theo phương pháp Litchfield-Wilcoxon theo tỷ lệ chuột chết trong vòng 72 giờ đầu.

2.3.1.2. Độc tính bán trường diễn của OS35 theo đường uống trên chuột cống trắng:

Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên làm 3 lô, uống thuốc trong 4 tuần:

- 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
- Lô trị 2: uống chế phẩm OS35 liều 450 mg/kg thể trọng/ngày

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 (albumin và cholesterol toàn phần). Đánh giá mức độ hủy hoại tế bào gan (ALT, AST). Đánh giá chức năng lọc cầu thận (creatinin). Sau 4 tuần, 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 mỗi lô.

2.3.2. Nghiên cứu hoạt tính androgen của OS35 trên chuột cống đực non thiên: Áp dụng mô hình Hershberger trên chuột cống đực non

Chuột cống đực non 42 - 50 ngày tuổi. Thiên chuột, cắt 2 tinh hoàn; nghỉ ngơi 7 ngày. Sau đó, chia chuột ngẫu nhiên vào 5 lô, mỗi lô 10 con, như sau, uống thuốc trong vòng 10 ngày:

- + 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

- Đến ngày thứ 11 (24 giờ sau khi uống liều thuốc cuối cùng), cân trọng lượng, mổ chuột. Các chỉ số nghiên cứu: Trọng lượng chuột, trọng lượng cơ quan sinh dục phụ (túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn-hành hang, đầu dương vật), nồng độ testosterone máu.

2.3.3. Nghiên cứu tác dụng của OS35 trên chức năng cương dương

2.3.3.1. Tác dụng của OS35 trên khả năng cương dương ở thỏ: theo Hans Gerard Volgen

- Thỏ được 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:

+ 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 thô mà chụp ảnh, sau đó, sử dụng phần mềm Image J để đo.

+ Thời gian dương vật trở lại bình thường.

2.3.3.2. *Ảnh hưởng của OS35 lên áp lực thể hang (ICP: theo phương pháp Mehta.*

- Chuột cống đực, trưởng thành được chia ngẫu nhiên thành 2 lô, uống thuốc 1 lần:

+ Lô 1 (n = 8): uống sildenafil liều 10 mg/kg.

+ Lô 2 (n = 7): uống OS35 liều 150 mg/kg.

- Chuột được gây mê bằng dung dịch ketamin liều 25 mg/kg, 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, đặt catheter 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 đo ICP.

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

+ Bước 5: Kích thích điện dây thần kinh. Đo áp lực thể hang, huyết áp động mạch sau khi kích thích. Số lần kích thích là 1 lần trước khi uống thuốc và 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

- Chỉ số nghiên cứu: trước khi dùng thuốc, 15 phút, 30 phút và 45 phút sau khi dùng thuốc: ICP nền, ICP cực đại sau kích thích thần kinh hang, thời gian đáp ứng, huyết áp động mạch trung bình (MAP), ICP cực đại/MAP.

2.3.4. *Tác dụng trên hành vi tình dục trên chuột cống đực trưởng thành: Theo của Agmo*

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

Chuột đực nuôi ổn định trong chu kỳ sáng - tối đảo ngược trong 3 tuần.

2.3.4.2. *Giai đoạn chuẩn bị chuột cái (gây động dục nhân tạo)*

Chuột cái được mổ cắt buồng trứng, nghỉ ngơi 14 ngày. Trước khi tiến hành ghép đôi với chuột đực, chuột cái được 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.

2.3.4.3. *Giai đoạn huấn luyện (3 đợt)*

- Nhốt mỗi chuột đực vào chuồng riêng. 5 phút sau, đưa 1 chuột cái gây động dục vào.

- Đánh giá các hành vi của chuột đực bao gồm: nhảy cái (mounting), thâm nhập âm đạo (intromission), xuất tinh (ejaculation).

- Trong quá trình ghép đôi đực - cái, quan sát và đánh giá các chỉ số sau:

- **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;

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. Quá trình quan sát được ghi lại bằng camera, sau đó sẽ được nghiên cứu viên đọc và xử lý kết quả, tính ra các chỉ số nghiên cứu.

2.3.4.4. Giai đoạn sàng lọc (4 đợt)

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

2.3.4.5. 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

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

2.3.5. Nghiên cứu tác dụng của OS35 trên chuột cống trắng đực bị gây suy giảm sinh sản bởi natri valproat

2.3.5.1. Nghiên cứu tác dụng bảo vệ của OS35 trên chuột cống trắng đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Chuột cống đực trưởng thành, chia ngẫu nhiên vào 3 lô, uống thuốc 2 lần/ngày, cách nhau ít nhất 2 giờ; trong 7 tuần.

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

- Lô 2: Lần 1 uống natri valproat 500 mg/kg/ngày; lần 2 uống dung môi pha thuốc

- Lô 3: Lần 1 uống natri valproat 500 mg/kg/ngày; lần 2 uống OS35 150mg/kg/ngày

Sau 5 tuần, tiến hành ghép ngẫu nhiên 1 chuột đực với 2 chuột cái trong 2 tuần.

- Với chuột đực, tiến hành mổ sau 7 tuần uống thuốc 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, tinh trùng.

+ 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 (%).

2.3.5.2. *Nghiên cứu tác dụng phục hồi của OS35 trên chuột cống trắng đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat*

Chuột cống đực được chia ngẫu nhiên vào 3 lô, được cho uống thuốc:

+ Lô 1: Uống natri clorid 0,9% 10ml/kg/ngày trong 7 tuần đầu + CMC 10 ngày.

+ Lô 2: Uống natri valproat 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần đầu + CMC 10 ngày.

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

Sau 10 ngày uống thuốc thử hoặc dung môi pha thuốc, tiến hành ghép ngẫu nhiên chuột đực với 2 chuột cái trong 2 tuần. Sau đó, đánh giá các chuột tương tự như mô hình bảo vệ.

2.6. Xử lý số liệu: Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Stata 3.0, sử dụng test thống kê thích hợp. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Chương 3.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nghiên cứu độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của OS35

3.1.1. *Nghiên cứu độc tính cấp của OS35 theo đường uống trên chuột nhắt trắng*

Lô chuột uống liều từ 1,25 g/kg trở lên, 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. 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.

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

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

3.1.2. *Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của OS35 trên chuột cống trắng*

3.1.2.1. *Tình trạng chung và cân nặng chuột*

Chuột ở các lô ăn uống, hoạt động bình thường, không có dấu hiệu bất thường. Cân nặng chuột 2 và 4 tuần sau khi uống thuốc ở các lô đều tăng rõ rệt so với trước khi uống thuốc ($p < 0,05$) và không có sự khác biệt khi so sánh các lô với nhau ($p > 0,05$).

3.1.2.2. Chức năng tạo máu

OS35 liều 150 mg/kg/ngày và 450 mg/kg/ngày không làm ảnh hưởng đến số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng và công thức bạch cầu, số lượng tiểu cầu sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc ($p > 0,05$).

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

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của OS35 đến nồng độ albumin và cholesterol trong máu

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	

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

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của OS35 đến hoạt độ AST và ALT trong máu

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	

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

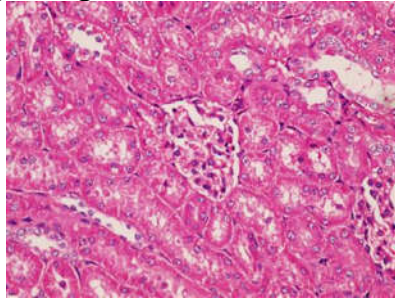
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của OS35 đến nồng độ creatinin trong máu

Thời gian	Creatinin (micromol/l)			p (t- test Student)
	Lô chứng	Lô trị 1	Lô trị 2	
Trước uống	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	

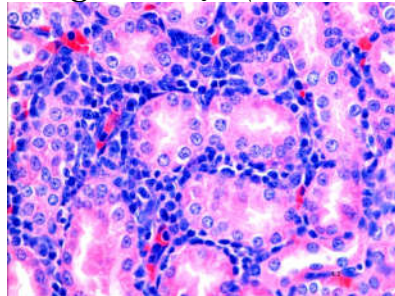
OS35 liều 150 mg/kg/ngày và 450 mg/kg/ngày không làm ảnh hưởng đến nồng độ albumin, cholesterol, hoạt độ AST, ALT cũng như nồng độ creatinin trong máu chuột cống trắng sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc ($p > 0,05$).

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

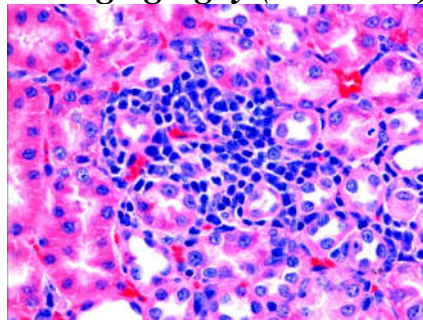
- Cấu trúc vi thể gan: Không có sự khác biệt giữa 2 lô dùng OS35 với lô chứng. Cấu trúc gan không bị đảo lộn. Tất cả vùng tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy gan và vùng khoảng cửa không xơ hóa, không xâm nhập viêm, không tăng sinh ống mật.
- Cấu trúc vi thể thận: Ở lô chứng và 2 lô trị dùng OS35, các cầu 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. Các lô uống OS35, 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)



Hình 3.5. Hình ảnh vi thể thận chuột cống trắng sau 4 tuần uống thuốc lô OS35 150 mg/kg/ngày (HE x 400)



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

3.2. Nghiên cứu hoạt tính androgen của OS35 trên chuột cống đực non thiếu
OS35 150 mg và 250 mg/kg/ngày làm tăng trọng lượng 2 hoặc 3 cơ quan sinh dục phụ và làm tăng nồng độ testosterone trong máu trên chuột cống đực non thiếu ($p < 0,05$).

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của OS35 lên trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ

Lô	n	Trọng lượng cơ quan sinh dục (mg/100g thể trọng)				
		Túi tinh	T.T.Liệt	Đầu DV	T.Cowper	Cơ nâng
Lô 1	7	11,30 ± 1,18	7,00 ± 1,55	20,07 ± 1,29	1,97 ± 0,30	20,74 ± 2,77
Lô 2	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 50	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
Lô 4: OS35 150	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
Lô 5: OS35 250	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

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của OS35 lên nồng độ testosterone trong máu

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
Lô 4: OS35 150mg/kg	7	0,62 ± 0,17
p ₄₋₁		< 0,05
Lô 5: OS35 250mg/kg	7	3,69 ± 1,04
p ₅₋₁		< 0,05

3.3. Nghiên cứu tác dụng của OS35 trên chức năng cương dương**3.3.1. Nghiên cứu tác dụng của OS35 trên khả năng cương dương ở thỏ****Bảng 3.14. 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	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

Bảng 3.15. 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

3.3.2. Nghiên cứu tác dụng của OS35 lên áp lực thể hang (ICP) trên chuột cống
 OS35 liều 150 mg/kg có tác dụng làm tăng ICP nền, ICP cực đại và thời gian đáp ứng với kích thích có ý nghĩa thống kê và tác dụng tương đương sildenafil ($p < 0,05$) mà không làm ảnh hưởng đến huyết áp động mạch trung bình ($p > 0,05$).

