

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**



**MAI PHƯƠNG THANH**

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH VÀ TÁC DỤNG  
ĐIỀU TRỊ SUY GIẢM SINH DỤC ĐỰC CỦA  
VIÊN HOÀN CỨNG TD0014  
TRÊN THỰC NGHIỆM**

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

HÀ NỘI – 2019

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

**MAI PHƯƠNG THANH**

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH VÀ TÁC DỤNG  
ĐIỀU TRỊ SUY GIẢM SINH DỤC ĐỰC CỦA  
VIÊN HOÀN CỨNG TD0014  
TRÊN THỰC NGHIỆM**

Chuyên ngành: Dược lý và độc chất

Mã số: 62720120

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

**1. PGS.TS. Phạm Thị Vân Anh**

**2. PGS.TS. Nguyễn Trọng Thông**

**HÀ NỘI – 2019**

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, ngoài sự nỗ lực của bản thân, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ từ phía các thầy cô, gia đình và bạn bè. Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin trân trọng gửi lời cảm ơn chân thành nhất tới:

**PGS.TS Phạm Thị Vân Anh**, Trưởng Bộ môn Dược lý, Giám đốc Trung tâm Dược lý lâm sàng, Đại học Y Hà Nội, và **PGS.TS Nguyễn Trọng Thông**, Nguyên Trưởng Bộ môn Dược lý, Nguyên Phụ trách Trung tâm Dược lý lâm sàng, Đại học Y Hà Nội, là những người thầy đã trực tiếp hướng dẫn, tận tình dạy bảo, giúp đỡ và truyền những kinh nghiệm quý báu nhất cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án này. Sự nhiệt huyết, quan tâm, động viên của thầy cô là động lực, là hành trang giúp tôi bước tiếp trên con đường hiện tại và trong tương lai.

**PGS.TS Vũ Thị Ngọc Thanh**, Nguyên Phó Trưởng Bộ môn Dược lý, Đại học Y Hà Nội, và **PGS.TS Nguyễn Trần Thị Giáng Hương**, Nguyên Trưởng phòng Quản lý Đào tạo Đại học, Nguyên Phó Trưởng Bộ môn Dược lý, Đại học Y Hà Nội, đã tận tình dạy dỗ, chỉ bảo, tạo mọi điều kiện và hết sức quan tâm đến công việc, cuộc sống của tôi ngay từ những ngày đầu tôi về bộ môn.

**TS Trần Thanh Tùng**, Phó Trưởng Bộ môn Dược lý, Đại học Y Hà Nội, đã rất tận tình giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận án này.

Các thầy cô giáo, các anh chị em cán bộ giảng dạy và kỹ thuật viên ở **Bộ môn Y sinh học – Di truyền, Đại học Y Hà Nội; Bộ môn Mô phôi, Đại học Y Hà Nội; Bộ môn Sinh lý học, Học viện Quân Y**, đã tạo điều kiện thuận lợi và nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu tại Bộ môn.

Các thầy cô giáo, các anh chị kỹ thuật viên, y công và các anh chị em học viên Sau Đại học của **Bộ môn Dược lý, Đại học Y Hà Nội**, đã luôn hỗ trợ, tin tưởng, ủng hộ, và nhiệt tình giúp đỡ tôi không chỉ trong thời gian thực hiện luận án mà còn trong công việc và cuộc sống hàng ngày.

**Ban Giám hiệu, Phòng Quản lý Đào tạo Sau Đại học, Đại học Y Hà Nội**, đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận án này.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn và bày tỏ lòng kính yêu tới bố mẹ, những người thân trong gia đình, bạn bè đã luôn động viên, cổ vũ, khuyến khích, và tiếp thêm nghị lực để tôi vững bước trên con đường học vấn của mình.

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi là Mai Phương Thanh, nghiên cứu sinh khóa 35, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Dược lý và Độc chất, xin cam đoan:

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

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

*Hà Nội, ngày 08 tháng 10 năm 2019*

**Người viết cam đoan**

**Mai Phương Thanh**

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

ALT	Alanin aminotransferase
AR	Androgen receptor
AST	Aspartat aminotransferase
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CASA	Computer assisted sperm analysis (phân tích tinh trùng bằng máy tính)
cGMP	Cyclic guanosine 5'-monophosphate
CYP	Cytochrom P
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteron sulfat
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Deoxyribonucleic acid
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase (nitric oxide synthase nội mô)
FSH	Follicle-stimulating hormone (Hormon kích thích nang trứng)
GABA	Gamma-aminobutyric
GHS	Globally Harmonised System (Hệ thống Hòa hợp Toàn cầu)
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone (Hormon giải phóng gonadotropin)
hCG	Human chorionic gonadotropin
HDL	High density lipoprotein (Lipoprotein tỷ trọng cao)
HE	Hematoxyline-eosin
ICP	Intracarvenous pressure (Áp lực thể hang)
IPSS	International Prostate Symptom Score (Thang điểm quốc tế về triệu chứng tuyến tiền liệt)
LD50	Lethal dose 50% (Liều gây chết 50%)
LDL	Low density lipoprotein (Lipoprotein tỷ trọng thấp)
LH	Luteinizing hormone (Hormon tạo hoàng thể)
MAP	Mean arterial pressure (Huyết áp động mạch trung bình)
mRNA	Messenger RNA (RNA thông tin)

NANC	Non-adrenergic non-cholinergic
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase (nitric oxide synthase thần kinh)
NVP	Natri valproat
NYHA	New York Heart Association (Hiệp hội Tim mạch New York)
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development (Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế)
PDE	Phosphodiesterase
PLC	Phospholipase C
PSA	Prostate-Specific Antigen (Kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt)
SGSS	Suy giảm sinh sản
SHBG	Sex hormone-binding globulin (Globulin gắn với hormon sinh dục)
SOD	Superoxide dismutase
TG	Triglycerid
TGF-1	Transforming growth factor-1
TRT	Testosterone replacement therapy (Liệu pháp thay thế testosteron)
WHO	World Health Organization (Tổ chức Y tế Thế giới)
YHCT	Y học cổ truyền

## MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	3
1.1. Tổng quan về suy sinh dục nam theo y học hiện đại .....	3
1.1.1. Định nghĩa và nguyên nhân .....	3
1.1.2. Các thuốc điều trị suy sinh dục nam .....	9
1.2. Tổng quan về các dược liệu điều trị suy sinh dục nam .....	23
1.2.1. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh về suy sinh dục nam theo y học cổ truyền.....	23
1.2.2. Các dược liệu điều trị suy sinh dục nam.....	24
1.3. Các mô hình thực nghiệm nghiên cứu tác dụng hỗ trợ điều trị suy giảm chức năng sinh dục nam.....	28
1.3.1. Mô hình đánh giá hoạt tính androgen trên thực nghiệm .....	28
1.3.2. Mô hình nghiên cứu chức năng cương dương trên thực nghiệm.....	30
1.3.3. Mô hình nghiên cứu hành vi tình dục trên thực nghiệm .....	33
1.3.4. Mô hình gây suy giảm sinh sản trên thực nghiệm.....	35
1.4. Tổng quan về viên hoàn cứng TD0014.....	38
1.4.1. Thành phần.....	38
1.4.2. Tác dụng.....	38
1.4.3. Giới thiệu các dược liệu thành phần trong viên hoàn cứng TD0014 .....	39
1.4.4. Một số nghiên cứu về tác dụng trên sinh sản của một số dược liệu thành phần trong viên hoàn cứng TD0014 .....	39
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	47
2.1. Nguyên liệu nghiên cứu .....	47
2.2. Đối tượng nghiên cứu.....	50
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	50
2.3.1. Nghiên cứu độc tính của TD0014 trên động vật thực nghiệm .....	50
2.3.2. Nghiên cứu hoạt tính androgen của TD0014 trên động vật thực nghiệm .....	52
2.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của TD0014 trên áp lực thể hang (intracarvenous pressure - ICP) của chuột cống đực trắng.....	54

2.3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của TD0014 trên chuột cống trắng bị gây suy giảm chức năng sinh sản bằng natri valproat .....	56
2.4. Xử lý số liệu .....	58
2.5. Địa điểm nghiên cứu .....	58
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....	59
3.1. Nghiên cứu độc tính của TD0014 trên thực nghiệm.....	59
3.1.1. Độc tính cấp của TD0014 theo đường uống trên chuột nhắt trắng.....	59
3.1.2. Độc tính bán trường diễn của TD0014 trên chuột cống trắng .....	59
3.2. Nghiên cứu hoạt tính androgen của TD0014 trên động vật thực nghiệm.....	68
3.2.1. Hoạt tính androgen của TD0014 trên chuột cống đực non thiếu .....	68
3.2.2. Hoạt tính androgen của TD0014 trên chuột cống đực non cai sữa .....	69
3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của TD0014 trên áp lực thể hang ở chuột cống đực trưởng thành .....	71
3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của TD0014 trên chuột cống trắng bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	74
3.4.1. Tác dụng bảo vệ của TD0014 trên chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	74
3.4.2. Tác dụng phục hồi của TD0014 trên chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	88
Chương 4: BÀN LUẬN .....	102
4.1. Độc tính của TD0014 trên động vật thực nghiệm.....	102
4.1.1. Độc tính cấp .....	102
4.1.2. Độc tính bán trường diễn .....	104
4.2. Hoạt tính androgen và tác dụng trên chức năng cương dương của TD0014 trên động vật thực nghiệm.....	115
4.2.1. Hoạt tính androgen của TD0014 trên động vật thực nghiệm .....	115
4.2.2. Ảnh hưởng của TD0014 trên áp lực thể hang trên động vật thực nghiệm ....	126
4.3. Ảnh hưởng của TD0014 trên chức năng sinh sản của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat.....	134
4.3.1. Ảnh hưởng của natri valproat đến cơ quan sinh dục đực.....	136



<i>4.3.2.Tác dụng bảo vệ của TD0014 trên chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....</i>	<i>139</i>
<i>4.3.3.Tác dụng phục hồi của TD0014 trên chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....</i>	<i>142</i>
KẾT LUẬN .....	151
KIẾN NGHỊ .....	153
CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các nguyên nhân thường gặp gây suy giảm chức năng sinh dục nam .....	4
Bảng 1.2. So sánh các dạng chế phẩm testosterone .....	12
Bảng 1.3. Theo dõi điều trị với liệu pháp thay thế testosterone .....	16
Bảng 1.4. Đặc điểm của một số thuốc ức chế PDE5 .....	19
Bảng 1.5. Tác dụng của một số dược liệu, chiết xuất từ dược liệu hoặc phối hợp một số dược liệu trong điều trị suy giảm chức năng sinh dục nam.....	26
Bảng 2.1. Thành phần viên hoàn cứng TD0014 .....	47
Bảng 3.1. Môi tương quan giữa liều dùng TD0014 và tỷ lệ chuột chết.....	59
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của TD0014 đến số lượng hồng cầu trong máu chuột cống..	60
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của TD0014 đến hemoglobin và hematocrit trong máu chuột cống..	61
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của TD0014 đến thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột cống .	62
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của TD0014 đến số lượng bạch cầu trong máu chuột cống ..	62
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của TD0014 đến công thức bạch cầu trong máu chuột cống ..	63
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của TD0014 đến số lượng tiểu cầu trong máu chuột cống....	63
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của TD0014 đến hoạt độ transaminase trong máu chuột cống..	64
Bảng 3.9. Ảnh hưởng TD0014 đến nồng độ bilirubin trong máu chuột cống .....	65
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của TD0014 đến hàm lượng albumin trong máu chuột cống..	65
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của TD0014 đến nồng độ cholesterol trong máu chuột cống..	66
Bảng 3.12. Ảnh hưởng của TD0014 đến hàm lượng creatinin trong máu chuột cống .	66
Bảng 3.13. Kết quả vi thể gan, thận chuột cống sau 90 ngày uống TD0014.....	67
Bảng 3.14. Ảnh hưởng của TD0014 lên trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ .....	68
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của TD0014 lên nồng độ testosterone .....	69
Bảng 3.16. Ảnh hưởng của TD0014 lên trọng lượng các cơ quan sinh dục .....	69
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của TD0014 lên nồng độ testosterone.....	70
Bảng 3.18. Ảnh hưởng của TD0014 đến thời gian đạt đến ICP đỉnh .....	71
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của TD0014 đến thời gian đáp ứng với kích thích .....	72
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của TD0014 đến huyết áp động mạch trung bình sau kích thích điện lên dây thần kinh hang .....	73

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của TD0014 đến kích thước ống sinh tinh của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat.....	75
Bảng 3.22. Mô học tinh hoàn của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	76
Bảng 3.23. Ảnh hưởng của TD0014 đến mật độ và tỷ lệ tinh trùng sống của tinh trùng của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	81
Bảng 3.24. Ảnh hưởng của TD0014 lên hình thái tinh trùng của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	83
Bảng 3.25. Ảnh hưởng của TD0014 lên nồng độ testosterone trong máu ở chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	84
Bảng 3.26. Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng mào tinh, đầu dương vật và cơ nâng hậu môn-hành hang của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat.....	84
Bảng 3.27. Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng các tuyến sinh dục phụ của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	85
Bảng 3.28. Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng gan, thận, tuyến thượng thận của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat.....	86
Bảng 3.29. Ảnh hưởng của TD0014 đến kích thước ống sinh tinh của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	89
Bảng 3.30. Ảnh hưởng của TD0014 đến mô học tinh hoàn của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	89
Bảng 3.31. Ảnh hưởng của TD0014 đến mật độ và tỷ lệ tinh trùng sống của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	94
Bảng 3.32. Ảnh hưởng của TD0014 lên khả năng di động của tinh trùng của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	95
Bảng 3.33. Ảnh hưởng của TD0014 lên hình thái tinh trùng của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	97
Bảng 3.34. Ảnh hưởng của TD0014 lên nồng độ testosterone trong máu ở chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat.....	97
Bảng 3.35. Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng mào tinh, đầu dương vật và cơ nâng hậu môn-hành hang của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat.....	98

Bảng 3.36. Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng các tuyến sinh dục phụ của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	99
Bảng 3.37. Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng gan, thận, tuyến thượng thận của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat.....	100
Bảng 4.1. Thời gian thử độc tính dài ngày quy đổi từ người sang động vật.....	104
Bảng 4.2. Các nghiên cứu về độc tính của một số dược liệu trong sản phẩm TD0014...	110
Bảng 4.3. Hợp chất phenol trong một số dược liệu thành phần của TD0014.....	148

## DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Ảnh hưởng của TD0014 đến thể trọng chuột cống .....	60
Biểu đồ 3.2. Áp lực thể hang (ICP) trước và sau khi kích thích điện vào dây thần kinh hang của chuột cống đực trưởng thành .....	71
Biểu đồ 3.3. Ảnh hưởng của TD0014 đến diện tích dưới đường cong ICP.....	72
Biểu đồ 3.4. Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng tinh hoàn của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	74
Biểu đồ 3.5. Ảnh hưởng của TD0014 đến độ di động tinh trùng của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	81
Biểu đồ 3.6. Ảnh hưởng của TD0014 lên khả năng tiến tới của tinh trùng của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	82
Biểu đồ 3.7. Ảnh hưởng của TD0014 đến tỷ lệ mang thai của chuột cống cái .....	87
Biểu đồ 3.8. Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng tinh hoàn của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	88
Biểu đồ 3.9. Ảnh hưởng của TD0014 lên tốc độ di động của tinh trùng của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat .....	96
Biểu đồ 3.10. Ảnh hưởng của TD0014 đến tỷ lệ mang thai của chuột cống cái ....	100

## DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Lịch sử phát triển của liệu pháp thay thế testosterone .....	11
Hình 1.2. Cơ chế bệnh sinh về suy sinh dục nam theo y học cổ truyền .....	24
Hình 1.3. Tác dụng kích thích hoạt động tình dục ở nam giới của các hợp chất có mặt trong các dược liệu y học cổ truyền .....	25
Hình 3.1. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô chứng sinh học .....	77
Hình 3.2. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô chứng sinh học .....	77
Hình 3.3. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô mô hình .....	78
Hình 3.4. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô mô hình .....	78
Hình 3.5. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg .....	79
Hình 3.6. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg .....	79
Hình 3.7. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg .....	80
Hình 3.8. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg .....	80
Hình 3.9. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô chứng sinh học .....	90
Hình 3.10. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô chứng sinh học .....	91
Hình 3.11. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô mô hình .....	91
Hình 3.12. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô mô hình .....	92
Hình 3.13. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg .....	92
Hình 3.14. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg .....	93
Hình 3.15. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg .....	93
Hình 3.16. Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg .....	94
Hình 4.1. Con đường tổng hợp steroid thượng thận .....	119
Hình 4.2. Mối liên quan giữa DHEA-S với nồng độ testosterone .....	122
Hình 4.3. Những con đường dẫn đến giãn cơ trơn thể hang và cương dương .....	131

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Tỷ lệ vô sinh đang ngày càng gia tăng và trở thành một thách thức lớn đối với y tế thế giới. Trong năm 2010, ước tính có khoảng 48,5 triệu cặp vợ chồng trên toàn thế giới bị vô sinh [1], và khoảng 40% trong số đó, nam giới được xác định hoặc là nguyên nhân duy nhất hoặc góp phần gây nên vô sinh [2]. Suy sinh dục là một trong những nguyên nhân gây nên tình trạng vô sinh ở nam giới.

Suy giảm chức năng sinh dục nam (male sexual dysfunction) là tình trạng bệnh lý có sự rối loạn của một trong các giai đoạn của hoạt động tình dục, bao gồm rối loạn ham muốn, rối loạn cương dương, rối loạn cực khoái, rối loạn xuất tinh và giảm khả năng xù dương vật; các tình trạng này có thể xuất hiện đơn độc hoặc phối hợp với nhau [3]. Đây là một tình trạng rối loạn bệnh lý thường gặp ở nam giới với tỷ lệ cao. Kết quả của một nghiên cứu khảo sát cho thấy, có khoảng 31% nam giới gặp ít nhất một rối loạn chức năng sinh dục trong suốt cuộc đời của họ [4]. Tại Việt Nam, theo nghiên cứu của Võ Văn Thắng và cộng sự thực hiện năm 2015 tại Thành phố Huế trên những người đàn ông 20-60 tuổi đã lập gia đình, có tới 2/3 (66,9%) nam giới tham gia nghiên cứu có dấu hiệu rối loạn cương dương [5]. Bệnh lý tuy không gây tử vong, không cần xử trí cấp cứu nhưng ảnh hưởng rất nhiều đến tinh thần và chất lượng cuộc sống của bệnh nhân [6]. Vì vậy việc phát triển các phương pháp dự phòng và điều trị suy sinh dục nam đang trở thành mối quan tâm đặc biệt của y học thế giới. Việc áp dụng đúng các biện pháp điều trị sẽ giúp nâng cao sức khỏe sinh sản và cải thiện chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân.

Theo y học hiện đại, các phương pháp để điều trị suy sinh dục nam bao gồm liệu pháp thay thế testosterone và các biện pháp điều trị một số triệu chứng chính của bệnh như rối loạn cương dương, rối loạn xuất tinh [8],[9]. Tuy mang lại một số hiệu quả nhất định trong cải thiện triệu chứng cũng như chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân, sử dụng thuốc theo y học hiện đại vẫn có một nhược điểm lớn là nhiều tác dụng không mong muốn. Vì vậy, hiện nay, một xu hướng rất phổ biến ở Việt Nam cũng như trên thế giới là phát hiện và nghiên cứu các thuốc điều trị có nguồn gốc từ

dược liệu. Theo y học cổ truyền (YHCT), có nhiều dược liệu đã được sử dụng rộng rãi để tăng cường chức năng sinh dục ở nam giới như nhục thung dung, ba kích, bá bệnh, nhân sâm, cá ngựa, v.v... [10].

Sản phẩm TD0014 là sự phối hợp của 32 vị thuốc có nguồn gốc thảo dược và nhung hươu, có tác dụng giúp bổ khí huyết, bổ thận, tráng dương, mạnh gân cốt, tăng cường sức đề kháng và phục hồi sinh lực cho các cơ quan nội tạng toàn thân. Thành phần của TD0014 có một số dược liệu đã được nghiên cứu và dùng để điều trị suy sinh dục nam: bạch tật lê, nhục thung dung, ba kích, bá bệnh, nhân sâm.... Sản phẩm này dưới dạng thực phẩm chức năng đã được sử dụng khá nhiều trên nam giới có sức đề kháng và sức khỏe toàn thân suy giảm, sinh lý giảm sút, thận hư gây tiểu đêm nhiều lần, người uống nhiều bia rượu, người cao tuổi. Tuy nhiên, ở nước ta, cho đến nay vẫn chưa có nghiên cứu cung cấp những bằng chứng khoa học đáng tin cậy về tác dụng trên chức năng sinh dục cũng như độc tính của sản phẩm TD0014.

Vì vậy, để cung cấp bằng chứng khoa học về tính an toàn và hiệu quả nhằm ứng dụng sản phẩm TD0014 trong điều trị suy sinh dục nam giới, đề tài ***“Nghiên cứu độc tính và tác dụng điều trị suy giảm sinh dục đực của viên hoàn cứng TD0014 trên thực nghiệm”*** được thực hiện nhằm các mục tiêu sau đây:

- 1. Xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của viên hoàn cứng TD0014 trên động vật thực nghiệm.*
- 2. Đánh giá hoạt tính androgen và tác dụng trên chức năng cương dương của viên hoàn cứng TD0014 trên động vật thực nghiệm.*
- 3. Đánh giá tác dụng của viên hoàn cứng TD0014 trên chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat.*



## **Chương 1**

### **TỔNG QUAN TÀI LIỆU**

#### **1.1. Tổng quan về suy sinh dục nam theo y học hiện đại**

##### **1.1.1. Định nghĩa và nguyên nhân**

Năm 1993, tại một Hội nghị của Viện Sức khỏe Quốc gia Hoa Kỳ, thuật ngữ “rối loạn cương dương” (erectile dysfunction) đã được đưa ra để thay thế cho cụm từ “bất lực” (impotence) – khái niệm suy sinh dục nam trước đây – để mô tả về tình trạng rối loạn chức năng sinh dục ở nam giới [7]. Rối loạn cương dương được định nghĩa là “không có khả năng cương dương, một giai đoạn trong quá trình hoạt động tình dục ở nam giới”. Tuy nhiên, với những hiểu biết ngày càng đầy đủ về các giai đoạn của hoạt động tình dục ở nam giới cũng như những tiến bộ về mặt sinh lý bệnh, cụm từ “rối loạn cương dương” đã không còn thích hợp để nói lên tất cả các khía cạnh của tình trạng suy giảm chức năng sinh dục ở nam giới. Hiện nay, khái niệm suy giảm chức năng sinh dục nam được mở rộng, và được định nghĩa là tình trạng bệnh lý có sự rối loạn của một trong các giai đoạn của hoạt động tình dục ở nam giới, bao gồm rối loạn ham muốn, rối loạn cương dương, rối loạn cực khoái, rối loạn xuất tinh và giảm khả năng xì dương vật; các tình trạng này có thể xuất hiện đơn độc hoặc phối hợp với nhau [3],[7]. Các nguyên nhân tâm thần và thực thể gây rối loạn các giai đoạn trong hoạt động tình dục ở nam giới được tổng hợp trong bảng 1.1.

**Bảng 1.1.** Các nguyên nhân thường gặp gây suy giảm chức năng sinh dục nam [7]

<b>Biểu hiện lâm sàng</b>	<b>Định nghĩa</b>	<b>Nguyên nhân thường gặp</b>
<b><i>Rối loạn ham muốn</i></b>  Giảm ham muốn	Tình trạng thiếu hụt hoặc không còn những ham muốn, hứng thú về hoạt động tình dục xảy ra kéo dài hoặc tái diễn liên tục, dẫn đến trạng thái mệt mỏi hoặc gặp khó khăn trong mối quan hệ giữa các cá nhân với nhau [7]	<i>Tâm thần</i> (trầm cảm, bất hòa trong hôn nhân dẫn đến giảm ham muốn, lo âu khi thực hiện dẫn đến ức chế hứng thú) <i>Bệnh thần kinh trung ương</i> (động kinh cục bộ, Parkinson, sau đột quy, loạn dưỡng não chất trắng thượng thân) <i>Thiếu hụt androgen</i> (nguyên phát hoặc thứ phát), kháng androgen <i>Thuốc</i> (hạ huyết áp, chống loạn thần, rượu, chất gây nghiện, chất ức chế dopamin, kháng androgen)
Hành vi tình dục cưỡng bức	Các hành vi tình dục phức tạp có tính chất lặp lại, dữ dội và không cưỡng lại được [11]	<i>Tâm thần</i> (tình dục ám ảnh cưỡng chế, tìm kiếm tình dục quá mức gắn với các rối loạn cảm xúc, nghiện tình dục, cuồng dục)
<b><i>Rối loạn cương dương</i></b>	Tình trạng không có khả năng đạt được và duy trì độ cương cứng của dương vật đủ để tiến hành cuộc giao hợp một cách trọn vẹn [9]	<i>Tâm thần</i> (stress, lo âu khi thực hiện, trầm cảm, tâm thần phân liệt, hoang tưởng tự cao) <i>Thuốc</i> (hạ huyết áp, kháng cholinergic, chống loạn thần, hút thuốc lá, chất gây nghiện)

<b>Biểu hiện lâm sàng</b>	<b>Định nghĩa</b>	<b>Nguyên nhân thường gặp</b>
		<p><i>Bệnh toàn thân</i> (bệnh tim mạch, gan, thận, phổi, ung thư, bệnh chuyển hóa, sau ghép tạng, xạ trị vùng chậu)</p> <p><i>Thiếu hụt androgen</i> (nguyên phát hoặc thứ phát), kháng androgen, các bệnh nội tiết khác</p> <p><i>Suy giảm chức năng mạch máu</i> (xơ vữa động mạch, hội chứng pelvic steal, Raynaud dương vật, rò rỉ tĩnh mạch)</p> <p><i>Bệnh lý thần kinh</i> (Parkinson, Alzheimer, Shy-Drager, tổn thương tủy sống hoặc dây thần kinh)</p> <p><i>Bệnh lý tại dương vật</i> (Peyronie, cương đau dương vật kéo dài, hẹp bao quy đầu, rối loạn chức năng cơ trơn, chấn thương)</p>
<p><b><i>Rối loạn xuất tinh</i></b></p> <p>Xuất tinh sớm (nguyên phát hoặc thứ phát)</p>	<p>Tình trạng luôn luôn hoặc gần như luôn luôn xuất tinh sớm hơn hoặc trong vòng 1 phút (<i>xuất tinh sớm nguyên phát</i>) hoặc 3 phút (<i>xuất tinh sớm thứ phát</i>) kể từ khi đưa dương vật vào âm đạo; bệnh nhân</p>	<p><i>Tâm thần</i> (lo âu/trầm cảm, không thỏa mãn trong các hoạt động tình dục trước đó, bất hòa trong mối quan hệ gia đình)</p> <p><i>Thực thể</i> (tăng hoạt động dopaminergic trung ương, tăng nhạy cảm của dương vật)</p>

<b>Biểu hiện lâm sàng</b>	<b>Định nghĩa</b>	<b>Nguyên nhân thường gặp</b>
Không xuất tinh hoặc xuất tinh muộn	<p>không có hoặc gần như không có khả năng kiểm soát xuất tinh; dẫn đến ảnh hưởng tâm lý như tự ti, căng thẳng, bực bội và né tránh quan hệ tình dục [12]</p> <p>Có một sự trì hoãn đáng kể hoặc mất khả năng xuất tinh trong 75 – 100% số lần hoạt động tình dục trong ít nhất 6 tháng mà không có sự trì hoãn theo mong muốn cá nhân, và dẫn đến những lo lắng, căng thẳng của bản thân [13]</p>	<p><i>Tổn thương thần kinh giao cảm</i> (đái tháo đường, phẫu thuật, xạ trị)</p> <p><i>Thuốc</i> (hủy giao cảm, ức chế thần kinh trung ương)</p> <p><i>Thiếu hụt androgen</i> (nguyên phát hoặc thứ phát), kháng androgen</p>
Xuất tinh ngược dòng	Tình trạng tinh dịch đi vào bàng quang do cổ bàng quang không đóng kín hoàn toàn	<p><i>Phẫu thuật</i> (phẫu thuật tuyến tiền liệt, phẫu thuật sau phúc mạc, phẫu thuật đại trực tràng, phẫu thuật cột sống)</p> <p><i>Tổn thương thần kinh giao cảm</i> (đái tháo đường)</p>

<b>Biểu hiện lâm sàng</b>	<b>Định nghĩa</b>	<b>Nguyên nhân thường gặp</b>
Đau khi xuất tinh	Tình trạng đau liên tục hoặc tái diễn ở cơ quan sinh dục trong khi hoặc ngay sau xuất tinh	<p><i>Thuốc</i> (đối kháng <math>\alpha</math> receptor, hủy giao cảm)</p> <p><i>Tâm thần</i> (hội chứng đau sau xuất tinh)</p> <p><i>Thủ thuật</i> (thắt ống dẫn tinh)</p> <p><i>Bệnh lý</i> (tắc hoặc viêm ống dẫn tinh, xoắn tinh hoàn, viêm tuyến tiền liệt, ung thư tuyến tiền liệt, tăng sản lành tính tuyến tiền liệt)</p>
<b><i>Rối loạn cực khoái</i></b>	Tình trạng khó đạt được cực khoái, kéo dài đáng kể thời gian đạt được cực khoái hoặc mất khả năng đạt được cực khoái trong hoạt động tình dục, tình trạng này có thể xảy ra liên tục hoặc tái diễn, và dẫn đến ảnh hưởng tâm lý [14]	<p><i>Thuốc</i> (các thuốc ức chế tái hấp thu chọn lọc serotonin, chống trầm cảm 3 vòng, ức chế monoamine oxidase, chất gây nghiện)</p> <p><i>Bệnh lý thần kinh trung ương</i> (đa xơ cứng, Parkinson, múa giật Huntington, cắt giao cảm tủy sống)</p> <p><i>Tâm thần</i> (lo âu khi thực hiện, yếu tố về hoàn cảnh, lo sợ có thai, giảm ham muốn tình dục)</p>
<b><i>Giảm khả năng xìu dương vật</i></b> Bệnh lý cấu trúc dương vật		<i>Bất thường cấu trúc dương vật</i> (Peyronie, hẹp bao quy đầu)

<b>Biểu hiện lâm sàng</b>	<b>Định nghĩa</b>	<b>Nguyên nhân thường gặp</b>
Cương đau dương vật kéo dài (nguyên phát hoặc thứ phát)	Tình trạng dương vật cương cứng quá mức gây đau và kéo dài (> 4 giờ) không kèm theo ham muốn tình dục, và thường xảy ra sau các kích thích tình dục bình thường [15]	<p><i>Cương đau nguyên phát:</i> vô căn</p> <p><i>Cương đau thứ phát do bệnh lý:</i> huyết học (thiếu máu hồng cầu hình liềm, leukemia, đa xơ cứng), bệnh thâm nhiễm (Faber, amyloidosis), viêm nhiễm (tularemia, quai bị), bệnh lý thần kinh, khối u, chấn thương</p> <p><i>Cương đau thứ phát do thuốc:</i> phenothiazin, trazodon, cocain, thuốc giãn mạch tiêm vào dương vật</p>

### **1.1.2. Các thuốc điều trị suy sinh dục nam**

Các biện pháp điều trị suy sinh dục nam bao gồm các biện pháp điều trị nội khoa, điều trị ngoại khoa, với việc kết hợp điều chỉnh lối sống/yếu tố nguy cơ, điều trị nguyên nhân và điều trị triệu chứng.

Như đã trình bày ở bảng 1.1, suy giảm chức năng sinh dục nam có thể do nhiều nhóm nguyên nhân gây ra, bao gồm các yếu tố tâm thần, thần kinh, hormon, các bệnh lý toàn thân/tại chỗ, hoặc do thuốc. Tùy từng nhóm nguyên nhân sẽ có các phương pháp điều trị nguyên nhân tương ứng. Với các nguyên nhân tâm thần, thần kinh, hay bệnh toàn thân, các phương pháp điều trị mang tính chuyên khoa sâu sẽ được lựa chọn tùy thuộc vào từng trường hợp cụ thể. Luận án này sẽ tập trung trình bày về các thuốc thường được sử dụng trong điều trị suy giảm chức năng sinh dục nam, bao gồm liệu pháp thay thế hormon và các thuốc điều trị một số triệu chứng chính của suy sinh dục nam (thuốc điều trị rối loạn cương dương, thuốc điều trị xuất tinh sớm).

#### **1.1.2.1. Liệu pháp thay thế testosterone**

Testosterone là androgen có vai trò chủ yếu đối với chức năng sinh sản nam, với tác dụng giúp phát triển cơ quan sinh dục bên ngoài và đặc điểm giới tính thứ phát trong giai đoạn trước tuổi dậy thì, đồng thời duy trì đặc điểm giới tính thứ phát, bắt đầu và duy trì quá trình sản sinh tinh trùng, kích thích và duy trì chức năng tình dục ở nam giới sau tuổi dậy thì. Tác dụng của testosterone và chất chuyển hóa dihydrotestosterone có thể được thực hiện thông qua các androgen receptor (AR), phân tử protein 110 kD có mặt trong nhân và bào tương tế bào đích, theo cơ chế phụ thuộc gắn DNA (tác dụng thông qua hệ gen) để điều hòa sự phiên mã của các gen đích, hoặc theo cơ chế không phụ thuộc gắn DNA (tác dụng không thông qua hệ gen) để khởi động một loạt các hoạt động trong tế bào như sự phosphoryl hóa chuỗi tín hiệu truyền tin thứ 2 [16].

Suy tuyến sinh dục nam (male hypogonadism) là một hội chứng lâm sàng gây ra bởi sự thiếu hụt androgen có thể ảnh hưởng xấu đến chức năng của nhiều cơ quan

và chất lượng cuộc sống [8], và đây là một trong những thể bệnh thường gặp gây suy giảm chức năng sinh dục ở nam giới [7].

### Chỉ định

Liệu pháp thay thế testosterone (testosterone replacement therapy – TRT) được sử dụng ở những bệnh nhân nam giới có sự thiếu hụt hoặc nồng độ testosterone thấp đã được xác định bằng các triệu chứng lâm sàng và xét nghiệm sinh hóa. Mục đích sử dụng TRT nhằm phục hồi nồng độ testosterone về giới hạn sinh lý bình thường theo nhóm tuổi của bệnh nhân, và cải thiện các triệu chứng liên quan đến thiếu hụt androgen, từ đó giúp cải thiện chất lượng cuộc sống, chức năng tình dục, sức mạnh cơ và mật độ khoáng xương của bệnh nhân [8].