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của OS35 lên ICP nền

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	30,90 ± 3,01	30,22 ± 3,24
$p_{\text{trước-sau}}$			< 0,05	< 0,05	< 0,05
Lô 2: OS35	7	23,63 ± 1,54	31,51 ± 3,87	31,02 ± 1,32	32,31 ± 1,09
$p_{\text{trước-sau}}$			> 0,05	< 0,05	< 0,05
p_{2-1}		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của OS35 lên ICP cực đại sau khi kích thích

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	56,60 ± 6,26	54,86 ± 7,40
$p_{\text{trước-sau}}$			< 0,01	< 0,05	< 0,01
Lô 2: OS35	7	43,14 ± 4,10	58,52 ± 5,22	55,57 ± 3,97	59,43 ± 4,72
$p_{\text{trước-sau}}$			< 0,01	< 0,01	< 0,01
p_{2-1}		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

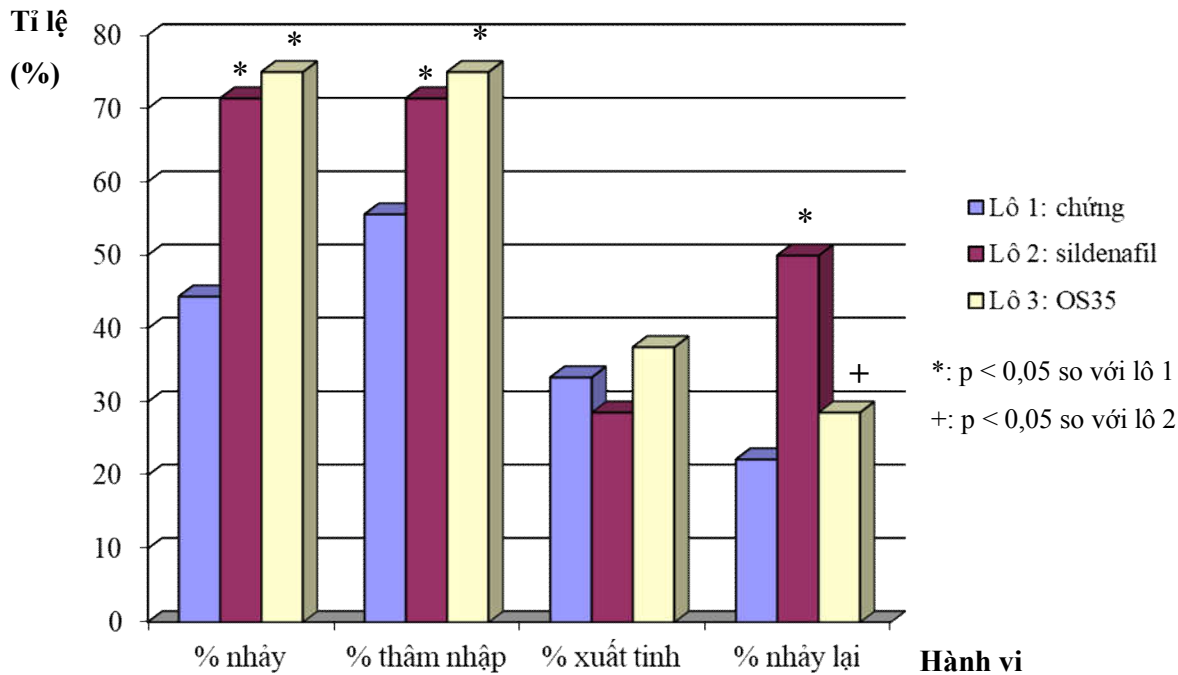
Bảng 3.18. Ảnh hưởng của OS35 lên thời gian đáp ứng

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	179,74 ± 24,32	124,23 ± 19,52
$p_{\text{trước-sau}}$			< 0,05	< 0,05	< 0,05
Lô 2: OS35	7	129,08 ± 6,36	172,97 ± 40,09	151,46 ± 18,65	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

Bảng 3.19. 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	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

3.4. Tác dụng của OS35 trên hành vi tình dục trên chuột 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 đực trưởng thành

OS35 150 mg/kg làm tăng tỉ lệ chuột nhảy, chuột thâm nhập, số lần thâm nhập và giảm thời gian nhảy, thời gian thâm nhập có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$) và tương đương sildenafil ($p > 0,05$).

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của OS35 lên số lần nhảy (MF), số lần thâm nhập (IF)

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}		$> 0,05$	$< 0,05$
Lô 3: OS35 150mg/kg	8	1 (0 – 1)	24 (1 – 36)
p_{3-1}		$> 0,05$	$< 0,05$

Bảng 3.22. Ảnh hưởng của OS35 lên thời gian nhảy (ML), thời gian thâm nhập (IL)

Lô	n	Thời gian (giây)	
		ML	IL
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}		$< 0,05$	$< 0,05$
Lô 3: OS35 150mg/kg	8	18,00 ± 10,27	52,50 ± 21,38
p_{3-1}		$< 0,05$	$< 0,05$

3.5. Tác dụng của OS35 trên chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bởi natri valproat

3.5.1. Tác dụng bảo vệ của OS35

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

Chuột ở lô 2 (mô hình) có trọng lượng các cơ quan sinh dục giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$). Chuột ở lô 3 dùng OS35 có trọng lượng các cơ quan sinh dục không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 2 ($p > 0,05$).

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

Bảng 3.25. 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	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>

Bảng 3.26. 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

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		<u>< 0,001</u>	<u>< 0,001</u>	<u>< 0,05</u>	<u>< 0,001</u>
Lô 3 - Valproat + OS35	11	30,00 ± 2,78	21,27 ± 2,53	5,00 ± 0,50	65,00 ± 2,71
p ₃₋₁		<u>< 0,05</u>	<u>< 0,01</u>	<u>< 0,05</u>	<u>< 0,05</u>
p ₃₋₂		<u>< 0,01</u>	<u>< 0,01</u>	<u>< 0,01</u>	<u>< 0,05</u>

Bảng 3.27. 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

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	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>

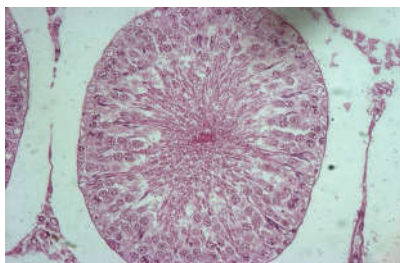
Bảng 3.28. Ảnh hưởng của OS35 lên nồng độ testosterone trong máu chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat trên mô hình bảo vệ

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

OS35 150 mg/kg/ngày trong 7 tuần làm tăng có ý nghĩa thống kê mật độ tinh trùng, tỉ lệ tinh trùng sống, tỉ lệ tinh trùng có tiền tới, tiến tới nhanh, giảm tỉ lệ không tiến tới, không di động; tăng tỉ lệ bình thường, giảm tỉ lệ bất thường, tăng nồng độ testosterone máu ($p < 0,05$).

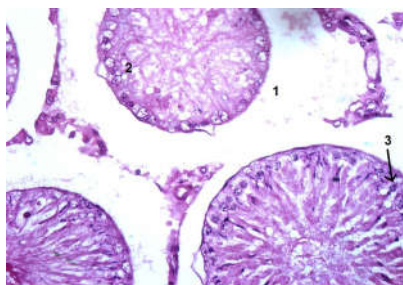
3.5.1.3. Ảnh hưởng lên hình thái mô học của tinh hoàn.

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 3.14. Hình thái mô học tinh hoàn chuột ở lô chứng mô hình bảo vệ (H.E x 1000)

Lô 2: 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 3.16. Hình thái mô học tinh hoàn chuột lô mô hình trên mô hình bảo vệ (H.E x 1000)

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.



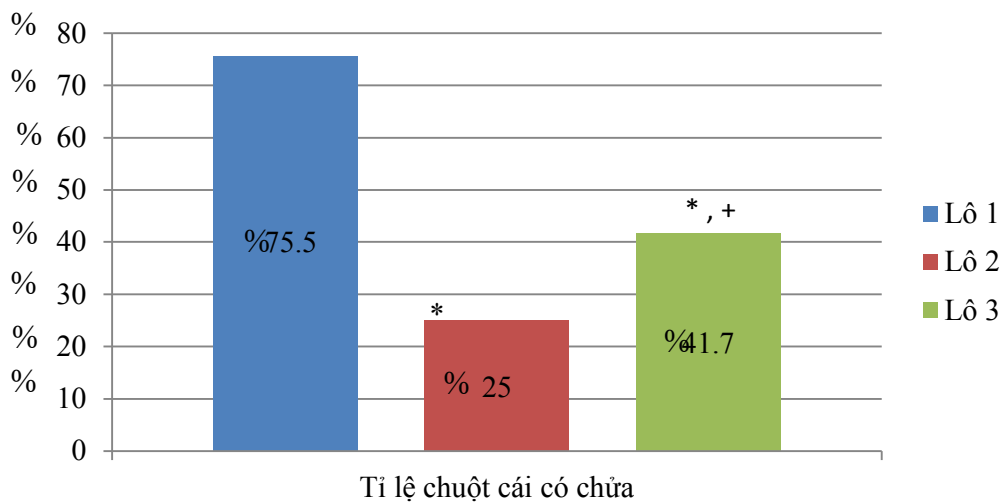
Hình 3.17. Hình thái mô học tinh hoàn chuột lô dùng thuốc thử OS35 kèm natri valproat trên mô hình bảo vệ (H.E x 1000)

Bảng 3.29. 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

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

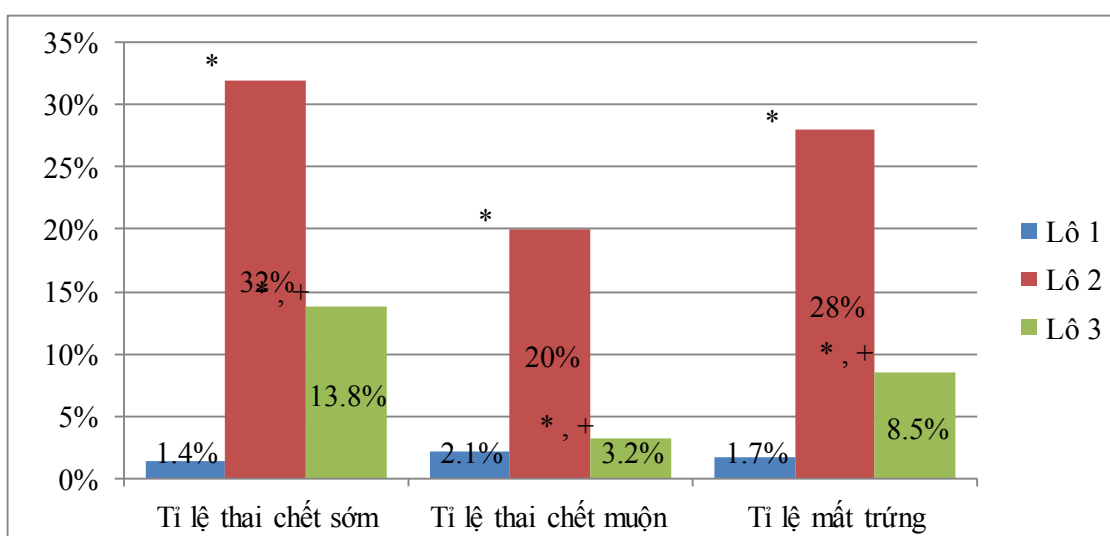
OS35 làm tăng tỉ lệ chuột cái có thai, tăng số thai đậu, số thai bình thường, giảm tỉ lệ thai chết sớm/ chết muộn/ mất trứng trên chuột cái có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,05$).



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

Bảng 3.30. 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/ 1 chuột mẹ	Lô nghiên cứu					
	Lô 1	Lô 2	p ₂₋₁	Lô 3	p ₃₋₁	p ₃₋₂
Số hoàng thể	10,14 ± 1,57	9,50 ± 2,12	> 0,05	10,20 ± 1,69	> 0,05	> 0,05
Số thai đậu	10,00 ± 1,73	6,50 ± 0,71	< 0,01	9,40 ± 2,22	> 0,05	< 0,05
Số thai bình thường	9,71 ± 2,06	5,00 ± 1,41	< 0,001	7,80 ± 1,93	< 0,05	< 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

3.5.2. Nghiên cứu 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

Chuột ở lô 2 (mô hình) có trọng lượng các cơ quan sinh dục giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$). Chuột ở lô 3 dùng OS35 có trọng lượng các cơ quan sinh dục không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$).