### Chống chỉ định

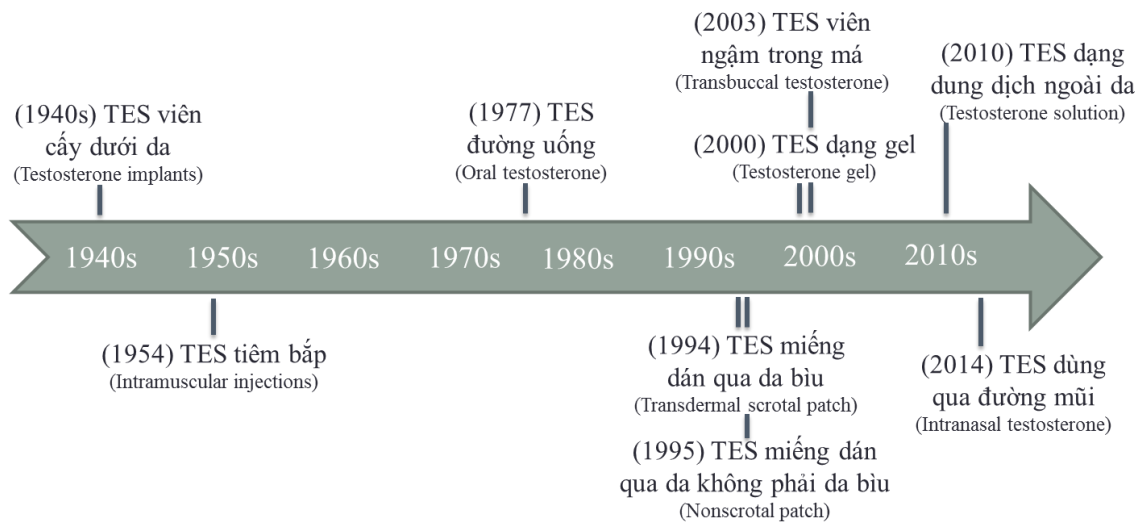
Liệu pháp thay thế testosterone chống chỉ định trong một số trường hợp sau [8]:

- Đã được xác định hoặc nghi ngờ ung thư biểu mô phụ thuộc androgen: *ung thư tuyến tiền liệt* hoặc *ung thư vú* ở nam
- Tiền sử hoặc hiện tại có khối u gan
- Chứng ngừng thở khi ngủ nặng
- Bệnh nhân nam vô sinh mong muốn có con
- Haematocrit > 54%
- Triệu chứng đường tiết niệu dưới nặng do phì đại lành tính tuyến tiền liệt
- Suy tim mạn tính nặng (NYHA IV)

### Lựa chọn chế phẩm điều trị

Testosterone tự nhiên được hấp thu tốt ở đường tiêu hóa, tuy nhiên bị chuyển hóa nhanh tại gan, điều đó dẫn tới khó duy trì nồng độ bình thường trong huyết thanh ở bệnh nhân suy tuyến sinh dục. Với nỗ lực cải thiện sinh khả dụng và hiệu quả điều trị, các nhà nghiên cứu đã phát triển nhiều dạng bào chế của testosterone với sự khác nhau về đường dùng, dược động học và các tác dụng không mong muốn. Các chế phẩm testosterone có sẵn trên thị trường hiện nay gồm: dạng viên cấy dưới da, dạng tiêm bắp, dạng uống, các hệ trị liệu qua da, viên ngậm trong má, và dạng gel dùng đường mũi.





**Hình 1.1.** Lịch sử phát triển của liệu pháp thay thế testosterone [17]

(TES: Testosterone)

Việc lựa chọn chế phẩm testosterone nào nên là quyết định chung của cả bệnh nhân và bác sĩ. Các chế phẩm có thời gian tác dụng ngắn nên được ưu tiên sử dụng trong thời gian điều trị ban đầu, những tác dụng không mong muốn xuất hiện sớm trong giai đoạn này có thể được quan sát và phác đồ điều trị có thể ngừng lại nếu cần [8].

**Bảng 1.2.** So sánh các dạng chế phẩm testosterone [18]

<b>Dạng bào chế</b>	<b>Tần suất dùng thuốc</b>	<b>Ưu điểm</b>	<b>Nhược điểm</b>	<b>Tác dụng không mong muốn</b>
<i>Viên cấy dưới da</i> Testosteron dạng pellet	Mỗi 3 – 6 tháng	Tần suất dùng thuốc ít, dễ tuân thủ điều trị, ít nguy cơ lây nhiễm	Yêu cầu gây tê tại chỗ, phải rạch da	Đẩy viên thuốc ra khỏi vị trí cấy; xơ hóa, chảy máu và nhiễm khuẩn tại vị trí cấy
<i>Tiêm bắp</i>				
Testosteron propionat	2 – 3 lần/tuần	Tần suất dùng thuốc ít so với dạng dùng tại chỗ, có thể ngừng thuốc khi xuất hiện tác dụng phụ	Nồng độ TES dao động dẫn đến các biến đổi về tâm trạng, ham muốn tình dục	Viêm và đau tại vị trí tiêm
Testosteron cypionat Testosteron enanthat	Mỗi 2 – 4 tuần			
Testosteron undecanoat	Mỗi 10 – 14 tuần	Tần suất dùng thuốc ít nhất trong các dạng tiêm bắp, nồng độ TES ổn định	POME, không thể ngừng thuốc khi xuất hiện tác dụng phụ	Viêm và đau tại vị trí tiêm
<i>Viên ngậm trong má</i>	2 lần/ngày	Hấp thu nhanh, nồng độ TES sinh lý	Kích ứng nướu răng, dùng nhiều lần/ngày	Các vấn đề về nướu (kích ứng, viêm, phù)
<i>Uống</i>				

<b>Dạng bào chế</b>	<b>Tần suất dùng thuốc</b>	<b>Ưu điểm</b>	<b>Nhược điểm</b>	<b>Tác dụng không mong muốn</b>
Methyltestosteron	1 – 3 lần/ngày	Dễ dùng, hấp thu nhanh, ít bị chuyển hóa qua gan lần đầu	Nồng độ TES dao động, không sinh lý, thời gian tác dụng ngắn, cần dùng nhiều lần/ngày với thức ăn giàu chất béo	Độc tính trên gan (viêm gan, ứ mật, ban xuất huyết, các khối u gan lành tính và ác tính)
Testosteron undecanoat		Dễ dùng, hấp thu qua hệ bạch huyết, ít bị chuyển hóa qua gan lần đầu		Buồn nôn, chức năng gan bất thường
<i>Miếng dán qua da</i>	1 lần/ngày	Dễ dùng, nồng độ TES sinh lý	Nguy cơ lây nhiễm sang người khác, phải dùng thường xuyên	Kích ứng tại vị trí dùng thuốc
<i>Gel/dung dịch</i>		Dễ dùng, nồng độ TES sinh lý, ít gây kích ứng hơn dạng miếng dán		
<i>Dạng gel hấp thu qua đường mũi</i>	3 lần/ngày	Không xâm lấn, không có nguy cơ lây nhiễm sang người khác	Kích ứng mũi, dùng nhiều lần/ngày	Sổ mũi, chảy máu cam

*TES: testosteron; POME: pulmonary oil microembolism (thuyên tắc phổi do dầu)*

### Tác dụng không mong muốn [19],[20]

Các nguy cơ của liệu pháp thay thế testosterone phụ thuộc vào độ tuổi, hoàn cảnh sống và các điều kiện y tế khác, bao gồm nguy cơ ung thư tuyến tiền liệt và xấu đi các triệu chứng của phì đại lành tính tuyến tiền liệt, độc tính trên gan và khối u gan, làm nặng thêm các triệu chứng của chứng ngưng thở khi ngủ và suy tim sung huyết, chứng vú to, vô sinh và các bệnh lý về da. TRT không thích hợp với những nam giới mong muốn có con vì testosterone ngoại sinh sẽ ức chế hoạt động trục vùng dưới đồi-tuyến yên-tinh hoàn.

#### *- Phì đại lành tính tuyến tiền liệt*

Một trong những nguy cơ chủ yếu liên quan đến TRT là ảnh hưởng của testosterone đến tuyến tiền liệt. Tuyến tiền liệt là một tuyến sinh dục phụ thuộc androgen và ngược lại, các thuốc kháng androgen có tác dụng làm giảm thể tích tuyến tiền liệt ở bệnh nhân phì đại lành tính tuyến tiền liệt. Bổ sung testosterone đã được chứng minh là làm tăng kích thước tuyến tiền liệt lên 12%, tuy nhiên các triệu chứng đường tiết niệu dưới và tình trạng bí tiểu không trở nên xấu hơn ở nam giới sử dụng testosterone, và do đó, không có chống chỉ định đối với nam giới được chẩn đoán phì đại lành tính tuyến tiền liệt mức độ nhẹ hoặc trung bình.

#### *- Ung thư tuyến tiền liệt*

Cho đến nay, chưa có bằng chứng thuyết phục về việc testosterone có vai trò gây bệnh trong ung thư tuyến tiền liệt. Nhiều nghiên cứu tiền cứu đã không chỉ ra được bất kỳ mối liên hệ nào giữa testosterone ngoại sinh và nguy cơ ung thư tiền liệt tuyến sau này. Tỷ lệ ung thư tuyến tiền liệt ở nam giới điều trị với testosterone là tương tự với nam giới không điều trị testosterone. Morgentaler và cộng sự đã đề xuất một giả thuyết về sự bão hòa, theo đó sự phát triển của tuyến tiền liệt trở nên không nhạy cảm với những thay đổi ở nồng độ androgen bình thường do sự bão hòa androgen receptor, tuy nhiên có sự tăng trưởng tuyến tiền liệt theo cấp số nhân với nồng độ androgen thấp sau khi cắt bỏ tinh hoàn [21]. Giả thuyết này có thể giải thích tại sao testosterone không trực tiếp gây ung thư tuyến tiền liệt, nhưng nó đã được chứng minh là thúc đẩy sự phát triển của ung thư tuyến tiền liệt. Hiện nay, liệu

pháp ức chế androgen vẫn là nền tảng cho việc điều trị ung thư tuyến tiền liệt, và TRT chống chỉ định đối với ở nam giới bị ung thư tuyến tiền liệt hoặc nguy cơ cao bị ung thư tuyến tiền liệt.

- *Ung thư vú*

Mặc dù chưa có bằng chứng về vai trò trực tiếp của testosterone trong phát triển ung thư vú, nhiều tác giả cho rằng nồng độ testosterone cao có thể dẫn đến tăng quá trình aroma hóa tạo thành một dẫn xuất có hoạt tính của estrogen kích thích vào các receptor tại mô vú, gây căng tức vú và làm tăng nguy cơ ung thư vú ở nam giới.

- *Đa hồng cầu*

Testosterone làm tăng hemoglobin khoảng 5-7% thông qua tác dụng kích thích sản xuất erythropoietin, có thể cải thiện đáng kể các triệu chứng thiếu máu ở nam giới, tuy nhiên có thể dẫn tới tình trạng đa hồng cầu (polycythemia), một tác dụng không mong muốn hiếm gặp ở nam giới được áp dụng TRT. Đa hồng cầu có thể dẫn tới tăng tỷ lệ các biến cố tim mạch, bao gồm đột quỵ, nhồi máu cơ tim, huyết khối tĩnh mạch sâu với nguy cơ thuyên tắc phổi. Những biến chứng này có thể xảy ra với đa hồng cầu, nhưng chúng chưa được chứng minh là sẽ xuất hiện ở nam giới điều trị bổ sung testosterone.

- *Chứng ngừng thở khi ngủ*

Chứng ngừng thở khi ngủ (obstructive sleep apnea – OSA) là một nguy cơ liên quan đến TRT ở nam giới, nhưng nguyên nhân của nó không được hiểu rõ. Trong khi một số nghiên cứu cho rằng không có mối liên quan giữa chứng ngừng thở và TRT, những tác giả khác đã chứng minh rằng chứng ngừng thở xảy ra ở nam giới điều trị với TRT và khi ngừng bổ sung, chứng ngừng thở cũng sẽ biến mất. Chứng ngừng thở khi ngủ là một chống chỉ định tương đối để bắt đầu TRT.

- *Tác dụng không mong muốn khác*

Các khối u gan lành tính và ác tính, ứ mật trong gan, nhiễm độc gan, và suy gan đã được báo cáo với liệu pháp thay thế testosterone. Phần lớn các báo cáo về độc tính trên gan và vàng da gặp với dạng alkyl hóa dùng theo đường uống của

testosteron; do đó các dạng đường uống của testosteron, ngoại trừ testosteron undecanoat, không được khuyến cáo sử dụng.

Khi áp dụng TRT, xung giải phóng của hormon giải phóng gonadotropin có thể bị giảm và sự giải phóng FSH và LH có thể bị ức chế, vì vậy hiện tượng giảm sản sinh tinh trùng đã được quan sát thấy.

Nồng độ testosteron huyết thanh tăng lên đồng thời với sự tăng tiết bã nhờn, từ đó có thể dẫn đến hình thành mụn trứng cá. Các dạng tiêm bắp và dạng dùng tại chỗ của testosteron thường gây ra một số phản ứng trên da, chủ yếu là ban đỏ và ngứa ở khoảng 60% người dùng.

Ít gặp tình trạng ứ dịch và mức độ thường nhẹ với TRT, do vậy cần thận trọng với bệnh nhân suy tim sung huyết và suy giảm chức năng thận. Bên cạnh đó, cũng hiếm gặp các báo cáo về nguy cơ tăng huyết áp.

#### Theo dõi điều trị

Các chỉ số xét nghiệm cần theo dõi trước và trong suốt thời gian điều trị gồm PSA, hemoglobin, hematocrit, lipid máu, và thông số đánh giá chức năng gan. Bệnh nhân cũng cần được theo dõi các dấu hiệu của phù, chứng vú to, ngừng thở khi ngủ, các triệu chứng đường tiết niệu dưới, và mật độ khoáng của xương.

**Bảng 1.3.** Theo dõi điều trị với liệu pháp thay thế testosteron [8],[20]

Nguy cơ	Theo dõi
<i>Phì đại tuyến vú và ung thư vú</i>	Loại trừ các nguyên nhân gây bệnh khác dựa vào tiền sử, khám lâm sàng và các xét nghiệm hormon. Xem xét các thuốc bệnh nhân đang sử dụng có thể gây phì đại tuyến vú: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Kháng androgen: finasterid, bicalutamid</li> <li>- Kháng sinh, kháng nấm: isoniazid, ketoconazol, metronidazol</li> <li>- Hạ huyết áp: amlodipin, captopril, diltiazem, verapamil</li> <li>- Giảm acid dạ dày: cimetidin, omeprazol</li> <li>- Tâm thần: diazepam, haloperidol, chống trầm cảm 3 vòng</li> </ul>
<i>Phì đại lành tính tuyến tiền liệt</i>	Tiền sử bệnh nhân, bảng câu hỏi IPSS Tham khảo ý kiến bác sĩ nếu IPSS > 19 và ngừng TRT

Nguy cơ	Theo dõi
<i>Ung thư tuyến tiền liệt</i>	Tiến hành lại thăm khám trực tràng bằng ngón tay và định lượng nồng độ PSA huyết thanh sau dùng thuốc 3 và 6 tháng. Tiếp tục theo dõi phụ thuộc vào chủng tộc/tuổi của bệnh nhân. Tham khảo ý kiến bác sĩ nếu: PSA > 4 ng/mL; <i>hoặc</i> bất thường trong thăm khám trực tràng; <i>hoặc</i> PSA tăng > 1,0 ng/mL trong 6 tháng đầu điều trị <i>hoặc</i> tốc độ tăng PSA > 0,4 ng/mL/năm; <i>hoặc</i> PSA tăng > 1,4 ng/mL trong bất kỳ giai đoạn điều trị 12 tháng
<i>Bệnh tim mạch</i>	Kiểm tra huyết áp nền của bệnh nhân và đo nhắc lại sau 3 tháng, 6 tháng và mỗi năm sau đó. Với bệnh nhân có nguy cơ cao cần tham khảo ý kiến chuyên khoa tim mạch
<i>Đa hồng cầu</i>	Định lượng lại hematocrit sau 3 tháng, 6 tháng và mỗi năm sau đó. Nếu hematocrit > 54%, ngừng TRT cho đến khi hematocrit trở về giá trị an toàn, bắt đầu điều trị lại với liều thấp hơn
<i>Ngừng thở khi ngủ</i>	Thu thập tiền sử bệnh nhân và thăm khám lâm sàng trước dùng thuốc và sau dùng thuốc 3 – 6 tháng. Xem xét nguyên nhân khác gây ngừng thở khi ngủ
<i>Trứng cá</i>	Tiền sử bệnh nhân và thăm khám lâm sàng. Điều chỉnh liều và/ <i>hoặc</i> tham khảo ý kiến của chuyên khoa da liễu.
<i>Độc tính trên gan</i>	Tiền sử bệnh nhân và thăm khám lâm sàng. Không cần thiết tiến hành xét nghiệm đánh giá chức năng gan với dạng gel, viên cứng và tiêm bắp
<i>Vô sinh</i>	Tiền sử bệnh nhân và thăm khám lâm sàng. Xem xét thay đổi phương pháp điều trị nếu bệnh nhân mong muốn có con

PSA: prostate specific antigen (kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt);

IPSS: International Prostate Symptom Score (thang điểm quốc tế về triệu chứng tuyến tiền liệt)

### 1.1.2.2. Thuốc điều trị rối loạn cương dương

Các phương pháp chính điều trị rối loạn cương dương hiện nay bao gồm thay đổi lối sống, liệu pháp dùng thuốc, dụng cụ chân không, và phẫu thuật, trong đó liệu

pháp dùng thuốc với các thuốc ức chế phosphodiesterase 5 và các thuốc tiêm vào thể hang là những lựa chọn hàng đầu cho bệnh nhân rối loạn cương dương.

#### Thuốc ức chế phosphodiesterase 5

Khi có các kích thích tình dục, nitric oxid (NO) được giải phóng ra từ các đầu tận cùng thần kinh và từ các tế bào nội mô tại thể hang. NO hoạt hóa guanylate cyclase chuyển guanosine triphosphate thành cyclic guanosine monophosphate (cGMP), kích hoạt một chuỗi các sự kiện phụ thuộc cGMP. Sự tích lũy cGMP dẫn tới giãn cơ trơn thể hang và làm tăng lưu lượng dòng máu tới dương vật.

PDE5 là enzym được tìm thấy chủ yếu trong cơ trơn thể hang, có tác dụng thủy phân cGMP. Các chất ức chế PDE5 có cấu trúc tương tự cGMP, chúng ngăn cạnh tranh với PDE5 và ức chế thủy phân cGMP, do đó làm tăng tác dụng của NO giúp kéo dài thời gian cương dương. Các chất ức chế PDE5 không đóng vai trò là yếu tố khởi động của quá trình cương dương, do đó, sau khi sử dụng thuốc, cần có các kích thích tình dục để hiện tượng cương dương có thể xảy ra. Tác dụng của thuốc được đánh giá bằng khả năng làm dương vật cương cứng đủ để thâm nhập âm đạo. Hiện nay có bốn chất ức chế PDE5 được cấp phép sử dụng rộng rãi và là lựa chọn hàng đầu trong điều trị rối loạn cương dương, bao gồm sildenafil, tadalafil, vardenafil và avanafil [9]; ngoài ra, một số chất ức chế PDE5 khác được chấp thuận lưu hành riêng tại một số quốc gia, ví dụ như udenafil và mirodenafil được chỉ định tại Hàn Quốc, hoặc lodenafil được sử dụng tại Brazil [22].

#### *- Chỉ định*

Các chất ức chế PDE5 được chỉ định điều trị rối loạn cương dương ở bệnh nhân nam giới trưởng thành khi cần thiết. Ở liều khuyến cáo, thuốc không có tác dụng nếu không có kích thích tình dục [9]. Năm 2008, tadalafil đã được FDA chấp thuận cho sử dụng một lần mỗi ngày trong điều trị rối loạn cương dương, và vào năm 2011, tadalafil được cấp phép thêm chỉ định điều trị các dấu hiệu và triệu chứng của phì đại lành tính tuyến tiền liệt kèm hoặc không kèm theo rối loạn cương dương. Ngoài ra, sildenafil và tadalafil còn được chỉ định điều trị tăng áp động mạch phổi với tên biệt dược Revatio và Adcirca, tương ứng [23].



**Bảng 1.4.** Đặc điểm của một số thuốc ức chế PDE5 [23]

	<b>Sildenafil</b>	<b>Vardenafil</b>	<b>Vardenafil ODT</b>	<b>Tadalafil</b>	<b>Avanafil</b>
Năm cấp phép	1998	2003	2010	2003	2012
Sinh khả dụng	41% (25 – 63%)	15%	–	–	–
$T_{max}$	1 giờ (0,5 – 2 giờ)	1 giờ (0,5 – 2 giờ)	1,5 giờ (0,75 – 2,5 giờ)	2 giờ (0,5 – 6 giờ)	0,5 – 0,75 giờ
Khoảng thời gian hiệu quả	0,5-4 giờ sau uống thuốc	–	–	Tới 36 giờ sau uống thuốc	Ngay 0,25 giờ sau uống thuốc
Thời điểm uống thuốc	1 giờ trước hoạt động tình dục	1 giờ trước hoạt động tình dục	1 giờ trước hoạt động tình dục	≥ 0,5 giờ trước hoạt động tình dục	0,5 giờ trước hoạt động tình dục
Chuyển hóa	Chủ yếu: CYP3A4 Ít: CYP2C9	Chủ yếu: CYP3A4 Ít: CYP3A5, CYP2C	Chủ yếu: CYP3A4 Ít: CYP3A5, CYP2C	CYP3A4	Chủ yếu: CYP3A4 Ít: CYP2C
Ức chế PDE khác	PDE1, PDE6	PDE1, PDE6	PDE1, PDE6	PDE11	–
Liều dùng	25-100 mg/ngày	5-20 mg/ngày	10 mg/ngày	5-20 mg/ngày	50-200 mg/ngày
<i>C<sub>max</sub> = nồng độ đỉnh; CYP = cytochrom P450; ODT = oral dissolving tablet (viên nén phân tán trong miệng); T<sub>max</sub> = thời gian đạt đến nồng độ đỉnh</i>					

- *Chống chỉ định*

- + Quá mẫn với bất kỳ thành phần nào của thuốc.
- + Sử dụng đồng thời với các chất cho NO hoặc các nitrat.
- + Bệnh nhân nam mà hoạt động tình dục không được khuyến khích (ví dụ: có bệnh lý tim mạch nặng như đau thắt ngực không ổn định, suy tim nặng).
- + Suy gan nặng, hạ huyết áp (huyết áp < 90/50 mmHg), tiền sử đột quỵ hoặc nhồi máu cơ tim.
- + Bệnh nhân mất thị lực một bên do bệnh thần kinh thị giác do thiếu máu cục bộ vùng trước không do nguyên nhân động mạch có hoặc không có liên quan với việc dùng thuốc ức chế PDE5 trước đó.
- + Rối loạn thoái hóa võng mạc di truyền như viêm võng mạc sắc tố (một phần nhỏ những bệnh nhân này có rối loạn di truyền của PDE võng mạc)

- *Tác dụng không mong muốn*

Các thuốc ức chế PDE5 nói chung được dung nạp tốt khi điều trị rối loạn cương dương. Các tác dụng không mong muốn thường gặp nhất bao gồm đau đầu, đỏ bừng, ngạt mũi, viêm mũi họng, và khó tiêu. Hiếm gặp nhưng nghiêm trọng là nguy cơ kéo dài thời gian cương dương trên 4 giờ gây chứng cương đau dương vật kéo dài (priapism) đã được báo cáo với các chất ức chế PDE5, và bệnh nhân cần tìm kiếm sự hỗ trợ y tế ngay lập tức khi gặp phải vấn đề này. Cương đau dương vật kéo dài không được điều trị ngay có thể dẫn đến tổn thương mô dương vật vĩnh viễn [23],[24].

Các bất thường về thị giác có thể gặp khi sử dụng các chất ức chế PDE5. Vào tháng 7 năm 2005, FDA đã đưa ra khuyến cáo ngừng thuốc và tìm kiếm sự hỗ trợ y tế ngay khi xuất hiện tình trạng mất thị lực đột ngột. Các trường hợp bệnh thần kinh thị giác do thiếu máu cục bộ vùng trước không do nguyên nhân động mạch (non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy – NAION) đã được báo cáo trong thời gian hậu mại của thuốc. Trong tình trạng này, lưu lượng dòng máu tới dây thần kinh thị giác bị giảm. Mặc dù bằng chứng về mối quan hệ nhân quả là chưa đầy đủ, cần thận trọng khi chỉ định các chất ức chế PDE5, đặc biệt ở nam giới đã có yếu tố nguy

cơ có thể dẫn đến NAION, như tăng huyết áp, đái tháo đường và tăng lipid máu [23],[24].

Mất thính giác đột ngột cũng đã được báo cáo trong các nghiên cứu hậu mại. Vào tháng 10 năm 2007, FDA yêu cầu trình bày rõ nguy cơ tiềm ẩn này trên nhãn thuốc của các chất ức chế PDE5. Tại thời điểm đưa ra yêu cầu, có 29 trường hợp mất thính giác đã được ghi nhận trong các phân tích sau khi đưa thuốc ra thị trường. Các trường hợp khác đã được xác định trong một phân tích hồi cứu các thử nghiệm lâm sàng. Mặc dù mối liên hệ trực tiếp giữa mất thính lực với việc sử dụng các chất ức chế PDE5 chưa được xác nhận, bệnh nhân được khuyên ngừng sử dụng tất cả các chất ức chế PDE5 và tìm kiếm sự trợ giúp y tế nếu có hiện tượng giảm đột ngột hoặc mất thính lực [23],[24].

Đau lưng và đau cơ là những tác dụng không mong muốn có thể gặp với tadalafil. Đau lưng thường gặp với mức độ nhẹ đến trung bình, xuất hiện ở thời điểm 12 – 24 sau dùng thuốc, và các triệu chứng thường biến mất trong 48 giờ sau khi ngừng thuốc. Paracetamol và các thuốc chống viêm không steroid có thể được sử dụng để giảm đau khi cần thiết [23],[24].

#### Thuốc tiêm vào thể hang

Sử dụng các thuốc giãn mạch tiêm vào thể hang của dương vật được coi là liệu pháp hàng thứ hai trong điều trị rối loạn cương dương ở những bệnh nhân không đáp ứng với thuốc ức chế PDE5 đường uống. Các thuốc hiện nay được sử dụng để tiêm vào thể hang gồm alprostadil và một số thuốc khác (papaverin, phentolamin, peptid ruột hoạt mạch, forskolin).

Alprostadil là một prostaglandin E1 (PGE1) tổng hợp đã được cấp phép cho điều trị rối loạn cương dương. Alprostadil gây cương dương thông qua cơ chế gắn với protein G ghép cặp với các PGE1 receptor trên bề mặt tế bào cơ trơn, hoạt hóa con đường cyclic adenosine monophosphate (cAMP), do đó làm giãn cơ trơn thể hang và cương dương. Tác dụng của alprostadil không phụ thuộc NO hoặc hệ thần kinh nguyên vẹn, do vậy khả năng gây cương dương của alprostadil độc lập với các kích thích [22]. Tác dụng gây cương dương của alprostadil xuất hiện sau tiêm 5 –

15 phút và thời gian kéo dài tác dụng phụ thuộc vào liều tiêm [9]. Các biến chứng khi tiêm thể hang alprostadil bao gồm đau dương vật (50% bệnh nhân báo cáo đau sau 11% tổng số mũi tiêm), cương kéo dài (5%), cương đau dương vật (1%) và xơ hóa thể hang (2%). Đau thường giảm dần sau khi sử dụng kéo dài do sự thích nghi của bệnh nhân, và có thể giảm bớt bằng cách bổ sung natri bicarbonat hoặc thuốc tê tại chỗ. Xơ hóa thể hang (hình thành từ khối máu tụ nhỏ) thường khỏi trong vài tháng sau khi ngừng tiêm. Tuy nhiên, tình trạng xơ hóa vỏ có thể gợi ý dấu hiệu của bệnh Peyronie và cần ngừng tiêm thể hang. Tác dụng không mong muốn toàn thân thường ít gặp, chủ yếu là giảm huyết áp nhẹ, đặc biệt khi dùng liều cao. Chống chỉ định của thuốc bao gồm nam giới có tiền sử quá mẫn với alprostadil, nam giới có nguy cơ cương đau dương vật, và nam giới có các rối loạn chảy máu [9]. Viên đặt niệu đạo và kem bôi đầu dương vật là những dạng bào chế khác của alprostadil được cấp phép để điều trị rối loạn cương dương với mục đích thay thế cho phương pháp tiêm vào thể hang ở những bệnh nhân thích phương pháp điều trị ít xâm lấn mặc dù hiệu quả điều trị của đường dùng này kém hơn [9],[22].

Ngoài alprostadil, một số thuốc khác với các cơ chế tác dụng khác nhau cũng có thể được tiêm vào thể hang như papaverin, phentolamin, peptid ruột hoạt mạch, và forskolin. Các thuốc giãn mạch tiêm vào thể hang thường không mang lại hiệu quả điều trị cao khi dùng đơn độc. Việc phối hợp các thuốc này sẽ có tác dụng hiệp đồng và có thể làm tăng tỷ lệ đáp ứng của bệnh nhân lên tới 90%. Thường gặp và có tác dụng tốt nhất là dạng phối hợp của papaverine, phentolamin và alprostadil [22],[24].

### ***1.1.2.3. Thuốc điều trị xuất tinh sớm***

Xuất tinh sớm (premature ejaculation – PE) là tình trạng rối loạn xuất tinh thường gặp nhất. Điều trị PE nên được cá thể hóa (dựa trên nguyên nhân gây bệnh), và kết hợp giữa tư vấn tâm lý hoặc liệu pháp hành vi với việc sử dụng thuốc sẽ mang lại hiệu quả tốt hơn so với đơn trị liệu. Thuốc hàng đầu được lựa chọn trong điều trị xuất tinh sớm là dapoxetine.

Dapoxetine, một SSRI tác dụng ngắn, là thuốc dùng theo đường uống đầu tiên được cấp phép chỉ định điều trị PE cho nam giới 18 – 64 tuổi. Thuốc được hấp thu cũng như có tốc độ thanh thải nhanh nên thích hợp để sử dụng theo nhu cầu (on-demand use) [9],[25],[26]. Các kết quả nghiên cứu cho thấy, sử dụng dapoxetine giúp kéo dài thời gian trễ xuất tinh trong âm đạo, bệnh nhân cảm thấy tự tin hơn trong việc kiểm soát xuất tinh cũng như tăng mức độ hài lòng [27]. Không có dữ liệu cụ thể về thời gian hiệu lực của dapoxetine, nhưng dữ liệu lâm sàng cho thấy dapoxetine có hiệu quả khi giao hợp xảy ra 1 – 3 giờ sau khi dùng thuốc. Tác dụng không mong muốn thường gặp nhất khi sử dụng dapoxetine theo nhu cầu là nôn, chóng mặt, đau đầu, tiêu chảy, buồn ngủ, mệt mỏi, mất ngủ, và viêm mũi họng. Hầu hết các tác dụng phụ này là nhẹ và thoáng qua, và bệnh nhân có thể dung nạp được. Tụt huyết áp tư thế và ngất đã được ghi nhận trong các thử nghiệm lâm sàng và cần được lưu ý khi kê đơn dapoxetine. Không giống các SSRI khác, dữ liệu an toàn của dapoxetine cho thấy không có bằng chứng về sự thay đổi tâm trạng, ý định tự tử, hoặc hội chứng cai sau điều trị [9]. Năm 2009, dapoxetine đã được lưu hành chính thức cho chỉ định điều trị PE tại một số nước châu Âu (ví dụ: Anh, Thụy Điển, Phần Lan, Tây Ban Nha, Bồ Đào Nha, Đức, Áo, và Ý) và New Zealand, tuy nhiên, hiện nay, thuốc vẫn chưa được cấp phép cho chỉ định này tại Mỹ [26].

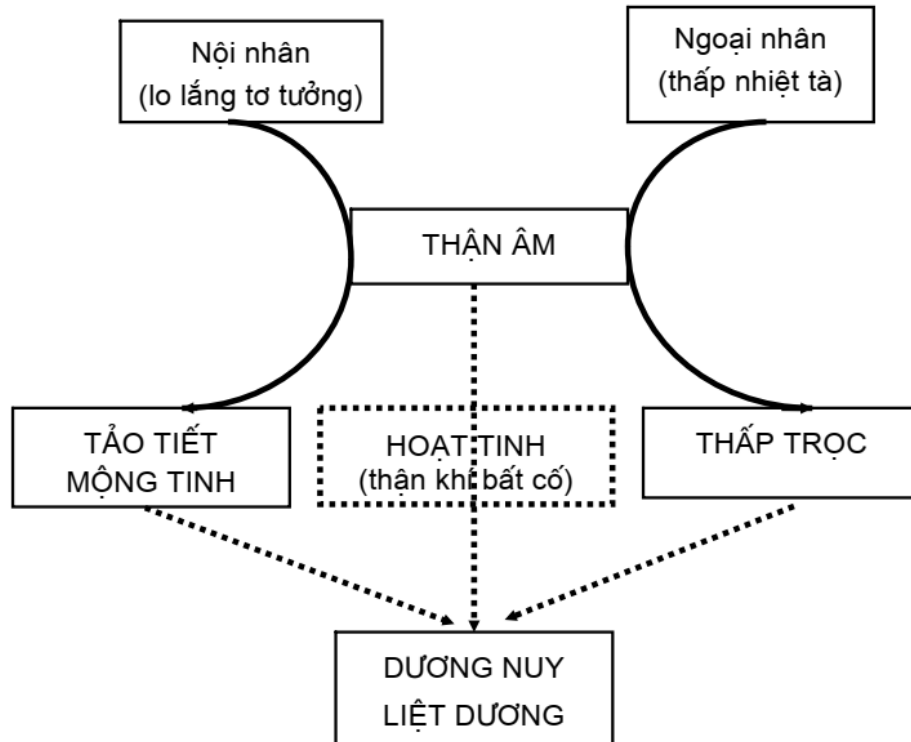
## **1.2. Tổng quan về các dược liệu điều trị suy sinh dục nam**

### **1.2.1. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh về suy sinh dục nam theo y học cổ truyền**

Chúng bắt lực thuộc phạm trù của chứng di tinh, tảo tiết và liệt dương, dương nuy mà cơ chế không nằm ngoài phạm vi của hai chứng thận âm hư và thận dương hư [28].

Thận với chức năng tàng tinh (chủ yếu là tinh sinh dục), nếu do vì lo lắng căng thẳng hoặc tư tưởng đến chuyện tình dục quá mức thì hậu quả sẽ là mộng tinh, tảo tiết mà bệnh cảnh lâm sàng thường biểu hiện ở các thể tâm thận bất giao hoặc tương hỏa vọng động. Ngược lại nếu do vì cảm nhiễm thấp nhiệt tà qua đường sinh dục tiết niệu thì triệu chứng biểu hiện sẽ là tinh tự xuất sau khi đi tiểu hoặc là thấp trọc. Nếu bệnh kéo dài lâu ngày sẽ đưa đến thận khí bất cố với triệu chứng hoạt tinh: tinh

tự xuất khi liên tưởng đến chuyện tình dục hoặc khi gắng sức hoặc đưa đến chứng dương nuy, liệt dương mà bệnh cảnh lâm sàng thường biểu hiện ở dưới thể tâm tý lưỡng hư hoặc mệnh môn hỏa suy [28].