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

OS35 150 mg/kg/ngày uống trong 10 ngày chưa làm thay đổi mật độ tinh trùng, tỉ lệ tinh trùng sống so với lô mô hình ($p > 0,05$); làm tăng tỉ lệ tinh trùng tiến tới, tiến tới nhanh, giảm tỉ lệ tinh trùng không di động; tăng tỉ lệ tinh trùng bình thường, giảm tỉ lệ tinh trùng bất thường; tăng nồng độ testosterone trong máu ($p < 0,05$).

Bảng 3.32. Ảnh hưởng của OS35 lên mật độ tinh trùng, 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		< 0,01	< 0,01
Lô 3 - Valproat + OS35	8	137,50 ± 10,54	76,63 ± 2,92
p ₃₋₁		< 0,05	< 0,05
p ₃₋₂		> 0,05	> 0,05

Bảng 3.33. 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	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

Bảng 3.34. 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

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		< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,001
Lô 3 Valproat+OS35	11	42,63 ± 0,96	32,25 ± 1,42	11,63 ± 1,03	13,50 ± 1,38
p ₃₋₁		< 0,01	< 0,01	> 0,05	> 0,05
p ₃₋₂		< 0,001	< 0,01	< 0,05	< 0,01

Bảng 3.35. 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

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

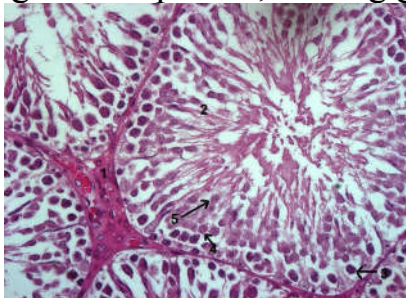
Lô 1– Chứng sinh học: các ống sinh tinh tròn căng, vỏ xơ mỏng; đa số các ống có lòng hẹp, chứa nhiều tinh trùng. Biểu mô tinh dày, có đủ các loại tế bào dòng tinh: tinh nguyên bào, tinh bào, tiền tinh trùng và tinh trùng. Mô kẽ thưa thớt, các mạch máu trong mô kẽ nhỏ.



Hình 3.18. Hình thái mô học tinh hoàn chuột lô chứng sinh học mô hình phục hồi (H.E x 1000)

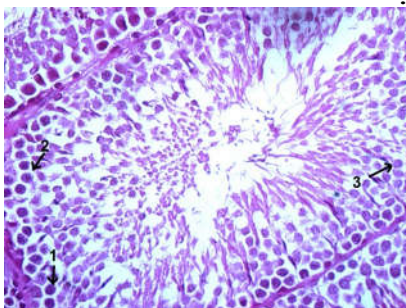
1. Mô kẽ 2. Ống sinh tinh

Lô 2 – Lô mô hình: 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 mức độ vừa đến nặng. Mô kẽ phù nề, khoảng gian bào rất rộng.



Hình 3.20. Hình thái mô học tinh hoàn chuột lô mô hình trên mô hình phục hồi (H.E x 1000)

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 tròn, 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 mức độ nhẹ đến vừa.



Hình 3.22. Hình thái mô học tinh hoàn chuột lô phục hồi trên mô hình phục hồi (H.E x 1000)

1. Tinh nguyên bào 2. Tinh bào 3. Tiền tinh trùng

Bảng 3.36. 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		< 0,01
Lô 3 - Valproat + OS35 150 mg/kg/ngày	10	125,53 ± 1,65
p ₃₋₁		> 0,05
p ₃₋₂		< 0,05

3.5.2.4. Ảnh hưởng lên các chỉ số nghiên cứu trên chuột cái
 Kết quả thu được tương tự nghiên cứu trên mô hình bảo vệ.

Chương 4.

BÀN LUẬN

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

4.1.1. Nghiên cứu độc tính cấp của OS35 theo đường uống trên chuột nhắt trắng

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. 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.

4.1.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của OS35 trên chuột cống trắng

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. 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.

4.1.2.2. Ảnh hưởng của OS35 đến chức năng tạo máu

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 đánh giá sự thay đổi và khả năng ảnh hưởng tới cơ quan tạo máu của thuốc. Kết quả nghiên cứu cho thấy OS35 liều 150 mg/kg/ngày và 450 mg/kg/ngày không làm ảnh hưởng đến các chỉ số đánh giá chức năng tạo máu sau 2 tuần và 4 tuần uống so với trước khi uống và so với lô chứng.

4.1.2.3. Ảnh hưởng của OS35 trên chức năng gan, thận trên chuột cống trắng

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. Ngoài ra, gan là cơ quan có nhiều chức năng đối với quá trình chuyển hoá các chất, trong đó có chuyển hoá protein, lipid. Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt độ AST, ALT,

nồng độ albumin và cholesterol trong huyết thanh ở 2 lô uống thuốc thử OS35 không thay đổi 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 mức độ hủy hoại tế bào gan và chức năng chuyển hoá protein, lipid của gan.

Thận là cơ quan tiết niệu, có vai trò quan trọng bậc nhất để đảm bảo sự hằng định nội môi. Kết quả nghiên cứu cho thấy 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 .

Nghiên cứu cấu trúc vi thể gan ở lô 2 lô dùng OS35 cho thấy không có gì bất thường và khác biệt ở 2 lô dùng OS35 so với lô chứng sinh học. Kết quả này tương ứng với kết quả nghiên cứu về hoạt độ AST và ALT trong huyết thanh.

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.

4.2. Nghiên cứu hoạt tính androgen của OS35 trên chuột cống đực non thiếu

Theo OECD, khi khối lượng của ít nhất hai trong số năm cơ quan sinh dục phụ tăng có ý nghĩa thống kê so với chuột không dùng thuốc thì thuốc được coi là có hoạt tính androgen. Kết quả nghiên cứu cho thấy: khi dùng OS35 trong 10 ngày liên tục, liều 50 mg/kg/ngày chỉ làm tăng trọng lượng cơ nâng hậu môn – hành hang, liều 150 mg/kg/ngày làm tăng trọng lượng cơ nâng hậu môn – hành hang và đầu dương vật, còn liều 450 mg/kg/ngày làm tăng trọng lượng cơ nâng hậu môn – hành hang, đầu dương vật và tuyến Cowper. Như vậy, OS35 liều 150 mg/kg và 250 mg/kg thể hiện hoạt tính androgen trên chuột cống đực non thiếu và làm tăng nồng độ testosterone có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Yuan J. (2004) cho thấy osthon làm tăng nồng độ testosterone trong máu trên chuột cống đực thiếu.

4.3. Nghiên cứu tác dụng của OS35 trên chức năng cương dương

4.3.1. Tác dụng của OS35 trên khả năng cương dương ở thỏ đực trưởng thành

Kết quả nghiên cứu cho thấy lô thỏ dùng thuốc thử OS35 và sildenafil 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 khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô dùng sildenafil ($p > 0,05$).

4.3.2. Tác dụng OS35 trên áp lực thể hang (ICP) ở chuột cống đực trưởng thành

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

Lô chuột dùng sildenafil, ở thời điểm sau uống thuốc 15 phút, 30 phút và 45 phút, giá trị ICP nền tăng nhẹ so với thời điểm trước khi uống thuốc. 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.

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. 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.

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

Sildenafil làm tăng rõ rệt ICP cực đại sau khi kích thích điện dây thần kinh hang cũng như thời gian đáp ứng với kích thích. Điều này có thể dễ dàng giải thích vì cơ chế tác dụng của sildenafil là ức chế đặc hiệu enzym PDEV. 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. Lô chuột dùng OS35 cũng có ICP cực đại, thời gian đáp ứng với kích thích tăng rõ rệt so với ICP nền. 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. 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.

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 ($p < 0,01$).

4.4. Tác dụng của OS35 trên hành vi tình dục ở chuột công đực trưởng thành

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.

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. 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 ($p < 0,05$).

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. 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. 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.

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 nên làm tăng khả năng và sức mạnh giao cấu của chuột cống đực.

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

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. Có nhiều yếu tố chi phối quá trình xuất tinh. Kết quả nghiên cứu cho thấy liều đơn OS35 150 mg/kg chưa làm thay đổi thời gian xuất tinh ở chuột cống đực.

4.5. Nghiên cứu 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 gây suy giảm sinh sản trên chuột cống đực

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. 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 .

4.5.2. Nghiên cứu 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. Ảnh hưởng trên trọng lượng các cơ quan sinh dục

Trọng lượng các cơ quan sinh dục của chuột dùng OS35 ở cả mô hình bảo vệ và phục hồi đều không thay đổi có ý nghĩa thống kê so với lô gây suy giảm sinh sản. 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.

4.5.2.2. Ảnh hưởng mật độ và độ di động và hình thái 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. Kết quả nghiên cứu cho thấy OS35 làm tăng rõ rệt mật độ tinh trùng ở mô hình và tỉ lệ tinh trùng sống ở mô hình bảo vệ; trong khi không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mô hình phục hồi. Sự khác biệt này có thể do khác nhau về thời gian dùng thuốc ở mô hình bảo vệ chỉ 7 ngày, trong khi 1 chu kỳ sinh tinh kéo dài khoảng 6- 8 tuần.

Ngoài ra, OS35 cải thiện rõ rệt độ di động tinh trùng và 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) trên cả mô hình phục hồi và bảo vệ.

4.5.2.3. Ảnh hưởng lên nồng độ testosterone trong máu

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.

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

Kết quả mô học ở lô 3 cho thấy, OS35 có xu hướng duy trì sự toàn vẹn cấu trúc tinh hoàn, 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 ($p < 0,001$).

4.5.2.5. Ảnh hưởng lên các chỉ số nghiên cứu ở chuột cái

Trên cả mô hình bảo vệ và phục hồi, OS35 có tác dụng làm tăng tỉ lệ chuột cái có chửa, tăng số thai đậu, số thai phát triển bình thường, giảm tỉ lệ thai chết sớm/ chết muộn trên những chuột cái ghép với chuột đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat.

KẾT LUẬN

1. 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: LD₅₀ = 4,5 (2,8 - 7,1) 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. 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 nên 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. 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 công 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.

INTRODUCTION

Male sexual dysfunction is a condition that includes disorders of sexual desire, erectile function, ejaculation, orgasm and detumescence. Currently, a common trend over the world is to detect and study medications derived from medicinal herbs. Fruits of *Cnidium monnieri* (L.) Cuss.) is a long-standing Vietnamese medicinal product used to treat male sexual and reproductive disorders. However, there have been few studies on toxicity as well as effects on reproductive function, sexual behavior, erectile function of the fruits. Therefore, in order to prove the safety and efficacy of OS35 (ethanol fruit extracts of *Cnidium monnieri*) in treatment, the research on the toxicity and effects of OS35 on reproductive function was conducted.

Objectives:

1. To determine of acute and subchronic toxicity of OS35 in experimental animals.
2. To evaluate the androgenic activity, effects on erectile function and sexual behaviors of OS35 in experimental animals.
3. To evaluate the effects of OS35 on reproductive declining male rats caused by sodium valproate.

Necessity of the thesis

Male sexual dysfunction is becoming a common disorder in men that greatly affects the patient's quality of life. The search for safe and effective drugs derived from medicinal herbs is useful for treating this disease, especially in a country with abundant sources of medicinal herbs and traditional medicine as in Vietnam. *Cnidium monnieri* is a medicinal product available in Vietnam, which is documented to treat erectile and reproductive disorders in traditional medicine. So far, in our country as well as in the world, there are few studies on the safety and effectiveness of this medicinal herb. Therefore, the thesis is conducted to provide evidence of safety and efficacy for the clinical use of OS35 (in which osthol accounts for 35%). In addition, the use of alcohol extraction, a form of modern medicine remedies, help the traditional medicine to become more favorable.

New contributions of the thesis

1. This thesis provided scientific evidence of safety and effectiveness of OS35 extracted from *Cnidium monnieri*. Through the experiments in animals (eg. mice, rats, rabbits), OS35 was proved to be relatively safe and effective in treating disorders of erectile function and sexual behaviors. Moreover, OS35 had androgenic properties and improved the structure and function of reproductive organs in fertility declining male rats.
2. Two new methods were applied to access the effects of OS35 on erectile function: evaluating conscious rabbits' erection according to Hans Gerhard Vogen's method and monitoring anesthetized rats' intracavenous pressure according to Mehta's method.

Thesis outline

The thesis consists of 162 pages, including: introduction (2 pages), overview (34 pages), object and methods (17 pages), results (53 pages which consists of 37 tables, 7 charts, 22 figures), discussion (49 pages). 141 English and Vietnamese references.

Chapter 1. OVERVIEW

1.1. Definition of male sexual dysfunction

Male sexual dysfunction is a condition that includes sexual desire disorders, erectile dysfunction, ejaculatory disorders, orgasm disorders and failure of detumescence. This condition is becoming more common in men, that greatly affects the patient's quality of life.

1.2. Medications for treating male sexual dysfunction according to modern medicine

This thesis reviews the knowledge of 2 drug groups commonly used to treat male sexual dysfunction, including: testosterone therapy and phosphodiesterase (PDE) V inhibitors.

1.2.1. Testosterone therapy

1.2.1.1. Indications

Testosterone replacement therapy for male hypogonadism when testosterone deficiency has been confirmed by clinical features and biochemical tests. The purpose of testosterone supplements is to restore testosterone levels to normal physiological limits in men with low testosterone levels, accompanied by symptoms of testosterone depletion; and improving the quality of life, fullness, genitalization, muscular strength and bone mineral density.

1.2.1.2. Contraindications

- Hypersensitivity to the drug.
- Past or present liver tumor.
- Androgen-dependent carcinoma of the prostate or of the male mammary gland
- Severe sleep apnea.
- Hematocrite > 54%.
- Lower urinary tract disorders due to benign prostatic hyperplasia.
- Severe chronic heart failure (NYHA IV).

1.2.2. PDEV inhibitors

1.2.2.1. Mechanism

Sildenafil is a potent and selective inhibitor of cGMP specific phosphodiesterase type V (PDEV) in the corpus cavernosum, where PDEV is responsible for degradation of cGMP. Sildenafil has no direct relaxant effect on isolated human corpus cavernosum but potently enhances the relaxant effect of NO on this tissue. When the NO/cGMP pathway is activated, as occurs with sexual stimulation, inhibition of PDEV by sildenafil results in increased corpus cavernosum levels of cGMP. Therefore sexual stimulation is required in order for sildenafil to produce its intended beneficial pharmacological effects.

1.2.2.2. Indications and contraindications

- Indications: Sildenafil is indicated in adult men with erectile dysfunction, which is the inability to achieve or maintain a penile erection sufficient for satisfactory sexual performance.

- Contraindications:

+ Hypersensitivity to the drug.

+ Co-administration with nitric oxide donors or nitrates in any form.

+ Men for whom sexual activity is inadvisable (e.g. patients with severe cardiovascular disorders such as unstable angina or severe cardiac failure).

+ Patients who have loss of vision in one eye because of non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy (NAION), regardless of whether this episode was in connection or not with previous PDEV inhibitor exposure.

+ Severe hepatic impairment, hypotension (blood pressure < 90/50 mmHg), recent history of stroke or myocardial infarction and known hereditary degenerative retinal disorders such as retinitis pigmentosa.

1.3. Overview of *Cnidium monnieri*

1.3.1. *Cnidium monnieri*

The scientific name is *Cnidium monnieri* (L.) Cuss., *Umbelliferae* family. Fructus cnidii is the dried fruit of the tree. The main ingredient in the fruit is osthole. According to Do Tat Loi, the fruit has a bitter taste, slightly poisonous, enhances erection and is used to treat impotence. Dosages range from 4 g to 12 g in the form of oral medications or in combination with other drugs

1.3.2. Studies on the effects on *Cnidium monnieri* in the treatment of reproductive and sexual dysfunction

James Chen et al. (2000) showed that osthole increased smooth muscle relaxation by releasing nitric oxide from the endothelium or inhibiting PDE. Yuan J. et al. (2004) showed that osthole increased testosterone levels, LH, FSH and NOS activity in non-castrated male rats. Xie Jin-xian (2007) showed that osthole increased testosterone levels in the blood and the expression of androgens in the testes in rats causing reproductive decline with cyclophosphamide.

Chapter 2.

OBJECTS AND METHODS

2.1. Materials

OS35 (ethanol extract of fruits of *Cnidium monnieri*); produced by Institute of Natural Product Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology). Osthole accounts for 35%. Extraction rate 3%.

2.2. Objects: Swiss mice, Wistar rats, Newzealand White rabbits.

2.3. Methods

2.3.1. Acute and subchronic toxicity of OS35 in experimental animals

2.3.1.1. Acute oral toxicity of OS35 in mice: Litchfield – Wilcoxon's method.

Mice weighing 20 ± 2 g were divided into batches, each of 10. Each dose of OS35 was administered from the highest non-lethal dose to the lowest dose that killed

100% mice. Mice were fasted for 12 hours before taking the medication, still drinking of water. The number of dead mice were recorded during the first 72 hours and the general condition of mice were accessed within 7 days after taking the drug. If the mouse died, it was removed to access the extent of organ damage. Determination of 50% mortality (LD₅₀) according to mice mortality within the first 72 hours.

2.3.1.2. Subchronic oral toxicity of OS35 in rats: WHO guidelines.

Rats were randomized into 3 batches, taking the drugs orally for 4 weeks:

- Batch 1 (control): CMC 0.5% 10 ml / kg body weight / day
- Batch 2 (treatment 1): OS35 150 mg / kg body weight / day
- Batch 3 (treatment 2): OS35 450 mg / kg body weight / day

Parameters for follow-up at baseline (N0), after 2 weeks (N14) and 4 weeks (N28), included: general status, body weight. Parameters for hematopoietic function: number of red blood cells, average red cell volume, hemoglobin content, hematocrit, leukocyte count, leukocyte formula and platelet count . Evaluation of liver function through the determination of certain metabolites in the blood: albumin and total cholesterol. Evaluation of liver damage by quantitative enzyme activity in blood: ALT, AST. Evaluation of glomerular filtration function by quantifying creatinine concentration in blood. Histopathology: After 4 weeks of treatment, the rats were operated to observe the whole body. Randomized examination of the liver and kidney structure of 30% of rats in each batch.

2.3.2. Androgenic activity of OS35 in castrated peripubertal male rats: Hershberger Bioassay

42-50 day-old rats were removed 2 testicles and taken care to rest for 7 days. Then, they were randomly divided into 5 batches, taking the drugs for 10 days:

- + Batch 1: oral CMC 10 ml/kg/day
- + Batch 2: subcutaneous testosterone at a dose of 0.4 mg/kg/day
- + Batch 3: oral OS35 at the dose of 50 mg/kg/day
- + Batch 4: oral dose of OS35 150 mg/kg/day
- + Batch 5: oral dose of OS35 250 mg/kg/day

24 hours after taking the last dose, parameters were evaluated: body weight, blood testosterone level weight for five target androgen-dependent tissues including ventral prostate (VP), seminal vesicle (SV), levator ani-bulbocavernosus (LABC) muscle, paired Cowper's glands (COW) and the glans penis (GP).

2.3.3. Effects of OS35 on erectile function

2.3.3.1. Effects of OS35 on conscious adult male rabbits' erection: Hans Gerard Volgen's method

- Adult male rabbits were placed in quiet room, minimizing any stimulation. Rabbits were randomly divided into 2 batches and given orally:

- + Batch 1: sildenafil 4.5 mg/kg
- + Batch 2: OS35 60 mg/kg

- After taking medicine, the researchers started to observe the rabbit to evaluate:

+ Penis length every 5 minute until the the erection completed. Researchers did not directly measure the length of the penis to avoid direct stimulation to rabbits, but to use the Image J software to measure the length of the penis.

+ The duration of erection.

2.3.3.2. Effects of OS35 on intracavernous pressure (ICP) in anesthetized adult male rats: Mehta's method

- Male adult rats are randomized into 2 batches and were given orally:

+ Batch 1: sildenafil 10 mg/kg.

+ Batch 2: OS35 150 mg/kg.

- Preparation:

+ Rats were anesthetized by ketamine at the dose of 25 mg/kg.

+ Powerlab system, stimulating electrode, pressure transducer, Labchart software were connected.

- Experiments:

+ Step 1: The carotid artery was exposed and a catheter was inserted.

+ Step 2: The cavernous nerve was exposed.

+ Step 3: The corpora cavernosa was exposed and inserted with a 25G needle, connected to a PE-50 tube containing 100 µl of heparin to measure ICP.

+ Step 4: Monitor ICP and blood pressure before stimulating cavernous nerve.

+ Step 5: The cavernous nerve was electrical stimulated with a rhythm stimulator connected to the bipolar electrode. The stimulation was 1 time before giving drug and 3 times after giving drugs (15 minutes, 30 minutes and 45 minutes after the drug), each stimulation lasted 1 minute. Electric stimulation is 5V, frequency 20 Hz, pulse width 2 ms.

+ Step 6: Data were analyzed offline using Labchart pro software.

- Parameters: basal ICP, ICPmax after cavernous nerve stimulation, response duration, mean arterial pressure (MAP), ICPmax/MAP.

2.3.4. Effects of OS35 on sexual behavior in adult male rats: Agmo's method

2.3.4.1. Adaptive phase: All rats were kept stable in the reversed light-dark cycle for 3 weeks prior to the experiments.

2.3.4.2. Preparing female rats

Female rats were induced sexual reception artificially by the following method: Two ovaries were removed. After surgery, rats received postoperative care and rest for 14 days. Before mating with male rats, the females were injected subcutaneous estradiol benzoate 20 micrograms/rat 52 hours before coupling and progesterone 1000 micrograms/rat 4 hours later (48 hours before coupling).

2.3.4.3. Training period (3 tests)

- Male rats were transported to individual cage.5 minutes later, 1 receptive female was introduced. The following sexual behaviors of male rats were observed: mounting, intromission and ejaculation.

- Parameters were evaluated: MF (mounting frequency), ML (mounting latency): time from the introduction of female until the first mout, IF (intromission

frequency), IL (intromission latency): time from introduction of female until the first intromission, EL (ejaculation latency): time from the first intromission until ejaculation, PEI (post ejaculation interval): time from ejaculation until the next intromission.

The experiment ended when PEI was recorded or ML, IL > 15 minutes, EL > 30 minutes, PEI > 15 minutes. Rats' coupling was recorded by cameras and the researchers watched video later to calculate the parameters.

2.3.4.4. Screening tests (4 tests)

After 3 training tests, 4 screening tests were carried out to classify male rats. The male rats that did not complete at least 1 screening test were taken in to experimental tests.

2.3.4.5. Experimental tests

- Selected rats from screening tests were randomly divided into 3 batches and given orally:
 - + Batch 1 (n = 9): CMC 10 ml/kg
 - + Batch 2 (n = 7): sildenafil 10 mg/kg 30 minutes before coupling
 - + Batch 3 (n = 8): OS35 150mg/kg 15 minutes before coupling.
- Male rats were coupled with the female. Male sexual behaviors were observed and parameters were evaluated.