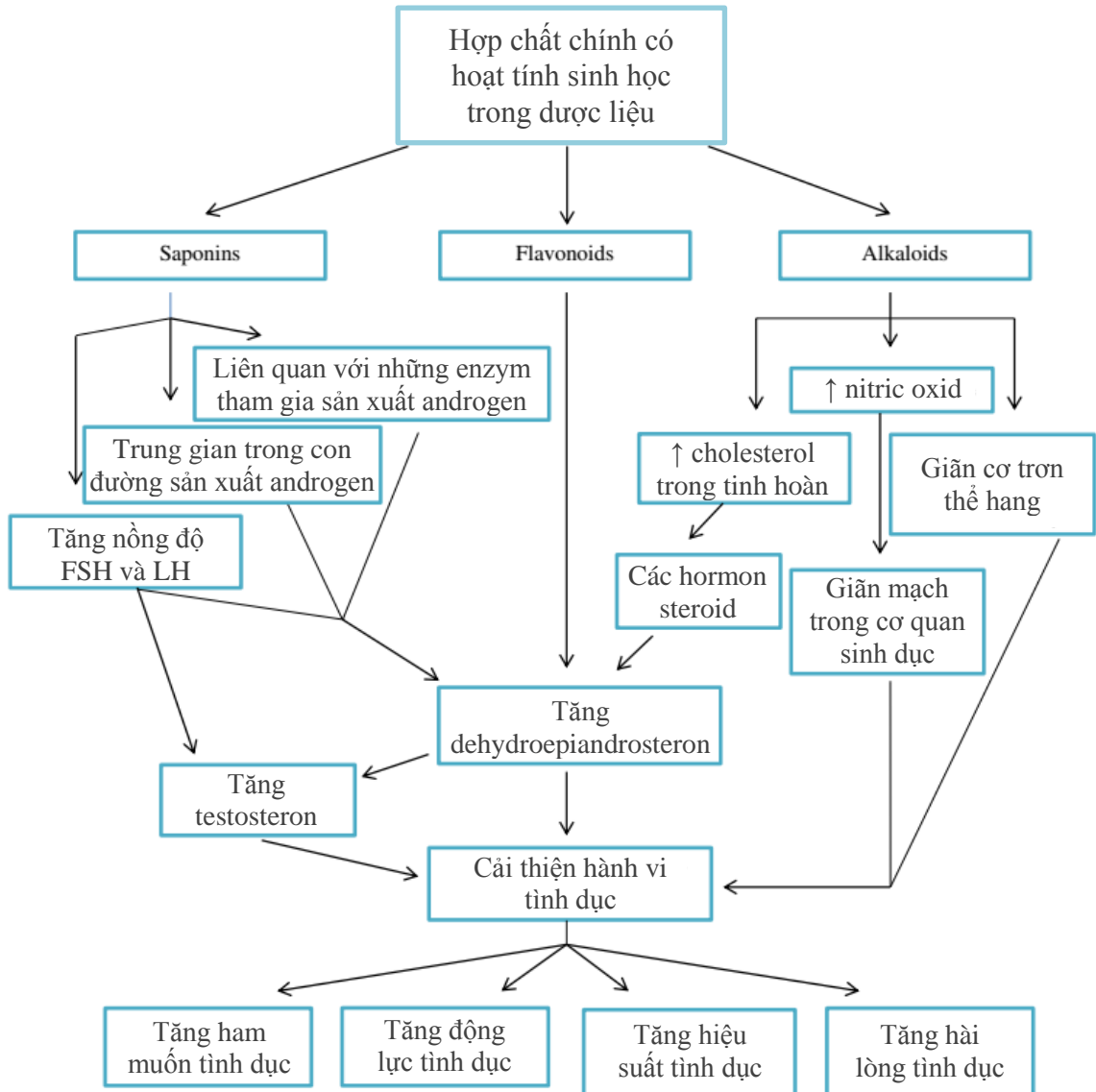
**Hình 1.2.** Cơ chế bệnh sinh về suy sinh dục nam theo y học cổ truyền [28]

### 1.2.2. Các dược liệu điều trị suy sinh dục nam

Theo lý luận của YHCT, các biểu hiện của suy sinh dục có thể sắp xếp thành các dạng bệnh danh khác nhau như liệt dương được gọi là chứng dương nuy, xuất tinh sớm được gọi là chứng hoạt tinh, suy giảm hoặc không có tinh trùng dẫn đến vô sinh được gọi là chứng nam tử bất dục, suy giảm sinh dục sớm được gọi là tảo tiết.... Điều trị các rối loạn sinh dục nam bằng các liệu pháp YHCT đã được chú ý từ lâu, tùy theo thể bệnh mà có các phương thuốc thích hợp [28].

Một số lượng lớn các loại dược liệu cổ truyền đã được sử dụng để điều trị suy giảm chức năng sinh dục nam, đặc biệt trong điều trị rối loạn cương dương. Các dược liệu này có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc ở dạng công thức phối hợp trong các bài thuốc. Hầu hết các dược liệu được sử dụng theo kinh nghiệm và chưa có đầy đủ bằng chứng thuyết phục. Vì vậy, nhiều nghiên cứu sử dụng công nghệ sinh học hiện

đại đã và đang được tiến hành ở Việt Nam cũng như trên thế giới để tìm hiểu và đưa ra những bằng chứng khoa học đáng tin cậy về cơ chế tác dụng liên quan đến cải thiện chức năng sinh dục nam của một số dược liệu hoặc các hợp chất chiết xuất từ các dược liệu.



**Hình 1.3.** Tác dụng kích thích hoạt động tình dục ở nam giới của các hợp chất có mặt trong các dược liệu y học cổ truyền [29]

**Bảng 1.5.** Tác dụng của một số dược liệu, chiết xuất từ dược liệu hoặc phối hợp một số dược liệu trong điều trị suy giảm chức năng sinh dục nam

<b>Dược liệu hoặc chiết xuất từ dược liệu</b>	<b>Tác dụng</b>	<b>Tham khảo</b>
<p>Bạch quả (<i>Ginkgo biloba</i>)</p>	<p>Hoạt chất EGb761 trong lá Bạch quả làm tăng biểu hiện nNOS tại các dây thần kinh hang; tăng hoạt tính dopaminergic ở một số vùng của não (vùng tiền thị giữa, nhân cận não thất) nên làm tăng hoạt động cương dương không do tiếp xúc, hoạt động cương dương được khởi động bởi các trung tâm não</p>	<p>[30]</p>
<p>Xà sàng (<i>Cnidium monnieri</i>)</p>	<p>Cao chiết cồn của quả Xà sàng có tác dụng gây cương dương, làm tăng áp lực thể hang có thể do tác dụng làm tăng giải phóng NO từ nội mô và ức chế PDE của hoạt chất osthol. Một số hoạt chất khác như imperatorin và xanthotoxin cũng thể hiện tác dụng làm giãn cơ trơn thể hang của thỏ</p>	<p>[30], [31]</p>
<p>Tetrandrin chiết xuất từ rễ cây Phân phòng kỷ (<i>Stephania tetrandra</i> S Moore)</p>	<p>Làm giãn cơ trơn thể hang của thỏ thông qua tác dụng làm giảm nồng độ <math>Ca^{2+}</math> nội bào trong tế bào cơ trơn thể hang</p>	<p>[30]</p>
<p>Neferin chiết xuất từ phôi hạt màu xanh lá của cây Sen hồng (<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn)</p>	<p>Làm giãn cơ trơn thể hang của thỏ thông qua tác dụng làm giảm nồng độ <math>Ca^{2+}</math> nội bào và tăng lượng cAMP trong tế bào cơ trơn thể hang</p>	<p>[30]</p>
<p>Ngải đen (<i>Kaempferia parviflora</i>)</p>	<p>Thành phần 5,7-methoxyflavon phân lập từ rễ Ngải đen thể hiện hoạt tính ức chế PDE5; hoạt chất 3,5,7,30,40-pentamethoxyflavon có</p>	<p>[30], [32]</p>



Dược liệu hoặc chiết xuất từ dược liệu	Tác dụng	Tham khảo
	tác dụng làm giãn cơ trơn thể hang người trên <i>in vitro</i> do làm giảm nồng độ $Ca^{2+}$ nội bào trong thể hang	
Tam thất ( <i>Panax notoginseng</i> )	Cải thiện chức năng cương dương trên chuột cống bị rối loạn cương dương do đái tháo đường bằng cách tăng sự biểu hiện Akt và ức chế stress oxy hóa tại dương vật; phục hồi chức năng nội mạc tại thể hang do tăng biểu hiện eNOS	[30], [33]
Berberin chiết xuất từ rễ cây Hoàng liên ( <i>Coptis chinensis</i> Franch)	Làm giãn cơ trơn thể hang thông qua cơ chế làm tăng sự biểu hiện của eNOS mRNA; cải thiện chức năng cương dương nhờ tác dụng làm giảm stress oxy hóa	[30], [34]
Icariin chiết xuất từ cây Dâm dương hoắc ( <i>Herba epimedii</i> )	Ức chế PDE5 và duy trì sự biểu hiện của NOS trên chuột cống bị tăng huyết áp tự nhiên; điều hòa giảm con đường TGF $\beta$ 1/Smad2 trên chuột cống bị gây đái tháo đường bằng streptozotocin; tăng nồng độ testosterone trên chuột cống bị gây tổn thương hệ sinh sản bằng cyclophosphamid	[30]
Hải mã ( <i>Hippocampus</i> ) và Sâm Ngọc Linh ( <i>Panax vietnamensis</i> )	Cải thiện cấu trúc và chức năng tinh hoàn của chuột cống bình thường và chuột cống bị tổn thương tinh hoàn do nhiệt; tăng nồng độ testosterone, FSH trong máu	[35]
Viên nang Hồi xuân hoàn	Tăng nồng độ testosterone trong máu, tăng số lượng và chất lượng tinh trùng của chuột cống đực trưởng thành	[36]

Dược liệu hoặc chiết xuất từ dược liệu	Tác dụng	Tham khảo
Tỏa dương ( <i>Balanophora laxiflora</i> )	Thể hiện hoạt tính androgen rõ; tăng ham muốn tình dục, tăng hiệu quả giao phối và tăng sức mạnh tình dục trên những chuột cống hoạt động tình dục kém; thúc đẩy sự phục hồi trên chuột cống bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat	[37]
Đông trùng hạ thảo nam – Sâu chít ( <i>Brihaspa atrostigmella</i> Moore)	Tăng cân nặng mào tinh hoàn và túi tinh, testosterone ở chuột gây suy giảm sinh sản bằng nhiệt, stress và chuột cống đực bình thường; phục hồi tổn thương tinh hoàn ở chuột gây suy giảm sinh sản và tăng quá trình tạo tinh trùng ở tất cả các lô chuột	[38]

### 1.3. Các mô hình thực nghiệm nghiên cứu tác dụng hỗ trợ điều trị suy giảm chức năng sinh dục nam

Suy giảm chức năng sinh dục nam là tình trạng bệnh lý thường gặp với tỷ lệ cao và đang ngày càng gia tăng. Việc phát triển các phương pháp điều trị và dự phòng suy sinh dục nam, trong đó đặc biệt là các thuốc, là một trong những mối quan tâm đặc biệt của y học thế giới. Một trong những bước đầu tiên để nghiên cứu phát triển thuốc mới là cần xây dựng được các mô hình thực nghiệm để bước đầu đánh giá tính an toàn và hiệu quả trước khi khảo sát tác dụng trên các thử nghiệm lâm sàng. Các mô hình thực nghiệm thường được sử dụng hiện nay để đánh giá tác dụng của thuốc trên chức năng sinh dục đực bao gồm: mô hình gây suy giảm sinh sản, mô hình đánh giá hoạt tính androgen, mô hình nghiên cứu chức năng cương dương, và mô hình nghiên cứu hành vi tình dục.

#### 1.3.1. Mô hình đánh giá hoạt tính androgen trên thực nghiệm

Androgen là hormon sinh dục nam, có vai trò trong sự hình thành các đặc tính sinh dục nam, duy trì chức năng sinh sản, hoạt động sinh tinh và hành vi tình dục

của nam giới khi trưởng thành. Thử nghiệm xác định hoạt tính androgen được xem là một bước sàng lọc cần thiết để đánh giá ảnh hưởng của thuốc thử đến chức năng sinh sản nam.

Để thử hoạt tính androgen, các nhà nghiên cứu thường dựa vào sự nhạy cảm của các cơ quan sinh dục phụ loài gặm nhấm đực, hoặc các cấu trúc giới tính thứ cấp của chim và động vật có vú đối với androgen. Một số thử nghiệm sinh học xác định hoạt tính androgen của thuốc thử đã được áp dụng như đánh giá hoạt tính androgen trên mào gà (gà con 2-3 ngày tuổi, gà trống thiên), đánh giá hoạt tính androgen trên trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ của chuột cống đực (chuột non, chuột trưởng thành) [39]. Hiện nay các thử nghiệm Hershberger là những phương pháp được áp dụng rộng rãi để nghiên cứu hoạt tính androgen của thuốc thông qua sự biến đổi trọng lượng của các cơ quan sinh dục phụ của chuột cống đực non.

#### *1.3.1.1. Nghiên cứu hoạt tính androgen trên chuột cống đực non thiên*

Thử nghiệm Hershberger trên chuột cống đực non thiên đã được chuẩn hóa theo hướng dẫn OECD 441 của Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế. Đây là một phương pháp nhạy cảm giúp phát hiện được cả những hoạt chất có hoạt tính androgen hoặc kháng androgen yếu [40]. Chuột cống đực non 42-50 ngày tuổi bị cắt bỏ tinh hoàn 2 bên để loại trừ ảnh hưởng của androgen nội sinh, sau đó được sử dụng thuốc thử. Thuốc đối chứng được dùng để so sánh là testosterone propionat tiêm dưới da với liều 0,4 mg/kg/ngày. Thuốc nghiên cứu dùng ít nhất 2 liều. Hoạt tính androgen của thuốc nghiên cứu sẽ được đánh giá thông qua sự biến đổi trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ (bao gồm đầu dương vật, túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn-hành hang). Thuốc thử được xác định là có hoạt tính androgen nếu hợp chất đó có khả năng làm tăng có ý nghĩa thống kê trọng lượng của ít nhất hai cơ quan sinh dục phụ nói trên [40].

#### *1.3.1.2. Nghiên cứu hoạt tính androgen trên chuột cống đực non cai sữa*

Việc thực hiện quy trình thiên trên chuột cống đực non có liên quan đến những vấn đề trong đạo đức nghiên cứu trên động vật thực nghiệm, do vậy Hershberger đã đưa ra phương pháp nghiên cứu thay thế trên chuột cống đực non cai sữa không bị

thiến và phương pháp này đã được chuẩn hóa theo hướng dẫn OECD 115 của Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế [41]. Chuột cống đực non 20-34 ngày tuổi được cho dùng thuốc nghiên cứu. Thuốc đối chứng được sử dụng là testosterone propionat tiêm dưới da với liều 1,0 mg/kg/ngày. Thuốc nghiên cứu dùng ít nhất 2 liều. Sự biến đổi trọng lượng của ít nhất 2 cơ quan sinh dục phụ (mào tinh, túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn-hành hang) giúp xác định hoạt tính androgen của mẫu thử [41].

### **1.3.2. Mô hình nghiên cứu chức năng cương dương trên thực nghiệm**

Rối loạn cương dương là tình trạng suy giảm chức năng sinh dục gặp khá phổ biến và có xu hướng ngày càng tăng [42]. Việc xây dựng được các mô hình thực nghiệm để đánh giá ảnh hưởng của thuốc đến chức năng cương dương là một bước cần thiết để phát triển các thuốc điều trị rối loạn cương dương.

#### *1.3.2.1. Test cương trên động vật tinh*

Động vật thực nghiệm được sử dụng trong test cương trên động vật tinh thường là thỏ hoặc chuột cống.

##### Test cương trên thỏ

Thỏ đực trưởng thành được nuôi ít nhất 7 ngày trong điều kiện phòng thí nghiệm trước khi làm nghiên cứu, sau đó thỏ được dùng thuốc thử. Giữ thỏ nhẹ nhàng trong phòng yên tĩnh, hạn chế tối đa mọi kích thích. Đo chiều dài dương vật (đoạn dương vật được lộ ra, không bị che bởi bao quy đầu) tại các thời điểm 5, 10, 15, 30, 50, 60, 90, và 120 phút sau khi dùng thuốc và tiếp tục theo dõi mỗi giờ sau đó cho đến khi hết thời gian nghiên cứu [43],[44].

##### Test cương trên chuột cống

Các test cương được áp dụng trên chuột cống bao gồm test cương không tiếp xúc, test cương gây ra bởi hóa chất, và test cương phản xạ [45].

Trong *test cương không tiếp xúc*, một buồng quan sát được chia thành hai nửa bởi một rào chắn có đục lỗ. Con đực được đặt ở một bên của buồng quan sát và con cái trong chu kỳ động dục được đặt ở buồng phía đối diện. Hàng rào chắn có vai trò ngăn cản sự tiếp xúc trực tiếp giữa con đực và con cái ở hai bên, nhưng cho phép

chuột vẫn có thể tiếp nhận các kích thích thính giác, thị giác và khứu giác. Việc quan sát hành vi được thực hiện trong 30 phút. Sự cương dương được xác định khi dương vật lộ ra khỏi bao quy đầu, kèm theo hành động cúi đầu về phía vùng sinh dục và hông chuyển động [45]. Các chỉ số nghiên cứu được ghi nhận là tổng số lần cương dương và thời gian xuất hiện cương dương lần đầu tiên [45],[46]. Tần suất cương không tiếp xúc được xem như là một chỉ số của hưng phấn tình dục. Test này được sử dụng để xác định các thuốc là tác nhân thúc đẩy quá trình cương dương, nghĩa là các thuốc này không có tác dụng khởi động quá trình cương nhưng có tác dụng tăng cường khả năng cương khi có mặt của các kích thích [46].

Với *test cương gây ra bởi hóa chất*, chuột cống đực được dùng thuốc thử, hoạt động cương dương sẽ được theo dõi trong một buồng quan sát không có mặt của con cái. Test này được áp dụng để xác định những thuốc có khả năng khởi phát quá trình cương, ví dụ như apomorphin, melanotan II (MT-II) và PT-141 [46]. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng hiện tượng cương dương tự phát có thể xảy ra trên động vật thực nghiệm ngay cả với những tác động đơn giản như động tác giữ khi cho chuột uống thuốc, do đó cần phải có các biện pháp kiểm soát phù hợp với thời gian thử nghiệm [45],[46].

Để thực hiện *test cương phản xạ*, chuột cống đực được cố định trong một ống nhựa có đường kính 8 cm, dài 20 cm trong 5 phút để làm quen. Bộ lộ dương vật bằng cách co vỏ bao quy đầu và giữ bằng một vòng kim loại. Quan sát và ghi lại các đáp ứng phản xạ của dương vật, bao gồm các hiện tượng sung huyết quy đầu, cương gốc và đầu dương vật, mở đầu dương vật, và gập thân dương vật (quick/long flip). Thời gian quan sát kéo dài 15 phút kể từ khi có đáp ứng đầu tiên [45].

#### 1.3.2.2. Đo áp lực thể hang (*Intracavernous pressure – ICP*)

Các phương pháp đánh giá chức năng cương dương trên động vật tinh có nhược điểm là tính chính xác không cao do chịu ảnh hưởng nhiều bởi ngoại cảnh và chủ quan của người quan sát. Nhược điểm này có thể được khắc phục bằng cách đặt một catheter vào trong thể hang để đo áp lực thể hang của động vật thực nghiệm, và đây cũng là phương pháp đánh giá ảnh hưởng của thuốc thử đến chức năng cương

dương được áp dụng phổ biến hiện nay. Phương pháp này có thể được tiến hành trên động vật gây mê hoặc động vật tỉnh.