2.3.5. Effects of OS35 on reproductive declining male rats caused by sodium valproate

2.3.5.1. Preventive effects of OS35 on reproductive declining male rats caused by sodium valproate

Adult male rats were randomized into 3 batches, given orally twice a day, the interval at least 2 hour:

- Batch 1: sodium chloride 0.9% 10 ml kg/day + CMC
- Batch 2: sodium valproate 500 mg/kg/day + CMC
- Batch 3: sodium valproate 500 mg/kg/day + OS35 150 mg/kg/day

The medication lasted for 7 weeks. 5 weeks after 1st medication, 1 male rat was coupled randomly with 2 untreated virgin females randomly for 2 weeks.

-After the last medication, male rats were evaluated the following parameters:

- + Reproductive organs' weight: testicles, ventral prostate, seminal vesicles, levator ani-bulbocavernosus muscle, paired Cowper's glands and the glans penis
- + Sperm concentration and vitality
- + Sperm motility (rate of progressive, rapidly progressive, slowly progressive, non-progressive, immotile sperms)
- + Sperm morphology and testicular histology
- + Blood testosterone level.
- Pregnant female rats were examined on days 14- 17 of gestation to evaluate the following parameters: percentage of pregnant females, number of corpus luteum, number of implantation, alive/ early dead/ late dead fetus and lack egg.

2.3.5.2. Restorative effects of OS35 on reproductive declining male rats caused by sodium valproate

Adult male rats were randomized into 3 batches, given orally:

- Batch 1: sodium chloride 0.9% 10 ml/kg/day for 7 weeks + CMC for 10 days
- Batch 2: sodium valproate 500 mg/kg/day for 7 weeks + CMC for 10 days
- Batch 3: sodium valproate 500 mg/kg/day for 7 weeks + OS35 150 mg/kg/day for 10 days

After the last dose, 1 male rat was coupled randomly with 2 untreated virgin females randomly for 2 weeks. Male rats were evaluated after 2 week coupling and pregnant females were examined on days 10-15 of gestation.

2.4. Data analysis

Experimental groups were analyzed for significance of differences between treatment groups and control groups by Stata 3.0 software. The difference between two groups is judged to be statistically significant when $p \leq 0.05$.

Chapter 3. RESULTS

3.1. Acute and subchronic toxicity of OS35 in experimental animals

3.1.1. Acute oral toxicity in mice

Mice at the dose of 1.25 g/kg or more, mice was slow, inhibited, immobilized and ate nothing. 30 minutes after dosing, mice became dyspnea, foaming and then suffered from respiratory distress, seizure. Some mice dead within 24 hours. The number of dead mice at each dose was recorded to calculate LD₅₀. All dead mice's heart, lung and liver were found hyperemia.

Table 3.1. Ratio of dead mice

No.	Dose of OS35 (g/kg)	Number of dead mice	Percentage (%)
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

Oral LD₅₀ of OS35 in mice: LD₅₀ = 4.5 (2.8 - 7.1) g/kg with $p = 0.05$.

3.1.2. Subchronic oral toxicity in rats

3.1.2.1. General condition and body weight:

There was no abnormal observation in all rats. OS35 150 mg/kg/day and 450 mg/kg/day did not affect general condition, body weight.

3.1.2.2. Hematopoietic function

OS35 150 mg/kg/day and 450 mg/kg/day did not affect red blood cell count, hemoglobin, hematocrite, MCV, white blood cell count and formula, and platelet

count 2 weeks and 4 weeks after drug administration. There was no statistical difference between these groups and control group ($p > 0,05$).

3.1.2.3. Effects of OS35 on liver function in rats

Table 3.7. Effects of OS35 on albumin and cholesterol levels in rats

Time	Albumin (g/l)			Cholesterol (mmol/l)			p(t- test Student)
	Control	OS35 150	OS35 450	Control	OS35 150	OS35 450	
N0	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
N14	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	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	
N28	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	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	

3.1.2.4. Effects of OS35 on liver damage in rats

Table 3.8. Effects of OS35 on AST and ALT values in rats

Time	AST (UI/l)			ALT (UI/l)			p(t- test Student)
	Control	OS35 150	OS35 450	Control	OS35 150	OS35 450	
N0	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
N14	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	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	
N28	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	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	

3.1.2.5. Effects of OS35 on kidney function in rats

Table 3.9. Effects of OS35 on creatinin level in rats

Time	Creatinin (micromol/l)			p (t- test Student)
	Control	OS35 150	OS35 450	
N0	42.50 ± 2.69	44.87 ± 7.40	39.73 ± 2.56	> 0.05
N14	52.25 ± 2.61	49.33 ± 5.65	53.78 ± 5.67	> 0.05
p	> 0.05	> 0.05	> 0.05	
N28	43.25 ± 2.61	41.90 ± 5.07	37.78 ± 1.63	> 0.05
p	> 0.05	> 0.05	> 0.05	

OS35 150 mg/kg/day and 450 mg/kg/day did not blood albumin, cholesterol, AST, ALT and creatinin level in rats 2 weeks and 4 weeks after drug administration. There was no statistical difference between these groups and control group ($p > 0,05$).

3.1.2.6. Effects of OS35 on histopathology of liver and kidney

- Liver histopathology: There was no difference between the two OS35 treatment groups with control group. The structure of the liver is not affected. Fibrosis, inflammation and bile duct proliferation were observed in the liver centrilobular venules and portal space.

- Kidney histopathology: The glomerulus were within normal range in all rats. No inflammation, fibrosis or cell proliferation were observed in the glomerulus. However, some chronic inflammation with lymphocytes and fibrosis were found in the mesangium in rats that were given OS35 150 and 450 mg/kg/day for 4 weeks.

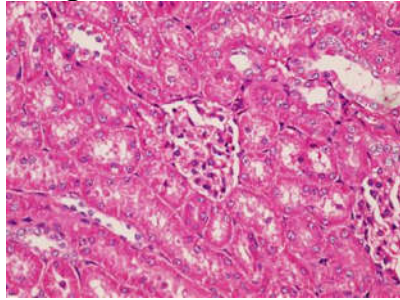


Figure 3.4. Kidney histopathology of rats in control group after 4 weeks (HE x 400)

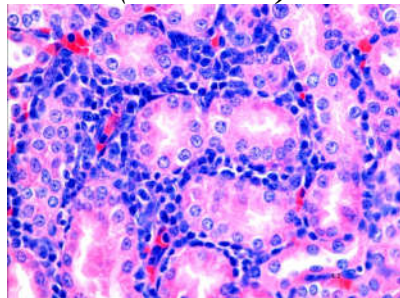


Figure 3.5. Kidney histopathology of rats in OS35 150 mg/kg group after 4 weeks (HE x 400)

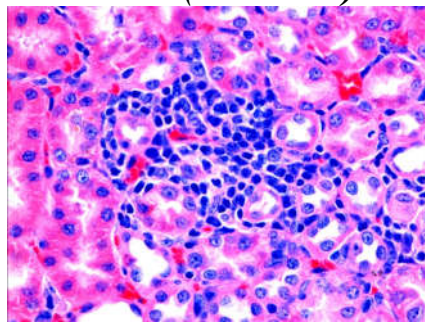


Figure 3.6. Kidney histopathology of rats in OS35 450 mg/kg group after 4 weeks (HE x 400)

3.2. Androgenic activity of OS35 in castrated immature male rats

OS35 150 mg/kg and 450 mg/kg/day for 10 days increased the weight of 2 or 3 secondary reproductive organs and blood testosterone levels in rats compared with untreated castrated rats.

Table 3.11. Effects of OS35 on reproductive organ weight in castrated rats

Batch	n	Reproductive organ weight (mg/100g body weight)				
		Seminal testicles	Ventral prostate	Glans penis	Cowper's gland	Levator muscle
1: CMC	7	11.30 ± 1.18	7.00 ± 1.55	20.07 ± 1.29	1.97 ± 0.30	20.74 ± 2.77
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
3: OS35 50	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
4: OS35 150	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
5: OS35 250	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

Table 3.12. Effects of OS35 on testosterone level in castrated rats

Batch	n	Testosterone level (nmol/l)
Batch 1: CMC	7	0.14 ± 0.04
Batch 2: Testosterone	8	31.73 ± 7.91
p ₂₋₁		< 0.01
Batch 3: OS35 50mg/kg	7	0.17 ± 0.04
p ₃₋₁		> 0.05
Batch 4: OS35 150mg/kg	7	0.62 ± 0.17
p ₄₋₁		< 0.05
Batch 5: OS35 250mg/kg	7	3.69 ± 1.04
p ₅₋₁		< 0.05

3.3. Effects of OS35 on erectile function

3.3.1. Concious adult male rabbit's erection

Table 3.14. Effect of OS35 on rabbits' penis length

Batch	n	Penis length (mm)					
		5 minutes	10 minutes	15 minutes	20 minutes	25 minutes	30 minutes
Batch 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
Batch 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

Table 3.15. Effect of OS35 on rabbits' erection duration

Batch	n	Duration (minutes)
Batch1: Sildenafil	6	43.33 ± 6.96
Batch2: OS35 60mg/kg	6	38.33 ± 5.68
p ₃₋₁		> 0.05

3.3.2. Effects of OS35 on intracavernous pressure (ICP) in adult male rats

OS35 at the dose of 150 mg/kg increased basal ICP before cavernous nerve stimulation, ICP max and response duration after nerve stimulation but did not affect MAP. The difference between OS35 and sildenafil was not statically significant ($p > 0,05$).

Table 3.16. Effects of OS35 on basal ICP before stimulating the nerve

Batch	n	Basal ICP (mmHg)			
		Before	15minutes	30 minutes	45 minutes
Batch 1: Sildenafil	8	19.70 ± 1.36	30.47 ± 2.87	30.90 ± 3.01	30.22 ± 3.24
$p_{\text{before-after}}$			< 0.05	< 0.05	< 0.05
Batch 2: OS35	7	23.63 ± 1.54	31.51 ± 3.87	31.02 ± 1.32	32.31 ± 1.09
$p_{\text{before-after}}$			> 0.05	< 0.05	< 0.05
p_{2-1}		> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

Table 3.17. Effects of OS35 on ICP max after stimulating the carvenal nerve

Batch	n	ICP max (mmHg)			
		Before	15 minutes	30 minutes	45 minutes
Batch1: sildenafil	8	37.89 ± 6.78	53.69 ± 6.19	56.60 ± 6.26	54.86 ± 7.40
$p_{\text{before-after}}$			< 0.01	< 0.05	< 0.01
Batch2: OS35	7	43.14 ± 4.10	58.52 ± 5.22	55.57 ± 3.97	59.43 ± 4.72
$p_{\text{before-after}}$			< 0.01	< 0.01	< 0.01
p_{2-1}		> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

Table 3.18. Effects of OS35 on response duration

Batch	n	Response duration (mmHg)			
		Before	15 minutes	30 minutes	45 minutes
Batch1: sildenafil	8	90.81± 21.41	157.26±22.28	179.74±24.32	124.23 ±19.52
$p_{\text{before-after}}$			< 0.05	< 0.05	< 0.05
Batch2: OS35	7	129.08 ±6.36	172.97±40.09	151.46±18.65	119.32 ±20.03
$p_{\text{before-after}}$			> 0.05	< 0.05	> 0.05
p_{2-1}		> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

Table 3.19. Effects of OS35 on MAP (median arterial pressure)