#### Đo ICP trên động vật gây mê

Phương pháp đo ICP này có thể được tiến hành trên chuột cống, chó, hoặc thỏ. Động vật thực nghiệm được gây mê để phẫu thuật bộc lộ thể hang và đặt catheter vào trong để đo ICP, đồng thời một catheter khác cũng được đặt vào động mạch cảnh để đo huyết áp động mạch trung bình (MAP). Các catheter này đều được nối với một bộ chuyển đổi áp lực và hệ thống thu thập dữ liệu. Bằng cách kích thích vào thể hang hoặc kích thích vào thần kinh trung ương sẽ tạo nên những thay đổi trong ICP và MAP. Các kích thích được sử dụng có thể là kích thích điện hoặc kích thích trực tiếp bằng hóa chất thử. Tại thể hang, có thể tiến hành đưa hóa chất vào trong thể hang hoặc sử dụng dòng điện kích thích vào dây thần kinh hang hoặc đám rối chậu. Tại thần kinh trung ương, vùng bị kích thích điện hoặc tiêm hóa chất có thể là nhân cận não thất của vùng dưới đồi hoặc khu vực tiền thị giữa [45],[46].

Các chỉ số nghiên cứu được xác định bao gồm MAP, ICP, tỷ lệ ICP/MAP và thời gian xiù dương vật là thời gian tính từ lúc ngừng kích thích điện cho đến thời điểm duy trì được ICP cố định. Ưu điểm của phương pháp này là có thể ghi lại đồng thời sự thay đổi huyết động tại dương vật và toàn thân, bên cạnh đó, những thay đổi nhỏ trong đáp ứng của dương vật cũng có thể được quan sát [45],[46]. Tuy nhiên, phương pháp này có nhược điểm là cần gây mê động vật, điều này có thể tác động đến đáp ứng sinh lý của dương vật và ảnh hưởng của các tác nhân dược lý đến hoạt động cương dương [45]. Vì vậy, thiết bị đo ICP từ xa đã được phát triển để ghi lại ICP và MAP trên động vật tỉnh.

#### Đo ICP trên động vật tỉnh

Trước khi dùng thuốc thử, chuột cống đực được gây mê và cấy bộ cảm biến theo dõi ICP từ xa vào trong thể hang. Sau thời gian nghỉ ngơi 7 ngày, tiến hành đo ICP mà không cần gây mê chuột trong các điều kiện hoạt động tự nhiên khi chuột tham gia một số test như test hành vi tình dục, test cương không tiếp xúc, test cương gây ra bởi hóa chất hay test cương phản xạ. Phương pháp này giảm thiểu tối đa những

tác động đến sinh lý cương dương và vai trò của thuốc thử trong đáp ứng cương, do vậy các số liệu được cung cấp sẽ mang tính xác thực và có giá trị cao hơn [45],[46].

#### *1.3.2.3. Đo dòng máu chảy qua dương vật*

Dùng siêu âm Doppler để đánh giá vi tuần hoàn dương vật nhằm xác định lưu lượng dòng máu chảy qua dương vật cùng với đặc tính mạch máu tại dương vật. Động vật được gây mê khi tiến hành siêu âm. Khi bắt đầu thử nghiệm, vỏ bao dương vật sẽ được co lại, và sau 10 phút thích nghi với nhiệt độ phòng thí nghiệm, đầu dò của máy siêu âm sẽ được đặt ở vị trí lưng của dương vật. Lưu lượng dòng chảy tại dương vật sẽ được ghi lại trong thời gian 10 phút [47],[48]. Có thể sử dụng kết hợp phương pháp này với đo ICP bằng cách kích thích điện vào dây thần kinh hang, thuốc thử có tác dụng tăng cường chức năng cương dương khi làm tăng tốc độ dòng chảy trước và sau khi kích thích, và làm giảm tốc độ dòng chảy trong thời gian kích thích [49].

#### *1.3.2.4. Nghiên cứu trên cơ trơn thể hang cô lập*

Nghiên cứu này được thực hiện để tìm hiểu cơ chế tác dụng của thuốc trên cơ trơn thể hang. Động vật thường được sử dụng là thỏ hoặc chuột cống. Cô lập dải thể hang và đặt trong bình nuôi cơ quan cô lập có chứa các dung dịch nuôi thích hợp, có thể là dung dịch Krebs [50], dung dịch Krebs–Henseleit [51], hoặc dung dịch Krebs-bicarbonat [52], và được sục bằng hỗn hợp khí 95% O<sub>2</sub> và 5% CO<sub>2</sub>. Các hoạt động co, giãn của cơ trơn thể hang được ghi lại dưới tác dụng của các hóa chất thử. Thuốc làm giãn cơ trơn thể hang thường liên quan đến tác dụng làm tăng giải phóng NO từ nội mô mạch máu hoặc do ức chế enzym phosphodiesterase.

### **1.3.3. Mô hình nghiên cứu hành vi tình dục trên thực nghiệm**

#### *1.3.3.1. Test hành vi tình dục (Mating behavior test)*

Chuột cống đực và chuột cống cái đã cắt buồng trứng được nuôi trong điều kiện nhiệt độ, độ ẩm thích hợp với chu kỳ sáng-tối đảo ngược [53]. Chuột cống cái được gây động dục nhân tạo bằng cách cho uống ethinyl oestradiol 100 µg/chuột và tiêm dưới da progesteron 1 mg/chuột tại các thời điểm 48 giờ và 6 giờ trước khi tham gia test; hoặc tiêm dưới da estradiol benzoat 10 µg/100 g và progesteron 0,5

mg/100 g, 48 giờ và 4 giờ trước khi tham gia test, tương ứng [47]. Chuột cống đực được làm quen với hành vi tình dục trong các đợt huấn luyện tiến hành vào pha tối, mỗi đợt cách nhau 5 ngày, nhằm mục đích khởi động phản xạ giao cấu, phát huy tối đa vai trò của hệ thần kinh và nội tiết đối với hành vi tình dục của chuột, đồng thời giúp nghiên cứu viên làm quen với việc quan sát hành vi tình dục ở chuột. Trong 3 đợt huấn luyện cuối, chỉ những chuột có hoạt động tình dục kém, tức là không đạt được xuất tinh trong bất kỳ một đợt huấn luyện cuối nào, mới được đưa vào thí nghiệm chính thức [54]. Trong thí nghiệm chính thức, sau khi được dùng thuốc thử, các hành vi tình dục của chuột đực được quan sát bao gồm: hành vi nhảy (mounting), thâm nhập âm đạo (intromission), và xuất tinh (ejaculation), từ đó xác định các chỉ số thời gian nhảy (Mount latency – ML), tần suất nhảy (Mount frequency – MF), thời gian đạt đến thâm nhập (Intromission latency – IL), tần suất thâm nhập (Intromission frequency – IF), thời gian đạt đến xuất tinh (Ejaculation latency – EL), thời gian nhảy lại sau xuất tinh (Post-ejaculatory interval – PEI). Thử nghiệm sẽ kết thúc nếu ML/IL/PEI kéo dài trên 15 phút, hoặc giá trị EL lớn hơn 30 phút, hoặc ghi được PEI [47]. Tiến hành so sánh các chỉ số giữa các lô để đánh giá ảnh hưởng của thuốc đến hành vi tình dục của động vật thực nghiệm.

#### *1.3.3.2. Test ham muốn tình dục (Test for libido)*

Test ham muốn tình dục được tiến hành nhằm mục đích đánh giá ảnh hưởng của thuốc đến ham muốn tình dục nội tại, tức là những ham muốn không phát sinh do cơ quan sinh dục bị kích thích.

Lựa chọn và huấn luyện động vật thực nghiệm được thực hiện tương tự như trong test hành vi tình dục. Thử nghiệm sẽ được tiến hành vào ngày cuối của đợt điều trị. Co vỏ bao quy đầu để bộc lộ dương vật của chuột cống đực, gây tê đầu dương vật bằng cách bôi mỡ xylocain 5% vào thời điểm 30, 15 và 5 phút trước khi tiếp xúc với chuột cái đã được gây động dục nhân tạo. Ghi lại và so sánh các chỉ số quan sát (ML, MF) giữa các lô nghiên cứu [45].

#### *1.3.3.3. Test hấp dẫn tình dục (Determination of hesitation time & attraction towards female)*



Thử nghiệm này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của thuốc đến sự hấp dẫn tình dục (sexual attraction). Buồng quan sát được phân cách thành hai nửa bằng một hàng rào gỗ 15 cm. Chuột cống đực và chuột cống cái trưởng thành được đặt ở hai bên của buồng quan sát này. Nghiên cứu viên sẽ theo dõi hoạt động vượt qua hàng rào của chuột cống đực để ghi lại thời gian do dự (hesitation time) là thời gian tính từ lúc bắt đầu thả chuột vào buồng quan sát đến khi chuột bắt đầu cố gắng trèo qua hàng rào, và điểm số đánh giá khả năng con đực bị hấp dẫn tình dục bởi con cái trong 15 phút với thang điểm từ 0-5. Thí nghiệm sẽ được tiến hành vào các ngày 0, 7, 14, 21, và 28 của đợt điều trị [45].

#### **1.3.4. Mô hình gây suy giảm sinh sản trên thực nghiệm**

Các phương pháp được sử dụng hiện nay để gây suy giảm sinh sản trên động vật thực nghiệm bao gồm: suy giảm sinh sản do tuổi, suy giảm sinh sản do stress, suy giảm sinh sản do nhiệt độ, suy giảm sinh sản do tia xạ, suy giảm sinh sản do thuốc/hóa chất, và suy giảm sinh sản do đột biến.

##### **1.3.4.1. Suy giảm sinh sản do tuổi**

Các loài động vật già thường được sử dụng trong mô hình này là chuột cống đực *Norway* 25 tháng tuổi, chuột cống đực *Sprague-Dawley* 9-10 tháng tuổi, chuột nhắt đực 22-26 tháng tuổi, thỏ 20 tháng tuổi [45]. Tình trạng suy giảm sinh sản của các loài động vật này bao gồm giảm nồng độ testosterone trong huyết thanh, rối loạn chức năng nội mạc mạch, tăng sự hình thành ROS cùng với rối loạn cương dương [103]. Dựa trên các đặc điểm bệnh lý này, tác dụng cải thiện chức năng sinh sản của thuốc có thể được đánh giá thông qua test hành vi tình dục, test cương dương, hoặc thông qua sự cải thiện một số chỉ số liên quan đến hoạt động sinh sản như nồng độ hormon sinh dục, số lượng và chất lượng tinh trùng, v.v....

##### **1.3.4.2. Suy giảm sinh sản do stress**

Stress được xem là một trong những tác nhân quan trọng gây rối loạn chức năng tình dục và vô sinh. Các biểu hiện rối loạn chức năng tình dục do stress ở nam giới có thể là rối loạn cương dương, rối loạn xuất tinh, mất ham muốn và giảm tần suất giao hợp, và giảm khả năng sản sinh tinh trùng, với cơ chế tác dụng có liên

quan một phần đến sự ức chế trực vùng dưới đồi-tuyến yên-tuyến sinh dục [55]. Các nghiên cứu trên động vật thực nghiệm cũng cho thấy, các stress kéo dài có thể ức chế sự bài tiết testosterone, động lực tinh dục, sự trưởng thành của tinh hoàn và quá trình sinh tinh. Có thể gây stress trong nhiều ngày bằng cách nhốt chuột cống đực trong một ống nhựa trong suốt (dài 20 cm, đường kính 7 cm) có đục lỗ 12 tiếng/ngày [56], hoặc sử dụng một hàng rào lưới dây thép để ngăn cản chuột cống đực tiếp xúc với “cộng đồng” chuột đực và chuột cái xung quanh [57]. Thuốc thử được sử dụng đồng thời trong thời gian gây stress, tác dụng cải thiện chức năng sinh sản có thể được đánh giá thông qua một số test như test hành vi tinh dục, test cương dương, định lượng các hormon sinh dục, sự thay đổi trong hình ảnh mô bệnh học tinh hoàn, v.v....

#### ***1.3.4.3. Suy giảm sinh sản do nhiệt độ***

Nhiệt độ cao là một trong những nguyên nhân có thể gây tổn thương tinh hoàn dẫn đến vô sinh ở nam giới và hầu hết động vật có vú. Quá trình sinh tinh có thể diễn ra bình thường là nhờ nhiệt độ của bìu, nơi chứa tinh hoàn, luôn được duy trì thấp hơn nhiệt độ cơ thể  $4-5^{\circ}\text{C}$  [58]. Khi tinh hoàn tiếp xúc với nhiệt độ bằng hoặc lớn hơn nhiệt độ cơ thể có thể dẫn đến ức chế sự sản xuất tinh trùng và gây ra vô sinh tạm thời hoặc vĩnh viễn. Một số mô hình trên động vật gặm nhấm đã được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến tinh hoàn như cho tinh hoàn tiếp xúc với nhiệt độ cao trong thời gian ngắn (thường là trên  $40^{\circ}\text{C}$  với thời gian 15 phút/ngày) [59], nuôi động vật thực nghiệm trong môi trường nhiệt độ cao (ví dụ  $35-36^{\circ}\text{C}$ ) trong nhiều giờ [60], hoặc phẫu thuật gây tinh hoàn lạc chỗ để tinh hoàn tiếp xúc trong thời gian dài với nhiệt độ trung tâm của cơ thể ( $37^{\circ}\text{C}$ ) [61].

#### ***1.3.4.4. Suy giảm sinh sản do tia xạ***

Nhiều báo cáo gần đây đã chỉ ra các tác động bất lợi của bức xạ ion hóa lên chức năng sinh sản. Tinh hoàn là cơ quan rất nhạy cảm với các stress oxy hóa do tia xạ gây ra vì các tế bào dòng tinh liên tục thực hiện quá trình nguyên phân hoặc giảm phân. Chuột đực trưởng thành được chiếu xạ (tia gamma) với các suất liều khác nhau tùy nghiên cứu để gây suy giảm sinh sản, trên cơ sở đó đánh giá hiệu quả

của thuốc thử thông qua một số chỉ số về số lượng và chất lượng tinh trùng, hình thái tinh hoàn, nồng độ testosterone máu [62].

#### **1.3.4.5. Suy giảm sinh sản do thuốc/hóa chất**

Một số loại thuốc/hóa chất được sử dụng để gây ra tình trạng rối loạn hormon, giảm ham muốn, rối loạn cương dương, ức chế xuất tinh, từ đó dẫn đến rối loạn sinh sản. Các loài động vật gặm nhấm giống đực trưởng thành thường được sử dụng để gây suy giảm sinh sản theo mô hình này. Thuốc thử có thể được nghiên cứu tác dụng bảo vệ hoặc phục hồi chức năng sinh sản của động vật nghiên cứu dựa trên các chỉ số đánh giá về cấu trúc và chức năng của các cơ quan sinh dục. Một số thuốc/hóa chất đã được sử dụng để gây suy giảm sinh sản gồm:

- Amitriptylin uống 10 mg/kg/ngày trong 56 ngày (8 tuần) [63]
- Paroxetin uống 10 mg/kg/ngày trong 3 tuần [64]
- Natri valproat uống 500 mg/kg/ngày trong 7 tuần [65]
- Ethanol uống 4 g/kg/ngày trong 90 ngày [66]
- Cyclophosphamid tiêm màng bụng 100 mg/kg một lần duy nhất [67], hoặc tiêm màng bụng cách ngày 50 mg/kg/ngày trong 14 ngày [68]

#### **1.3.4.6. Suy giảm sinh sản do đột biến**

Những mô hình suy giảm sinh sản do đột biến di truyền đã và đang được phát triển nhờ ưu điểm giúp các nhà nghiên cứu có thể đánh giá cụ thể và chính xác hơn cơ chế tác dụng của thuốc thử liên quan đến chức năng sinh sản ở nam giới. Một số đột biến di truyền gây suy giảm sinh sản trên động vật thực nghiệm đã được sử dụng gồm:

- Đột biến gen GnRH (đồng hợp alen đột biến Gnrh1) (Hypogonadal [hpg] mouse) [69].
- Đột biến mất androgen receptor (Androgen receptor knockout [ARKO] mice) [70].
- Đột biến chuyển đoạn gen (transgenic mice) [71].
- Đột biến điểm do hóa chất (sử dụng chất gây đột biến *N*-ethyl-*N*-nitrosourea [ENU]) [71].

## 1.4. Tổng quan về viên hoàn cứng TD0014

### 1.4.1. Thành phần

Bạch tật lê	4,00g	Dây đau xương	0,29g	Tỏi khô	0,20g
Cúc hoa	1,83g	Mộc qua	0,29g	Kỷ tử	0,17g
Hoa đào	1,14g	Lạc tiên	0,29g	Cam thảo	0,14g
Đỗ đen	1,14g	Đại táo	0,29g	Nhân sâm	0,11g
Bá bệnh	0,69g	Thục địa	0,23g	Xuyên khung	0,11g
Hoa hòe	0,57g	Đương quy	0,23g	Nhục thung dung	0,11g
Hoài sơn	0,43g	Trạch tả	0,23g	Bạch truật	0,11g
Tỳ giải	0,40g	Ngưu tất	0,23g	Đảng sâm	0,11g
Hà thủ ô đỏ	0,40g	Ngũ vị tử	0,23g	Thỏ ty tử	0,11g
Trần bì	0,34g	Ba kích	0,23g	Phá cố chỉ	0,06g
Rễ đinh lăng	0,34g	Kim anh tử	0,23g	Nhung hươu	7,2mg

### 1.4.2. Tác dụng

Sức khỏe và khả năng tình dục có mối quan hệ chặt chẽ với nhau. Hải Thượng Lãn Ông bàn về chứng liệt dương như sau: Dương sự khỏe hay yếu do chân hỏa thịnh hay suy, vì hỏa tác dụng nhưng căn bản là do tinh sự. Bổ đều ngũ tạng khiến tinh của năm tạng chuyển về thận (thận tàng tinh), uống lâu và liên tục khiến thời tinh huyết của các tạng này thêm nhiều và chuyển về thận, không cần làm cho cường dương mà dương vẫn tự cường. Bổ vị thì ăn uống tăng tiến, tinh 3 ngày sản sinh không ngớt mới có thể chuyển vận về thận. Vị mạnh thì thận khỏe và tinh khí dồi dào, vị hư thì tinh bị thương tổn mà dương sự cũng bị suy kém. Như vậy cùng với tuổi tác và sinh hoạt, các tạng phủ trong cơ thể suy yếu dần đi có thể gây ra tâm âm hư, tâm dương hư, thận âm hư, thận dương hư, can thận âm hư, tâm thận bất giao, tâm đờm khí hư, tỳ vị hư tổn nên chức năng sinh dục giảm sút.