Batch	n	Median arterial pressure (mmHg)			
		Before	15 minutes	30 minutes	45 minutes
Batch1: sildenafil	8	106.89 ± 7.53	106.08 ± 8.58	101.35 ± 5.82	100.52 ± 6.14
$p_{\text{before-after}}$			> 0.05	> 0.05	> 0.05
Batch2: OS35 150mg/kg	7	108.60 ± 3.28	105.16 ± 2.32	104.21 ± 1.81	102.39 ± 2.10
$p_{\text{before-after}}$			> 0.05	> 0.05	> 0.05
p_{2-1}		> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

3 4. Effects of OS35 on adult male rats' sexual behavior

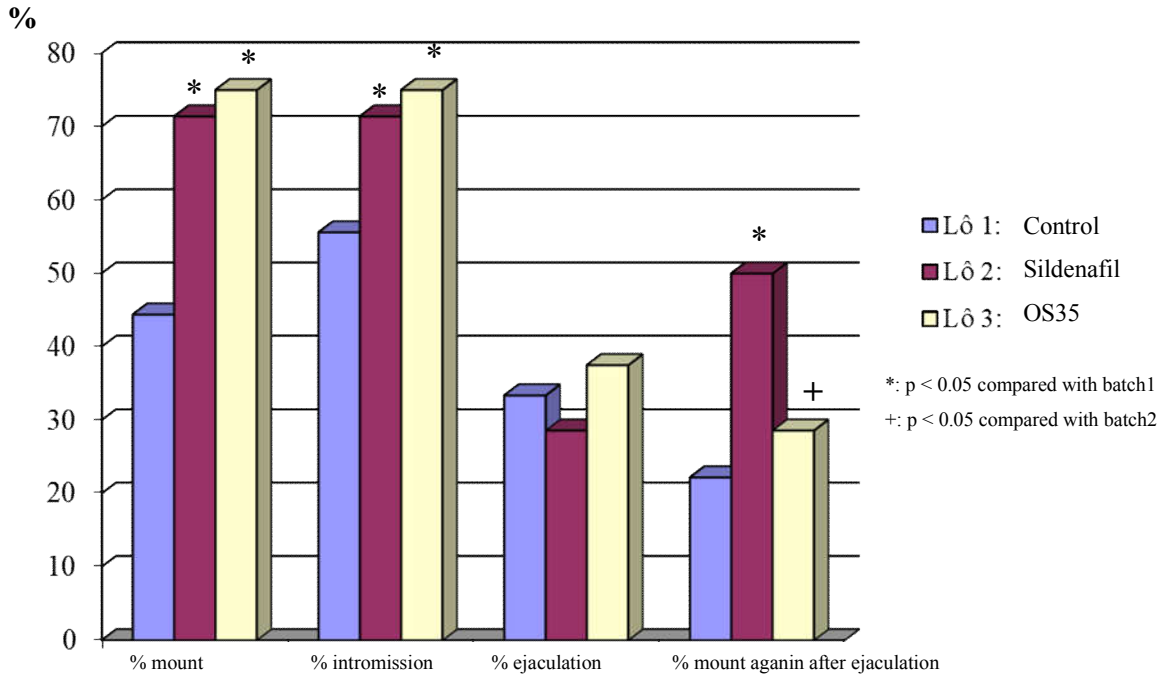


Chart 3.3. Effects of OS35 on the percentage of male rats that mounted, intromitted, ejaculated and mounted again after ejaculating

OS35 150 mg/kg significantly decreased ML, IL and increased IF compared with control group ($p < 0.05$). The effect of OS35 was similar to sildenafil ($p > 0.05$). OS35 150 mg/kg did not affect EL, PEI ($p > 0.05$).

Table 3.21. Effects of OS35 on MF, IF

Batch	n	Median (min – max)	
		MF	IF
Batch1: CMC	9	0 (0 – 1)	9 (0 – 29)
Batch2: sildenafil	7	1 (0 – 1)	26 (22 – 30)
p ₂₋₁		> 0.05	< 0.05
Batch3: OS35 150mg/kg	8	1 (0 – 1)	24 (1 – 36)
p ₃₋₁		> 0.05	< 0.05

Table 3.22. Effects of OS35 on ML, IL

Batch	n	Time (seconds)	
		ML	IL
Batch1: CMC	9	1019.40 ± 308.60	844.11 ± 302.62
Batch2: sildenafil	7	32.20 ± 5.93	391.16 ± 282.71
p ₂₋₁		< 0.05	< 0.05
Batch3: OS35 150mg/kg	8	18.00 ± 10.27	52.50 ± 21.38
p ₃₋₁		< 0.05	< 0.05

3.5. Effects of OS35 on adult reproductive declining male rats caused by sodium valproate

3.5.1. Preventive effects of OS35

3.5.1.1. Preventive effects of OS 35 on reproductive organ weight

OS35 did not affect the reproductive organ weight of adult reproductive declining male rats caused by sodium valproate compared with untreated rats.

3.5.1.2. Preventive effects of OS35 on sperm concentration and vitality

Table 3.25. Preventive effects of OS35 on sperm concentration and vitality

Batch	n	Sperm	
		Concentration (10 ⁶ /mL)	Vitality (%)
Batch1- NaCl + CMC	10	235.13 ± 15.08	85.88 ± 1.64
Batch2 - Valproate + CMC	9	110.78 ± 18.94	64.56 ± 4.09
p ₂₋₁		< 0.01	< 0.001
Batch3 - Valproate + OS35	13	187.09 ± 11.28	79.45 ± 2.09
p ₃₋₁		< 0.05	< 0.05
p ₃₋₂		< 0.01	< 0.01

Table 3.26. Preventive effects of OS35 on sperm motility

Batch	n	Percentage (%)			
		Progressive	Rapidly progressive	Non-progressive	Immotile
Batch1- NaCl + CMC	8	39.63 ± 2.18	35.50 ± 2.15	5.88 ± 0.44	54.50 ± 2.31
Batch2 - Valproate+ 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
Batch3 - Valproate+ OS35	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

Table 3.27. Preventive effects of OS35 on sperm morphology

Batch	n	Normal (%)	Abnormal (%)		
			Head	Midpiece	Tail
Batch1- NaCl + CMC	8	48.88 ± 1.43	25.50 ± 0.94	12.00 ± 0.87	13.63 ± 0.89
Batch2 - Valproate + CMC	9	22.67 ± 1.03	38.11 ± 1.03	16.67 ± 0.97	22.56 ± 1.80
p ₂₋₁		< 0.001	< 0.001	< 0.05	< 0.01
Batch3 - Valproate + OS35	11	41.18 ± 1.66	30.73 ± 1.70	12.73 ± 1.18	15.36 ± 1.06
p ₃₋₁		< 0.01	< 0.05	> 0.05	> 0.05
p ₃₋₂		< 0.001	< 0.01	< 0.05	< 0.01

Table 3.28. Preventive effects of OS35 on testosterone level

Batch	n	Testosterone level (nmol/l)
Batch1- NaCl + CMC	8	17.12 ± 2.00
Batch2 - Valproate + CMC	9	8.89 ± 1.70
p ₂₋₁		< 0.05
Batch3 - Valproate + OS35 150 mg/kg/day	11	14.16 ± 1.71
p ₃₋₁		> 0.05
p ₃₋₂		< 0.05

OS35 150 mg/kg/day for 7 weeks increased significantly sperm concentration, vital rate, proportion of progressive and normal sperm, decreased proportion of non-progressive and immotile as well as abnormal sperm. OS35 also increased blood testosterone level ($p < 0.05$).

3.5.1.3. Preventive effects of OS35 on testicular histology

Batch 1 (control): Stretched spermatophores, thin filamentous cortex, narrow tubes, and spermatozoa. Thick epithelium, all kinds of neoplasmic stem cells: spermatogonia, spermatozoa, spermatocytes and sperm. Sparse tissue, blood vessels in the interstitium.

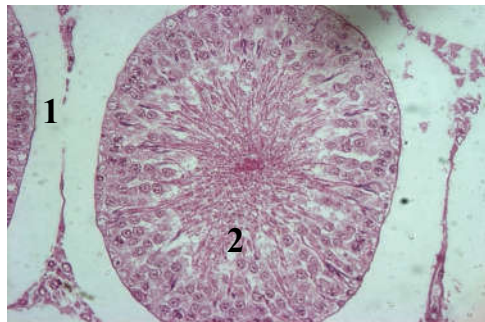


Figure 3.14. Testicular histology in control rats (H.E x 1000)

1. Interstitial tissue, 2. Seminiferous tubules

Batch 2 (sodium valpoate reproductive declining male rats): some wrinkled seminal vesicles; thin, broad-tube, sphincter tube has no sperm. Tubes with small spermatozoa, thin epithelia, were mainly small number of spermatozoa. The number of spermatozoa with very small sperm counts, the cytoplasm of the spermatozoa was severely degenerated. The proliferation of many cells, blood vessels filled with red blood cells.

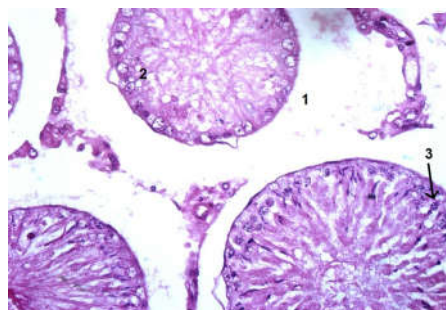


Figure 3.16. Testicular histology in reproductive declining rats (H.E x 1000)

Batch 3 (sodium valpoate reproductive declining male rats given OS35): 62.5% of reproductive declining male rats had testicular histology within normal range.



Figure 3.17. Testicular histology in reproductive declining rats given OS35 150 mg/kg (H.E x 1000)

1. Interstitial tissue, 2. Seminiferous tubules

Table 3.29. Preventive effects of OS35 on spermatophore diameter

Batch	n	Spermatophore diameter
Batch1- NaCl + CMC	10	128.21 ± 2.72
Batch2 - Valproate + CMC	8	92.62 ± 3.27
p ₂₋₁		< 0.001
Batch3 - Valproate + OS35 150 mg/kg/day	10	112.04 ± 2.84
p ₃₋₁		< 0.001
p ₃₋₂		< 0.001

3.5.1.4. Preventive effects of OS35 on parameters in untreated female rats coupled with male reproductive declining rats

OS35 increased significantly the proportion of pregnant female rats, number of implantation and alive fetus; decreased the dead fetus and lack egg ($p < 0.05$).