Các dược liệu thành phần trong viên hoàn cứng TD0014 vừa phục hồi sinh lực cho ngũ tạng (tâm, can, tỳ, phế, thận) vừa đại bổ khí huyết giúp cho toàn thân được cường tráng, tuần bổ thận dương, nhờ vậy không cần dùng chất kích thích mà cơ thể tự nhiên hứng thú và mạnh mẽ, hoạt động tình dục được cải thiện.

### 1.4.3. Giới thiệu các dược liệu thành phần trong viên hoàn cứng TD0014

(xem Phụ lục 1)

### 1.4.4. Một số nghiên cứu về tác dụng trên sinh sản của một số dược liệu thành phần trong viên hoàn cứng TD0014

**Bạch tật lê** (*Tribulus terrestris* L.) là một dược liệu được dùng phổ biến trong nền y học cổ truyền của một số nước như Ấn Độ, Trung Quốc và Việt Nam để điều trị khá nhiều bệnh. Các bộ phận khác nhau của cây có các thành phần hóa học có các tác dụng sinh học quan trọng như flavonoid, các flavonol glycosid, saponin steroid, và alkaloid. Kích thích tinh dục là một trong những tác dụng sinh học của bạch tật lê được nghiên cứu khá nhiều. Adaikan và cộng sự (2000) đã nhận thấy bạch tật lê có thể có tác dụng tiền cương dương trên cơ trơn thể hang của thỏ. Thỏ được uống chiết xuất bạch tật lê ở các liều 2,5; 5 và 10 mg/kg trong 8 tuần, sau đó sẽ tiến hành đánh giá đáp ứng của dương vật thỏ cô lập với các chất gây co và giãn cơ. Kết quả nghiên cứu cho thấy, đáp ứng giãn cơ của dương vật thỏ với acetylcholin, nitroglycerin và kích thích điện tăng thêm 10%, 24% và 10% so với nhóm chứng. Tác dụng này của bạch tật lê có thể do khả năng làm tăng giải phóng nitric oxid từ các tế bào nội mô và tận cùng thần kinh nitrergic [72]. Singh và cộng sự (2012) đánh giá tác dụng tăng cường chức năng tình dục của dịch chiết nước đông khô từ quả sấy khô của cây bạch tật lê ở các liều 50 và 100 mg/kg trên chuột cống đực bị rối loạn chức năng tình dục. Chuột được uống thuốc thử một lần hoặc uống liên tục trong 13 ngày. Sự cải thiện các hành vi tình dục đã được quan sát thấy ở các lô chuột uống thuốc thử, thể hiện ở sự gia tăng số lần tiếp cận, số lần thâm nhập âm đạo và chỉ số cương dương, đồng thời làm giảm thời gian đạt đến tiếp cận, thời gian đạt đến thâm nhập và thời gian đạt đến xuất tinh của chuột cống đực. Tác dụng này phụ thuộc liều và thể hiện rõ rệt hơn ở các lô uống dịch chiết bạch tật lê liên tục trong 13 ngày. Nồng độ testosterone huyết thanh cũng tăng cao rõ rệt ở các lô uống thuốc thử nhiều ngày [54]. Một nghiên cứu khác của Rajendar và cộng sự (2011) còn cho thấy dịch chiết ethanol của cây bạch tật lê thể hiện tác dụng bảo vệ tinh hoàn trên mô hình gây tổn thương tinh hoàn bằng cadmium. Tác dụng bảo vệ

này có thể do bạch tật lê có khả năng ức chế quá trình peroxy hóa trong mô tinh hoàn do tác dụng chống oxy hóa và tác dụng tạo chelat với kim loại, hoặc gián tiếp có thể do khả năng kích thích sản xuất testosterone từ các tế bào Leydig [73]. Protodioscin và protogracillin, hai saponin chính của bạch tật lê, đóng vai trò chính trong tác dụng kích thích tinh dục. Protodioscin làm tăng chuyển testosterone thành chất có hoạt tính mạnh dihydrotestosterone không chỉ giúp làm tăng ham muốn tinh dục, mà còn làm tăng sản xuất hồng cầu tại tủy xương cùng với sự phát triển của các khối cơ trong cơ thể, góp phần nâng cao thể trạng và tăng cường sức khỏe [72].

Cây **bá bệnh** (*Eurycoma longifolia* Jack), một loại thảo dược phổ biến, có nguồn gốc từ Indonesia, Malaysia, Việt Nam, cũng như ở Campuchia, Myanmar, Lào và Thái Lan. Cây bá bệnh là một trong những dược liệu được biết đến rất nhiều với tác dụng kích thích tinh dục. Rất nhiều nghiên cứu thực nghiệm và lâm sàng trên thế giới đã được thực hiện để đánh giá tác dụng và tìm hiểu cơ chế tác dụng kích thích tinh dục của dược liệu này. Vô sinh là một vấn đề đang được chú ý rất nhiều trong y học. Khoảng 40-50% ca vô sinh được cho là có liên quan đến các yếu tố từ phía nam giới, chủ yếu liên quan đến giảm sản xuất tinh trùng và sản xuất tinh trùng bất thường. Các chiết xuất tan trong nước của bá bệnh đã được báo cáo là có khả năng tăng cường chức năng sinh sản ở nam giới (làm tăng thể tích tinh dịch, tăng số lượng và khả năng di động của tinh trùng) trên các nghiên cứu thực nghiệm ở các loài gặm nhấm và trên các thử nghiệm lâm sàng trên người [74]. Một số cơ chế đã được đưa ra để giải thích cho tác dụng này của bá bệnh. Nghiên cứu của Pramoto H (2017) cho thấy, dịch chiết từ rễ bá bệnh có khả năng ảnh hưởng đến hoạt động của vùng dưới đồi-tuyến yên, cụ thể hơn là làm tăng số lượng và hoạt động của các tế bào ura bazơ chịu trách nhiệm sản xuất LH ở thùy trước của tuyến yên, từ đó kích thích các tế bào Leydig tăng sản xuất androgen, dehydroepiandrosteron và testosterone, kích thích sản sinh tinh trùng tại tinh hoàn [75]. Theo Low và cộng sự (2013), thành phần quassinoid của cây bá bệnh được xác định là các hợp chất ảnh hưởng đến hoạt động của trục vùng dưới đồi-tuyến yên-tuyến sinh dục và kích thích sản sinh tinh trùng [74]. Tiếp tục nghiên cứu, Low

nhận thấy, eurycomanon, các quassinoid chính trong dịch chiết từ rễ của cây bá bệnh, còn có tác dụng kích thích sản xuất testosterone tại các tế bào Leydig của tinh hoàn chuột cống bằng cách ức chế aromatase chuyển testosterone thành estrogen, và cũng có thể liên quan đến ức chế phosphodiesterase. Đây là một tác dụng phụ thuộc liều [76]. Trong nghiên cứu *ex vivo* trên cơ trơn thể hang cô lập của chuột cống, phân đoạn dichloromethane từ dịch chiết ethanol của rễ bá bệnh còn thể hiện tác dụng đối kháng với sự co cơ trơn thể hang do angiotensin II thông qua ức chế angiotensin II type 1 receptor và tăng cường tác dụng giãn cơ của bradykinin nhờ ức chế enzym chuyển angiotensin [52]. Trên thử nghiệm lâm sàng, một nghiên cứu ngẫu nhiên, mù đôi, có đối chứng placebo nhằm đưa ra các bằng chứng lâm sàng về khả năng kích thích tình dục của bá bệnh đã được tiến hành trên 109 nam giới có độ tuổi từ 30-55 tuổi. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nam giới ở nhóm được uống dịch chiết nước cây bá bệnh liên tục 12 tuần với liều 300 mg/ngày đã tăng ham muốn tình dục 14%, phân tích tinh dịch cho thấy thể tích tinh dịch tăng 18,2% và khả năng di động của tinh trùng tăng 44,4% so với nhóm nam giới uống placebo [77]. Các nghiên cứu về tác dụng kích thích tình dục kể trên của bá bệnh chủ yếu là về loài bá bệnh ở Malaysia. Tại Việt Nam, Dương Thị Ly Hương (2012) đã tiến hành nghiên cứu đánh giá tác dụng lên chức năng sinh sản của rễ bá bệnh thu hái tại Việt Nam trên động vật thực nghiệm. Kết quả nghiên cứu cũng đã cho thấy, rễ bá bệnh thu hái tại Việt Nam cũng thể hiện hoạt tính androgen rõ, làm tăng đáng kể nồng độ testosterone máu, làm tăng ham muốn tình dục, tăng hiệu quả giao cấu và tăng sức mạnh tình dục trên những chuột có khả năng hoạt động tình dục kém. Khi đánh giá tác dụng của bá bệnh Việt Nam trên mô hình gây suy sinh dục bằng natri valproat, kết quả thu được là rễ bá bệnh đã cải thiện được số lượng và độ di động của tinh trùng, cải thiện được tỷ lệ tinh trùng có hình thái bất thường ở đầu, cổ, đuôi, đồng thời làm tăng được số lượng ống sinh tinh cũng như các tế bào dòng tinh [78]. Một nghiên cứu khác của Trần Mỹ Tiên và cộng sự (2012) được thực hiện nhằm khảo sát tác dụng hướng sinh dục nam của cao chiết cồn 45% từ rễ bá bệnh thu hái tại Đồng Nai trên hai mô hình chuột nhất bình thường và chuột nhất bị gây giảm năng

sinh dục (chuột đực bị cắt hai tinh hoàn). Các kết quả nghiên cứu cũng đã cho thấy tác dụng kiểu androgen của cao rễ bá bệnh trên chuột đực giảm năng sinh dục và chuột đực bình thường, trong đó liều cao có tác dụng rõ nét hơn trong việc làm tăng nồng độ testosterone trong huyết thanh, tăng trọng lượng túi tinh và tuyến tiền liệt, và tăng nồng độ protein toàn phần trong huyết tương [79].

Rễ cây *ba kích* (*Morinda officinalis* How.) là một dược liệu được sử dụng phổ biến trong YHCT để điều trị rối loạn tình dục cũng như hỗ trợ duy trì chức năng sinh sản ở nam giới. Ba kích được chứng minh là có khả năng làm tăng cường số lượng và mật độ tinh trùng. Bằng cách sử dụng vi sóng để gây suy giảm hoạt động của trục vùng dưới đồi – tuyến yên – tinh hoàn trên chuột cống đực, Song B và cộng sự (2015) đã chỉ ra rằng dịch chiết nước của ba kích liều 40 g/kg uống liên tục trong 2 tuần có tác dụng cải thiện rõ rệt hành vi tình dục, làm tăng nồng độ testosterone trong huyết thanh, giảm nồng độ LH và GnRH, đồng thời làm tăng đáng kể số lượng tinh trùng ở trong tinh hoàn và mào tinh [80]. Trong một nghiên cứu khác của Zhu Z và cộng sự (2017), ảnh hưởng của dịch chiết giàu polysaccharid của ba kích đến sự bài tiết GnRH đã được đánh giá trên chuột cống bị gây giãn tĩnh mạch thừng tinh, một trong những nguyên nhân chủ yếu gây vô sinh nam. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các thành phần polysaccharid trong ba kích có hiệu quả làm tăng sự bài tiết GnRH tại vùng dưới đồi, có thể liên quan đến cơ chế điều hòa tăng hoạt động của con đường Kiss1/GPR54, từ đó làm tăng nồng độ các gonadotropin và testosterone trong huyết thanh, giúp cải thiện cả số lượng và chất lượng của tinh trùng chuột bị suy sinh dục do giãn tĩnh mạch thừng tinh [81]. Tại Việt Nam, Trần Mỹ Tiên và cộng sự (2012) đã tiến hành nghiên cứu tác dụng kiểu androgen của cao chiết còn 45% của rễ ba kích trên chuột nhắt trắng giảm năng sinh dục (chuột nhắt trắng đực bị cắt 2 tinh hoàn) và chuột nhắt trắng bình thường. Các số liệu thu được trên hai nhóm động vật nghiên cứu đều cho thấy, ba kích có tác dụng kiểu androgen trên cả chuột đực bình thường và chuột đực giảm năng sinh dục, thể hiện thông qua khả năng làm tăng nồng độ testosterone trong huyết thanh, tăng trọng lượng của cơ quan sinh dục đực (túi tinh, tuyến tiền liệt), cơ nâng hậu



môn, và tăng hàm lượng protein trong huyết tương [82]. Nghiên cứu trước đó của Nguyễn Mạnh Quân và cộng sự (2008) cũng đã cho thấy hoạt tính androgen của ba kích liều 20 g/kg trên cả chuột cống đực non (thiên và không thiên) và chuột cống đực trưởng thành [83].

**Nhân sâm** được coi là một trong những dược liệu quý giá của các nền YHCT trên thế giới. Theo YHCT, nhân sâm có thể được sử dụng đơn độc hoặc phối hợp với các dược liệu khác để tăng cường hoạt động tinh dục [84]. Các nghiên cứu trên động vật gặm nhấm cho thấy, nhân sâm Châu Á (*Panax ginseng*) có thể thúc đẩy hoạt động giao phối. Dùng nhân sâm hàng ngày (25-100 mg/kg) hoặc ginsenoside Rg1 (2,5-10 mg/kg) cho thấy một sự gia tăng phụ thuộc liều hành vi tiếp cận, thâm nhập, và liếm dương vật ở những con chuột nhắt đực được tiếp xúc với những con cái động dục [84]. Nồng độ testosterone có liên quan chặt chẽ với các ham muốn tình dục, do vậy, testosterone là một trong những thuốc chính của những bệnh nhân nam giới bị giảm ham muốn tình dục. Nghiên cứu trên chuột cống có chế độ ăn có 5% nhân sâm Châu Á (*Panax ginseng*) trong 60 ngày đã cho thấy có sự tăng đáng kể nồng độ testosterone trong máu [84]. Ginsenoside Rg1 (10 mg/kg), hoạt chất chính trong nhân sâm Châu Á (*Panax ginseng*), được cho là đóng vai trò chính trong sự gia tăng của nồng độ testosterone huyết thanh và cải thiện hành vi giao phối [84]. Trong một nghiên cứu lâm sàng trên 66 bệnh nhân, việc sử dụng các chiết xuất của nhân sâm Châu Á (*Panax ginseng*) làm tăng rõ rệt nồng độ toàn phần và tự do trong huyết tương của testosterone, FSH và LH [84]. Nhiều nghiên cứu còn cho thấy nhân sâm có khả năng kích thích sản sinh tinh trùng, làm tăng cả số lượng và sự di động của tinh trùng [84],[85].

Trong YHCT, **nhục thung dung** (*Cistanche deserticola* Y.C.Ma) thường được chỉ định điều trị trong các bệnh lý thận mạn tính, liệt dương, vô sinh nữ, băng huyết, táo bón do tuổi già [86],[87]. Nghiên cứu trên chuột cống đực non 40 – 45 ngày tuổi và chuột cống đực trưởng thành bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat, Trần Thanh Tùng (2009) đã nhận thấy hoạt tính androgen của nhục thung dung trên động vật non, đồng thời đã quan sát được tác dụng cải thiện chức năng tinh hoàn và khả

năng sinh sản trên động vật trưởng thành bị suy giảm sinh sản [88]. Tác dụng phục hồi chức năng cơ quan sinh sản của chuột nhắt đực sau khi sử dụng dịch chiết nhục thung dung cũng đã được quan sát thấy trên mô hình gây độc tính sinh sản bằng các thành phần hydroxyurea và glycoside có mặt trong cây Lôi công đằng (*Radix et Rhizoma Tripterygii*) [89],[90]. Đi sâu tìm hiểu cơ chế tác dụng của nhục thung dung, một nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng, dịch chiết ethanol của nhục thung dung có thể làm tăng nồng độ các hormon sinh dục bằng cách cảm ứng các enzym tổng hợp steroid tại tinh hoàn (ví dụ, CYP11A1, CYP17A1) [91]. Bên cạnh đó, sự biểu hiện gen của 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (enzym chịu trách nhiệm tổng hợp testosterone), 5 $\alpha$ -reductase-2 và aldo-keto reductase (những enzym chịu trách nhiệm tổng hợp dihydrotestosteron) cũng có thể được cảm ứng bởi dịch chiết của nhục thung dung [87]. Thành phần acteosid của nhục thung dung giúp rút ngắn đáng kể thời gian tiềm tàng của cương dương, tăng số lượng tế bào mầm, và cải thiện các biến đổi bệnh lý ở tinh hoàn [87]. Echinacosid, một thành phần khác có mặt rất nhiều trong nhục thung dung, có thể ảnh hưởng đến con đường truyền tín hiệu NO-cGMP, và dẫn tới sự gia tăng nồng độ cGMP trong cơ trơn thể hang. Đây có thể là một cơ chế kích thích tình dục của nhục thung dung [87].

**Kỷ tử** (*Lycium sinense*) là một dược liệu được sử dụng để điều trị vô sinh ở nam giới. Hiện nay vẫn còn khá ít nghiên cứu đánh giá tác dụng trên sinh sản của kỷ tử. Các polysaccharid là các thành phần hóa học quan trọng nhất của kỷ tử. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các polysaccharid trong kỷ tử có tác dụng ức chế các tổn thương cấu trúc của biểu mô ống sinh tinh do thời gian và sự tăng nhiệt (time- and hyperthermia-induced structural damage) và cũng làm chậm quá trình apoptosis của hệ thống biểu mô này [92],[93]. Quá trình oxy hóa được cho là nguyên nhân chính gây nên thoái hóa và apoptosis cấu trúc trong các tinh hoàn bị tăng nhiệt. Các polysaccharid trong kỷ tử có tác dụng chống lại sự thoái hóa của tinh hoàn nhờ tác dụng chống oxy hóa. Kỷ tử có thể bảo vệ tinh hoàn trước các nguy cơ có thể gây tổn thương tinh hoàn như nhiệt độ, hóa chất (hydrogen peroxid), tia xạ [92],[94],[95]. Các polysaccharid trong kỷ tử còn được chứng minh là có tác dụng làm tăng trọng

lượng tinh hoàn và mào tinh, cải thiện hoạt động của SOD, tăng nồng độ hormon sinh dục trong các tinh hoàn chuột cống bị tổn thương. Bên cạnh đó, các polysaccharid có tác dụng cải thiện chức năng sinh sản ở chuột cống đực thiếu bán phần, tăng nồng độ hormon sinh dục, tăng trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ, và cải thiện số lượng và chất lượng tinh trùng [94].