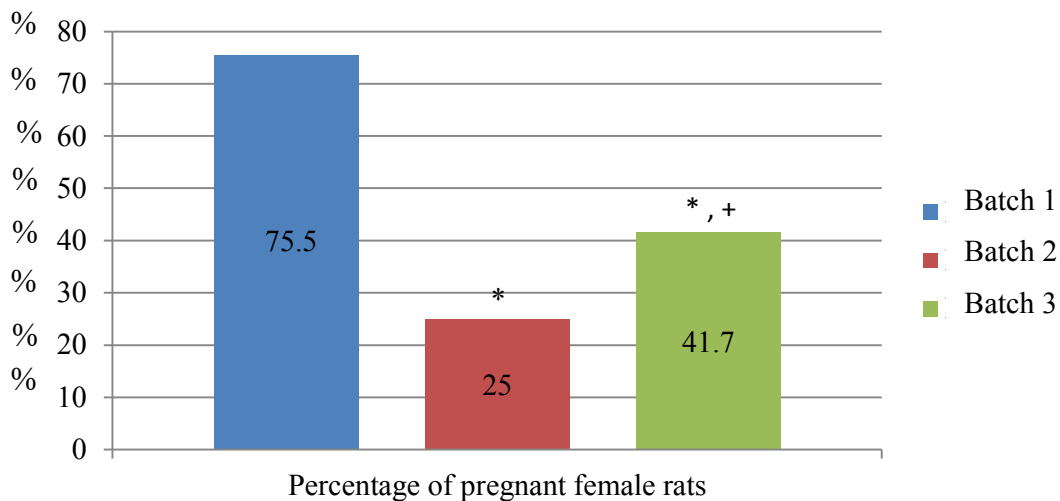


Chart 3.4. Preventive effects of OS35 on percentage of pregnant female rats

Table 3.30. Preventive effects of OS35 on the number corpus luteum, implantation and alive fetus

Number of	Batch					
	Batch 1	Batch 2	p ₂₋₁	Batch 3	p ₃₋₁	p ₃₋₂
Corpus luteum/ female	10.14 ± 1.57	9.50 ± 2.12	> 0.05	10.20 ± 1.69	> 0.05	> 0.05
Implantation/ female	10.00 ± 1.73	6.50 ± 0.71	< 0.01	9.40 ± 2.22	> 0.05	< 0.05
Alive fetus/ female	9.71 ± 2.06	5.00 ± 1.41	< 0.001	7.80 ± 1.93	< 0.05	< 0.05

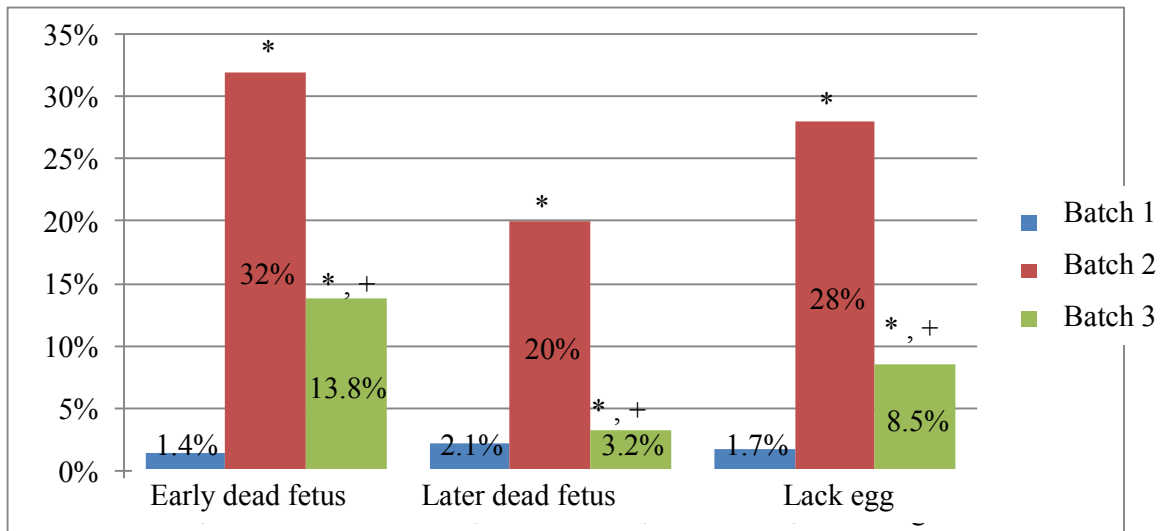


Chart 3.5. Preventive effects of OS35 on percentage of early/late dead fetus and lack egg

3.5.2. Restorative effects of OS35 on adult reproductive declining male rats caused by sodium valproate

3.5.2.1. Restorative effects of OS 35 on reproductive organ weight

OS35 did not affect adult male reproductive organ weight compared with untreated rats ($p > 0.05$).

3.5.2.2. Restorative effects of OS35 on sperm concentration and vitality

OS35 at the dose of 150 mg/kg/day for 10 days did not affect sperm concentration and vitality compared with untreated reproductive declining male rats ($p > 0.05$); but increased the proportion of progressive and normal sperm; decreased proportion of immotile and abnormal sperm; increased blood testosterone level ($p < 0.05$).

Table 3.32. Restorative effects of OS35 on sperm concentration and vitality

Batch	n	Sperm	
		Concentration (10 ⁶ /mL)	Vitality (%)
Batch1- NaCl + CMC	8	222.63 ± 19.42	84.63 ± 1.67
Batch2 - Valproate + CMC	8	136.50 ± 7.38	72.63 ± 2.74
p ₂₋₁		< 0.01	< 0.01
Batch3 - Valproate + OS35	8	137.50 ± 10.54	76.63 ± 2.92
p ₃₋₁		< 0.05	< 0.05
p ₃₋₂		> 0.05	> 0.05

Table 3.33. Restorative effects of OS35 on sperm motility

Batch	n	Percentage (%)			
		Progressive	Rapidly progressive	Non-progressive	Immotile
Batch1- NaCl + CMC	8	42.25 ± 2.18	38.00 ± 2.19	6.25 ± 0.41	51.50 ± 2.21
Batch2 - Valproate + 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
Batch3 - Valproate + OS35	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

Table 3.34. Restorative effects of OS35 on sperm morphology

Batch	n	Normal (%)	Abnormal (%)		
			Head	Midpiece	Tail
Batch1- NaCl + CMC	8	50.63 ± 1.12	25.75 ± 1.22	11.63 ± 0.91	12.00 ± 1.05
Batch2 - Valproate + CMC	9	27.75 ± 1.21	36.88 ± 1.43	15.75 ± 1.52	19.63 ± 0.84
p ₂₋₁		< 0.001	< 0.001	< 0.05	< 0.001
Batch3 - Valproate + OS35	11	42.63 ± 0.96	32.25 ± 1.42	11.63 ± 1.03	13.50±1.38
p ₃₋₁		< 0.01	< 0.01	> 0.05	> 0.05
p ₃₋₂		< 0.001	< 0.01	< 0.05	< 0.01

Table 3.35. Restorative effects of OS35 on testosterone level

Batch	n	Testosterone level (nmol/l)
Batch1- NaCl + CMC	8	16.78 ± 3.03
Batch2 - Valproate + CMC	9	10.17 ± 1.06
p ₂₋₁		< 0.05
Batch3 - Valproate + OS35 150 mg/kg/day	11	14.34 ± 1.59
p ₃₋₁		> 0.05
p ₃₋₂		< 0.05

3.5.2.3. Restorative of OS35 on testicular histology

Batch 1 (control): Stretched spermatophores, thin filamentous cortex, narrow tubes, and spermatozoa. Thick epithelium, all kinds of neoplastic stem cells: spermatogonia, spermatozoa, spermatocytes and sperm. Sparse tissue, blood vessels in the interstitium.



Figure 3.18. Testicular histology in control rats (H.E x 1000)

1. Interstitial tissue, 2. Seminiferous tubules

Batch 2 (sodium valpoate reproductive declining male rats): thin-walled spermatophores, rounded, narrowed, spermatophores, and all types of spermatozoa. Cells with moderate to severe degeneration. Swollen tissue, very wide intercostal space.

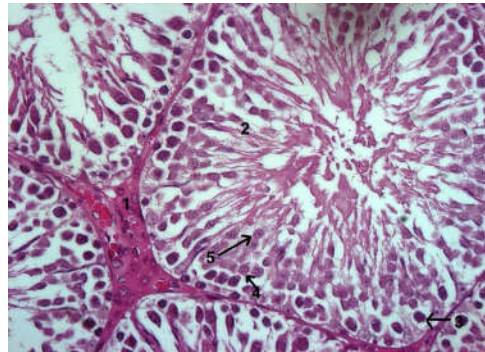


Figure 3.20. Testicular histology in reproductive declining rats (H.E x 1000)

Batch 3 (sodium valpoate reproductive declining male rats followed by OS35 for 10 days): thin-walled spermatophores, thin walls, narrow tubes, sperm tubes. Thick epithelium, all kinds of neoplasia. Swollen tissue, cells with mild to moderate degeneration.

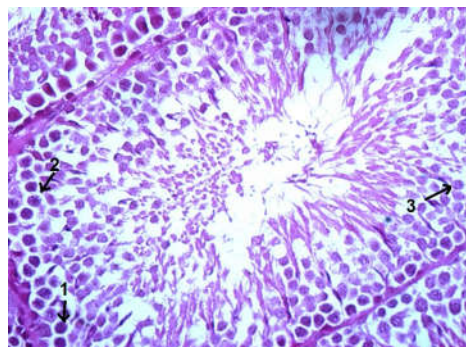


Figure 3.22. Testicular histology in reproductive declining rats followed by OS35 (H.E x 1000)

Table 3.36. Restorative effects of OS35 on spermatophore diameter

Batch	n	Kích thước ống sinh tinh
Batch1- NaCl + CMC	10	127.13 ± 2.69
Batch2 - Valproate + CMC	8	115.67 ± 3.54
p ₂₋₁		< 0.01
Batch3 - Valproate + OS35 150 mg/kg/day	10	125.53 ± 1.65
p ₃₋₁		> 0.05
p ₃₋₂		< 0.05

3.5.2.4. Restorative effects of OS35 on parameters in untreated female rats coupled with male reproductive declining rats:

The result was similar to that of preventive effects of OS35.

Chapter 4. DISCUSSION

4.1. Acute and subchronic toxicity of OS35 in experimental animals

4.1.1. Acute oral toxicity of OS35 in mice

Some mice of batches that was given OS35 at the dose of 1.25 g/kg and more dead within 24 hours. The number of dead mice at each dose was recorded to calculate LD₅₀. Oral LD₅₀ of OS35 in mice: LD₅₀ = 4.5 (2.8 - 7.1) g/kg with p = 0.05. According to the GHS classification table, OS35 is classified in Group 5. According to the GHS, substances classified in Category 5 are relatively low-grade toxic, however, in certain cases, these substances can cause damage to sensitive objects.

4.1.2. Subchronic oral toxicity of OS35 in rats

4.1.2.1. General condition and body weight in rats

In experimental animal studies, especially in subchronic toxicity study, the general condition and experimental animals' weights are evaluated before, during and after drug use. Results of two weeks and four weeks of study showed that OS35 at 150 mg/kg and 450 mg/kg for 4 weeks did not affect the general condition and body weight of rats.

4.1.2.2. Effects of OS35 on hematopoietic function in rats

Results of the study showed that OS35 at 2 doses of 150 and 450 mg/kg/day did not affect the number of red blood cells, hemoglobin, hematocrit, MCV, white blood cell count and formula, and platelet counts after 2 weeks and 4 weeks of continuous oral administration compared with control batch.

4.1.2.3. Effects of OS35 on liver and kidney function in rats

One of the methods of assessing the level of hepatocellular injury is the quantification of liver-derived enzymes present in the serum. Results of our study showed that ALT and AST activity in rat blood in batches of OS35 at 150 and 450mg/kg/day at 2 weeks and 4 weeks were not different from those of control batch. The liver is an organ that has many functions for the metabolism of substances, including protein, lipid metabolism. Results showed that the serum albumin and cholesterol levels in rats treated in 2 batches of OS35 were unchanged

at 2 weeks and 4 weeks of continuous drug administration. Thus, OS35 at the doses of 150 and 450 mg/kg/day given orally to rats for 4 consecutive weeks did not affect the evaluation of liver and lipid metabolism.

Kidneys are the organs that play an important role in ensuring homeostatic stability. Results of our study showed that OS35 at the doses of 150 and 450 mg/kg/day did not affect the index of glomerular filtration.

Liver histopathological structure in OS35 batches showed no fibrosis, inflammation or proliferation and no difference compared with control batch. These findings were consistent with the results of studies on AST and ALT activity in serum. However, kidney histopathological structure showed chronic epithelial inflammation (mainly lymphocytic) and fibrosis in rats in OS35 batches. However, the glomerular structure were within normal limits, no fibrosis, no cell proliferation. At the same time, creatinine tests assessing kidney function remain within normal limits.

4.2. Androgenic activity of OS35 in castrated immature male rats

According to the OECD guidelines, when the weight of at least two of these five organs increases significantly compared to non-drug batches, the drug is considered to be androgenic activity. Results of the study showed that OS35 at the dose of 50 mg/kg/day for 10 consecutive days increased only the weight of levator ani-bulbocavernosus muscle; at the dose of 150 mg/kg/day increased the weight of two organs including the levator ani-bulbocavernosus muscle and glans penis; at the dose of 450 mg/kg/day increased the weight of 3 organs, including levator ani-bulbocavernosus muscle, glans penis and Cowper's glands. Thus, OS35 50 mg/kg/day did not have androgenic activity. OS35 150 and 250 mg/kg/day for 10 days had androgenic activity in castrated immature male rats.

4.3. Effects of OS35 on erectile function

4.3.1. Effects of OS35 on erection in conscious adult male rabbits

The dose of OS35 given to rabbits was 60 mg/kg (extrapolated from the dose of 150 mg/kg in rats). In batches using OS35, results showed that OS35 also caused erection in rabbits similar to sildenafil. The compound that has been shown to have an erection effect is osthole which accounts for 35% in OS35.

4.3.2. Effects of OS35 on ICP in adult male rats

4.3.2.1. Effects of OS35 on basal ICP

In rats given sildenafil, 15, 30 and 45 minutes after medication, basal ICP (when there was no cavernous nerve stimulation) increased slightly compared with that before drug administration. The effect of increasing the basal ICP without this sexual arousal of sildenafil can only be explained by the scientists' belief that aside from the long-standing PDEV inhibitory mechanism, sildenafil has the potential relaxation of the smooth muscles independent of the NO/cGMP pathway.

In rats given OS35, 30 and 45 minutes after medication, basal ICP was also slightly higher than that before drug use. According to a study by James Chen (2000), the effect of ostholic smooth relaxation in presence of L-NAME or on the

discoloration of the endothelium has been significantly reduced, but remains whole. Thus, in addition to the main mechanism of increasing the release of NO from the endothelium and increasing cGMP in smooth muscle, osthole can also affect the direct relaxation of cavernous smooth muscle under the other mechanism. The results of a baseline ICP increase (before stimulating cavernous nerve) obtained from this study are consistent with erectile dysfunction effects when studied in the conscious rabbits mentioned above.

4.3.2.2. Effects of OS35 on ICPmax after stimulating the cavernous nerve

This can be easily explained because the mechanism of action of sildenafil is to inhibit specific enzyme PDE5, the enzyme degrading cGMP, which leads to inhibition of cGMP hydrolysis into 5'-GMP. The results suggested that the accumulation of cGMP in the cavernous smooth muscle increased the likelihood of smooth muscle relaxation, increased ICP max compared to untreated and basal ICP values. In addition, due to the accumulation of cGMP caused by sildenafil, the response time to nerve stimulation in sildenafil rats at 15 minutes, 30 minutes and 45 minutes after drug administration were significantly longer than those before drug use ($p < 0.05$).

Rats given OS35 also had a dramatic increase in ICPmax compared with basal ICP at the same time after the drug use and before drug use ($p < 0.01$). The response time in OS35 rats were also statistically significantly longer than before dosing at 30 minutes and 45 minutes ($p < 0.05$). As discussed above, the results of James Chen et al. (2000) showed that osthole induced the release of NO from the endothelium. Therefore, it enhances the effect when stimulating the cavernous nerve. In addition, osthole has non-specific PDE inhibitory activity, which increases the amount of cGMP, cAMP and activates adenyl cyclase. These mechanisms lead to increased smooth muscle relaxation, increased ICP and prolonged response time to cavernous electrical stimulation.

4.3.2.3. Effects of OS35 on MAP and ICPmax/MAP ratio

One of the adverse drug reactions of drugs that increase the NO release or increase cGMP, cAMP is to cause hypotension. Results showed that MAP at the time after sildenafil and OS35 administration was not significantly different ($p > 0.05$). While the ICPmax values were significantly higher than those before drug use ($p < 0.01$). Therefore, ICP max/MAP ratio in sildenafil and OS35 batches were significantly increased compared with baseline ($p < 0.01$).

4.4. Effects of OS35 on sexual behavior in adult male rats

Studying the effect of drugs on sexual behaviors is a synthetic method, not only to help detect drugs that enhance sexual function, but also direction of the drug mechanism of action. Rely on changes in research parameters, especially ML, IF, EL or PEI, with appropriate follow-up research directions, this method does not require complicated machinery, which can be carried out in our country.

4.4.1. Mounting

Mounting reflects sexual activation or sexual desire, associated with libido in humans. Performance parameters for mounting are rates of mounting rats, mounting frequency (MF) and mounting latency (ML). Among them, ML is an important parameter of sexual desire. Results of the study showed that sildenafil and the OS35 increased the rate of mounting rats and shortened ML statistically compared with untreated control batch ($p < 0.05$)

4.4.2. Intromission

Vaginal intromission requires an erection. Erection requires a combination of vasodilatation, hormones, and neurotransmitters. Thus, intromission activity is characterized by sexual potency or sexual intercourse. IF index not only shows erectile function but also demonstrates the ability to maintain erections in order to conduct intercourse and premise ejaculation. Our results showed that sildenafil increased IF compared with untreated rats ($p < 0.05$). This result is perfectly consistent with the mechanism of action of sildenafil PDEV inhibition, which increases the amount of cGMP that causes vasodilatation, increases ICP, increases erectile function. Increased intromission, enhanced sexual intercourse and improved erectile function of sildenafil were also reported in many studies using sildenafil as a positive control.

In rats given OS35 150 mg/kg, the rates of intromitting rats and IF were statistically significantly higher than control rats ($p < 0.05$). This result is consistent with results of studies on the effect of OS35 on ICP in male rats. Thus, after the drug, due to increased NO release from the endothelium, increased amount of cGMP and cAMP of osthole in cavernous smooth muscle, increased blood flow to the penis, increased erectile capacity should increase the sexual power of male rats.

4.4.3. Ejaculation

Post ejaculation interval (PEI) is the time for male rats to regain strength after each ejaculation, and is also an parameter of sexual desire. Our results showed that single dose OS35 150 mg/kg did not alter ejaculation time.

4.5. Effects of OS35 on reproductive declining adult male rats caused by sodium valproate

4.5.1. Rationale to chose sodium valproate to decline reproductive in male rats

The study by Nishimura et al. (2000) also showed that at the dose of 500 mg/kg/day administered to rats for 7 weeks, sodium valproate reduced reproductive function, as well as reduced sperm count, sperm motility, testicular structures of adult male rats. Thus, in this thesis, sodium valproate at the dose of 500 mg/kg/day for 7 weeks was used as a reproductive declining agent for experimental male rats, on the basis of which assessed the preventive and restorative effects of OS35.

4.5.2. Preventive effects of OS35 on on reproductive declining adult male rats caused by sodium valproate

4.5.2.1. Effects of OS35 on reproductive organ weight

The weight of OS35 rats' reproductive organs in both preventive and restorative tissues was statistically insignificant compared to untreated rats. Rats used to be induced reproductive decline with sodium valproate were adult male rats of those genital organs developed completely and were less affected by drugs.

4.5.2.2. Effects of OS35 on sperm count, sperm motility and sperm morphology

Sperm counts, measured indirectly through sperm concentration, are one of the most sensitive parameters for assessing spermatogenesis, because they are the result of all stages of spermatogenesis. Any abnormalities in spermatogenesis can affect the amount of sperm. Results of the study showed that OS35 for 7 weeks significantly increased the sperm concentration and the sperm vitality rate in the preventive assessment; whereas there was no statistically significant difference in restorative assessment when OS35 was given to rats only for 10 days. This difference may be due to the difference in the duration of drug use while the sperm cycle in male rats lasts about 6-8 weeks. Moreover, OS35 obviously improved the motility and morphology of sperms.

4.5.2.3. Effects of OS35 on blood testosterone level

In rats given OS35, blood levels of testosterone increased significantly ($p < 0.05$). This is consistent with the results mentioned above, in which OS35 increased sperm quality and quantity. This result is consistent with the findings of Xie Jin-xian (2007) in white mice caused reproductive declining with cyclophosphamide, osthole increased testosterone levels in the blood.

4.5.2.4. Effects of OS35 on testicular morphology and spermatophore diameter

Histopathologic results in rats of batch 3 showed that OS35 tended to maintain testicular integrity, with normal epithelium, all types of cells, normal and interstitial cells. This suggests that the effect of the differentiation and maturation of OS35 on spermatozoa may be enhanced by increasing the level of testosterone in the blood. The spermatozoa diameter was also significantly increased in comparison with untreated reproductive declining rats ($p < 0.001$).

4.5.2.5. Effects of OS35 on female rats' parameters

In both restorative and preventive assessment, OS35 had the effect of increasing the proportion of pregnant rats, increasing fetal numbers, normal fetal development, reduced early/late fetal death rates in female rats coupled with reproductive declining male rats caused by sodium valproate.

CONCLUSION

Based on the results of studies on the safety and therapeutic effects of male sexual and reproductive function, the conclusion of the thesis are as follows:

1. Acute and subchronic toxicity of OS35 in experimental animals

1.1. Acute oral toxicity of OS35 in mice

In mice batches that were given OS35 at the dose of 1.25 g/kg or more, a number of mice dead within 24 hours. Oral LD₅₀ of OS35 in mice were calculated:

$$LD_{50} = 4.5 (2.8 - 7.1) \text{ g/kg with } p = 0.05$$

1.2. Subchronic oral toxicity of OS35 in rats

OS35 at the dose of 150 mg/kg/day and 450 mg/kg/day for 28 consecutive days did not affect general condition, body weight and the parameters used to evaluate the function of blood organ, liver and kidney. OS35 did not affect the histology of rat liver. However, OS35 could cause the chronic inflammation when accessing kidney histopathology.

2. Androgenic activity and the effect of OS35 on erectile function, sexual behavior in experimental animals

2.1. Androgenic activity of OS35

OS35 at the doses of 150 mg/kg/day and 250 mg/kg/day had androgenic activity in castrated immature male rats: OS35 150 mg/kg/day increased the weight of 2 organs (glans penis and levator ani-bulbocavernosus muscle) while OS35 450 mg/kg/day increased the weight of 3 organs (glans penis, levator ani-bulbocavernosus muscle and Cowper's glands).

2.2. Effects of OS35 on erectile function

- **On rabbit's erection:** OS35 at the dose of 60 mg/kg increased the penis length 5 minutes, 10 minutes, 15 minutes, 20 minutes, 25 minutes and 30 minutes and increased the response duration after given to conscious adult male rabbits. This effect was not statically different from sildenafil.

- **On male rat's ICP:** OS35 at the dose of 150 mg/kg increased basal ICP, ICP max, response time and ICPmax/MAP ratio but did not affect MAP.

- **On male rat's sexual behaviors:** OS35 at the dose of 150 mg/kg increased the proportion of mounting and intromitting rats, increased intromission frequency (IF) and decreased mounting latency (ML), intromission latency (IL).

3. Effects of OS35 on reproductive declining male rats caused by sodium valproate

3.1. Preventive effects

OS35 at the dose of 150 mg/kg/day for 7 weeks increased sperm concentration, sperm vitality rate, the proportion of progressive/ rapidly progressive sperm, decreased the proportion of non-progressive/immotile sperm, increased blood testosterone level, spermaphore diameter, improved testicular morphology in reproductive declining male rats caused by sodium valproate at the dose of 500 mg/kg/day for 7 weeks. Moreover, OS35 improved the implantation and fetus development in untreated female rats coupled with reproductive declining male rats.

3.2. Restorative effects

OS35 at the dose of 150 mg/kg/day for 7 days following sodium valproate 500 mg/kg/day for 7 weeks had restorative effects on parameters in both male and female rats, except sperm concentration and vitality rate, due to the duration of OS35 administration.