**Thỏ ty tử** (*Cuscuta sinensis*) là một thuốc bổ thận trong YHCT. Thận được coi là liên quan chặt chẽ đến chức năng sinh sản. Những ảnh hưởng đến sinh sản và nội tiết của các thuốc bổ thận, bao gồm cả thỏ ty tử, đã được nghiên cứu khá nhiều trên người và động vật. Thành phần chủ yếu của thỏ ty tử là các flavonoid [96]. Trong nghiên cứu của Qin và cộng sự (2000) đánh giá tác dụng của flavonoid trong thỏ ty tử trên sinh sản và nội tiết, các flavonoid đã làm tăng được trọng lượng tinh hoàn, mào tinh, tuyến yên và kích thích bài tiết testosterone và LH trên cả *in vitro* và trên động vật thực nghiệm là chuột cống đực 50-60 ngày tuổi [97]. Thỏ ty tử còn thể hiện khả năng phục hồi nồng độ testosterone trên chuột nhắt bị tiêm màng bụng hydrocortison gây suy thận dương, đồng thời làm tăng rõ rệt sự biểu hiện của AR mRNA và protein tại thận và tinh hoàn của động vật nghiên cứu [98]. Tại Việt Nam, nghiên cứu về tác dụng của thỏ ty tử trên chức năng sinh sản của chuột cống đực non thiếu và không thiếu, các tác giả đã đưa ra kết luận về hoạt tính androgen của dược liệu này với khả năng làm tăng trọng lượng của các cơ quan sinh dục phụ trên các động vật non [99].

**Phá cố chỉ** (*Psoralea corylifolia*) cũng là một dược liệu được sử dụng theo YHCT để trị một số vấn đề liên quan đến suy sinh dục nam như thận hư, di tinh, liệt dương [100]. Tương tự kỷ tử, hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá tác dụng trên chức năng sinh sản của phá cố chỉ. Trong một nghiên cứu của Dabhadkar và cộng sự (2013), các dịch chiết nước, dịch chiết alcohol và dịch chiết chloroform của phá cố chỉ đều làm tăng nồng độ testosterone trong huyết thanh của chuột cống đực, đồng thời thể hiện được những tác dụng tích cực đối với hành vi tình dục của động vật nghiên cứu, cụ thể là làm tăng tần suất nhảy và tần suất thâm nhập, kéo dài thời gian đạt đến xuất tinh, đồng thời giảm thời gian nhảy, thời gian đạt đến thâm nhập

và thời gian nhảy lại sau xuất tinh; các test về ham muốn và đánh giá chức năng cương dương cũng đều cho thấy rõ tác dụng kích thích các hoạt động tình dục của phá cố chỉ [101].

Theo các kết quả nghiên cứu dược lý hiện đại, **đương qui** (*Angelica sinensis*) và **xuyên khung** (*Ligusticum wallichii*) cũng thể hiện những tác dụng đóng vai trò hỗ trợ tăng cường chức năng sinh dục ở nam giới. Nghiên cứu ảnh hưởng của đương qui đến hoạt tính của enzym NOS tại dương vật của chuột cống bị gây tổn thương dây thần kinh hang hai bên bằng cách kẹp, bằng phương pháp quang phổ, các tác giả đã nhận thấy, gây tổn thương dây thần kinh hang bằng cách kẹp đã làm giảm hoạt tính của NOS tại mô dương vật, và dịch chiết từ đương qui được sử dụng tiêm vào trong khung chậu quanh dây thần kinh hang trong 2 tuần có tác dụng tăng cường hoạt tính của enzym này [30]. Đối với xuyên khung, tác dụng làm giãn cơ trơn thể hang của thành phần hoạt mạch chuanxiongzine phân lập từ dược liệu này đã được Xiao và cộng sự (2010) khảo sát trên cả nghiên cứu *in vitro* và *in vivo*. Trên *in vitro*, chuanxiongzine có thể làm giãn dài cơ trơn thể hang cô lập của thỏ, đồng thời cũng làm tăng áp lực thể hang của thỏ trên nghiên cứu *in vivo*. Sự ức chế cAMP phosphodiesterase hoặc cGMP phosphodiesterase của chuanxiongzine giúp giải thích một phần cho các tác dụng trên của hoạt chất này [102]. Với các kết quả nghiên cứu trên, đương qui và xuyên khung có thể giúp tăng cường hoạt động cương dương ở nam giới.

**Chương 2**  
**ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**2.1. Nguyên liệu nghiên cứu**

**2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu**

**2.1.1.1. Thành phần viên hoàn cứng TD0014**

**Bảng 2.1.** Thành phần viên hoàn cứng TD0014

<i>STT</i>	<i>Tên vị thuốc</i>	<i>Tên khoa học</i>	<i>Bộ phận sử dụng</i>	<i>Hàm lượng</i>
1	Bạch tật lê	<i>Tribulus terrestris</i>	Quả	4,00g
2	Cúc hoa*	<i>Chrysanthemum sinense</i>	Hoa	1,83g
3	Hoa đào*	<i>Prunus persica</i>	Toàn bộ hoa	1,14g
4	Đỗ đen	<i>Vigna cylindrica</i>	Hạt	1,14g
5	Bá bệnh	<i>Eurycoma longifolia</i>	Vỏ thân, rễ	0,69g
6	Hoa hòe*	<i>Sophora japonica</i>	Hoa	0,57g
7	Hoài sơn*	<i>Dioscorea persimilis</i>	Thân rễ	0,43g
8	Tỳ giải	<i>Dioscorea tokoro</i>	Thân rễ	0,40g
9	Hà thủ ô đỏ*	<i>Polygonum multiflorum</i>	Rễ	0,40g
10	Trần bì*	<i>Citrus deliciosa</i>	Vỏ quít	0,34g
11	Đình lăng	<i>Polyscias fruticosa</i>	Rễ	0,34g
12	Dây đau xương	<i>Tinospora sinensis</i>	Toàn bộ cây	0,29g
13	Mộc qua	<i>Chaenomeles lagenaria</i>	Quả	0,29g
14	Lạc tiên	<i>Passiflora foetida</i>	Phần cây mặt đất	0,29g
15	Đại táo	<i>Ziziphus jujube</i>	Quả	0,29g
16	Thục địa	<i>Rehmannia glutinosa</i>	Thân rễ	0,23g
17	Đương quy*	<i>Angelica sinensis</i>	Rễ	0,23g
18	Trạch tả*	<i>Alisma plantago-aquatica L.</i>	Thân củ	0,23g

<i>STT</i>	<i>Tên vị thuốc</i>	<i>Tên khoa học</i>	<i>Bộ phận sử dụng</i>	<i>Hàm lượng</i>
19	Ngưu tất*	<i>Achyranthes bidentata</i>	Rễ	0,23g
20	Ngũ vị tử	<i>Schizandra sinensis</i>	Quả	0,23g
21	Ba kích*	<i>Morinda officinalis</i>	Rễ	0,23g
22	Kim anh tử	<i>Rosa laevigata</i>	Quả giả hay đế hoa	0,23g
23	Tỏi khô*	<i>Allium sativum</i>	Củ	0,20g
24	Kỷ tử	<i>Lycium sinense</i>	Quả	0,17g
25	Cam thảo	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Rễ và thân rễ	0,14g
26	Nhân sâm*	<i>Panax ginseng</i>	Rễ	0,11g
27	Xuyên khung*	<i>Ligusticum wallichii</i>	Thân rễ	0,11g
28	Nhục thung dung	<i>Herba cistanches</i>	Toàn cây	0,11g
29	Bạch truật*	<i>Atractylodes macrocephala</i>	Thân rễ	0,11g
30	Đảng sâm*	<i>Codonopsis spp.</i>	Rễ	0,11g
31	Thỏ ty tử	<i>Cuscuta sinensis</i>	Hạt	0,11g
32	Phá cố chỉ	<i>Psoralea corylifolia</i>	Hạt	0,06g
33	Nhung hươu*	<i>Cornu Cervi parvum</i>	Sừng non	0,0072g

*Các dược liệu gắn dấu\* ở dạng bột dược liệu*

*Các dược liệu còn lại chiết xuất thành cao hỗn hợp dược liệu, hiệu suất chiết là 12,5%*

Thuốc thử TD0014 được pha trong dung môi là nước trước khi cho động vật thí nghiệm uống.

#### **2.1.1.2. Dạng bào chế**

- TD0014 được bào chế dưới dạng viên hoàn cứng, đóng gói 7,5 gam
- Liều dùng của TD0014 trên người: Ngày uống 2 lần, mỗi lần 1 gói (tương đương uống 15 gam dược liệu/ngày). Sản phẩm dự kiến dùng 3 tháng liên tục.

#### **2.1.1.3. Quy trình bào chế (xem phụ lục 2)**

#### **2.1.1.4. Nơi sản xuất**

Sản phẩm viên hoàn cứng TD0014 sử dụng trong các nghiên cứu của luận án nằm trong lô sản xuất số 3314 ngày 17/11/2014, do Công ty Cổ phần Sao Thái Dương cung cấp, đạt TCCS (xem phụ lục 3, phụ lục 4).

## 2.1.2. Hóa chất, dụng cụ và máy móc xét nghiệm

### 2.1.2.1. Hóa chất, dụng cụ phục vụ nghiên cứu

<i>Hóa chất/dụng cụ</i>	<i>Nghiên cứu</i>
<b>Thuốc</b>	
Testosteron 250 mg/mL, thuốc tiêm dầu, biệt dược Tesmon (TaiYu)	Ảnh hưởng của TD0014 đến hoạt tính androgen
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sildenafil 50 mg, viên nén, biệt dược Viagra (Pfizer)</li> <li>- Ketamin hydrochlorid 50 mg/mL, dung dịch thuốc tiêm (RotexMedica)</li> <li>- Heparin 5000 UI/mL, dung dịch thuốc tiêm (Claris Lifesciences Limited)</li> <li>- Dung dịch sát khuẩn: cồn 70<sup>0</sup>, dung dịch povidon-iodin 10%</li> </ul>	Ảnh hưởng của TD0014 đến áp lực thể hang (ICP) của chuột cống đực
Natri valproat 200 mg, viên nén bao tan trong ruột, biệt dược Dépakine (Sanofi Aventis)	Mô hình gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat
<b>Dụng cụ</b>	
Kính hiển vi phẫu thuật, kéo, nia, panh, kìm, chỉ, bông, băng, gạc, bơm tiêm,...	
<b>Hóa chất</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kit định lượng các enzym và chất chuyển hoá trong máu: ALT (alanin aminotransferase), AST (aspartat aminotransferase), bilirubin toàn phần, protein, cholesterol toàn phần và creatinin của hãng Hospitex Diagnostics (Italy) và hãng DIALAB GmbH (Áo).</li> <li>- Dung dịch xét nghiệm máu của hãng Exigo</li> <li>- Các hoá chất xét nghiệm và làm tiêu bản mô bệnh học</li> </ul>	Độc tính bán trường diễn
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kit Testosterone Gen. 2 Elecsys, cobas e (Roche Diagnostics GmbH)</li> </ul>	Mô hình gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat Ảnh hưởng của TD0014 đến hoạt tính androgen

### **2.1.2.2. Máy móc phục vụ nghiên cứu**

- Hệ thống thu thập số liệu nghiên cứu ICP:
  - + Hệ thống Powerlab (AD Instrument, Úc), phần mềm Lab Chart Pro.
  - + Đầu đo áp lực MLT 844 và các dây nối phụ kiện khác.
  - + Đầu đo huyết áp động mạch
- Bộ điện cực kích thích dây thần kinh hang gồm:
  - + Điện cực: hai điện cực bằng kim loại, đặt trong ống nhựa.
  - + Khung cố định điện cực có thể điều chỉnh các hướng khác nhau.
- Cân phân tích, chính xác đến 0,1 mg
- Máy sinh hóa bán tự động Erba của Ấn Độ.
- Máy huyết học Exigo Veterinary Hematology A (Thụy Điển).
- Máy phân tích tinh trùng tự động CASA của hãng Hamilton Ivos.
- Máy xét nghiệm miễn dịch tự động Cobas E411 của hãng Roche

### **2.2. Đối tượng nghiên cứu**

- Chuột cống trắng chủng *Wistar*, cả 2 giống, khỏe mạnh, do Học viện Quân Y cung cấp, bao gồm các loại sau:
  - + Chuột cống đực non, khỏe mạnh, 20 – 34 ngày tuổi và 42 – 50 ngày tuổi.
  - + Chuột cống đực và cái trưởng thành, cân nặng 200 – 250g.
- Chuột nhắt trắng chủng *Swiss*, giống đực, khỏe mạnh, trọng lượng  $20 \pm 2$  g do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

Động vật thí nghiệm được nuôi 5 – 7 ngày trước khi tiến hành nghiên cứu để thích nghi với môi trường và điều kiện chăn nuôi của phòng thí nghiệm. Trước và trong suốt quá trình nghiên cứu, động vật thí nghiệm được nuôi bằng thức ăn chuẩn do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp, uống nước tự do.

### **2.3. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.3.1. Nghiên cứu độc tính của TD0014 trên động vật thực nghiệm**

##### **2.3.1.1. Nghiên cứu độc tính cấp**

Nghiên cứu độc tính cấp của TD0014 theo đường uống trên chuột nhắt trắng được tiến hành theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới về thuốc có nguồn gốc



dược liệu và xác định liều chết 50% (LD<sub>50</sub>) theo phương pháp Litchfield-Wilcoxon [104],[105],[106].

Pha 01 gói TD0014 (tương đương 7,5 gam dược liệu) trong nước cất thành vừa đủ 10 mL dung dịch có mức độ đậm đặc tối đa có thể cho chuột nhắt uống bằng kim đầu tù chuyên dụng (kim hơi cong có đầu tù với độ dài đưa vào đến dạ dày chuột).

Chuột nhắt trắng trưởng thành, giống đực, trọng lượng  $20 \pm 2$ g được chia thành từng lô, mỗi lô 10 con. Cho từng lô chuột uống thuốc thử TD0014 với các mức liều khác nhau 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 (ăn uống, hoạt động thần kinh, đi lại, bài tiết...). Nếu chuột chết, mổ chuột để đánh giá đại thể các tổn thương của các cơ quan.

Xác định LD<sub>50</sub> theo tỷ lệ chuột chết trong vòng 72 giờ đầu.

### **2.3.1.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn**

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn theo đường uống của TD0014 được tiến hành theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới về thuốc có nguồn gốc dược liệu [105],[106].

Chuột cống trắng trưởng thành, giống đực, được chia làm 3 lô, mỗi lô 11 con, mỗi con nhốt riêng một chuồng.

- Lô chứng: uống dung môi pha thuốc 10 mL/kg/ngày
- Lô trị 1: uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày (*liều tương đương liều dự kiến dùng trên người, tính theo hệ số 6*).
- Lô trị 2: uống TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày (gấp 3 lần lô trị 1).

Chuột cống trắng được uống nước hoặc thuốc thử trong 90 ngày liên tục, mỗi ngày một lần vào buổi sáng.

*Các chỉ tiêu theo dõi trước và trong quá trình nghiên cứu:*

- Tình trạng chung, thể trọng của chuột cống trắng.
- Đánh giá chức phận tạo máu thông qua 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 mức độ hủy hoại tế bào gan và chức năng gan thông qua định lượng một số enzym và chất chuyển hoá trong máu: ALT, AST, bilirubin toàn phần, cholesterol toàn phần và albumin.
- Đánh giá chức năng lọc của thận thông qua định lượng nồng độ creatinin trong huyết thanh.

Các thông số theo dõi được kiểm tra vào trước lúc uống thuốc thử, sau 30 ngày, sau 60 ngày và sau 90 ngày uống thuốc thử.

- Mô bệnh học: sau 90 ngày uống thuốc thử, chuột cống trắng 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 cống trắng ở mỗi lô (do PGS.TS Lê Đình Roanh đọc kết quả).

### **2.3.2. Nghiên cứu hoạt tính androgen của TD0014 trên động vật thực nghiệm**

#### **2.3.2.1. Hoạt tính androgen của TD0014 trên chuột cống đực non thiếu**

Đánh giá hoạt tính androgen của TD0014 trên chuột cống trắng đực non thiếu được tiến hành theo hướng dẫn OECD 441 [40]

Chuột cống đực non 42 – 50 ngày tuổi, được nuôi ổn định 5 đến 7 ngày trong môi trường phòng thí nghiệm, sau đó tiến hành thí nghiệm theo các bước sau:

- Thiếu chuột: Chuột được gây mê bằng cloralhydrat tiêm màng bụng liều 250 mg/kg, sau đó chuột được cố định trên bàn cố định chuột. Dùng tay vuốt nhẹ từ ổ bụng xuống bìu để tinh hoàn nằm đúng vị trí trong túi bìu. Dùng ethanol 70<sup>0</sup> sát trùng vùng da bìu, lấy kéo rạch qua da bìu, nhẹ nhàng bóc tách tinh hoàn khỏi túi bìu, buộc chỉ vùng gốc tinh hoàn, lần lượt cắt từng bên tinh hoàn ở trên chỗ buộc chỉ, sau đó khâu lớp da và sát trùng lại bằng povidon iod.
- Chuột được tiêm giảm đau sau mổ bằng piroxicam 3 mg/kg và tiêm kháng sinh amikacin 100 mg/kg để dự phòng nhiễm khuẩn.
- Cho chuột nghỉ ngơi 7 ngày để hồi phục sức khỏe. Sau đó, chia chuột ngẫu nhiên vào các lô nghiên cứu, mỗi lô 9 con, như sau:

Lô nghiên cứu		Thiến chuột	Dùng thuốc
1	Chứng sinh học	Không	Uống nước cất với thể tích 10 mL/kg/ngày
2	Mô hình	Có	Uống nước cất với thể tích 10 mL/kg/ngày
3	Chứng dương	Có	Tiêm dưới da testosterone liều 0,4 mg/kg/ngày
4	TD0014 liều thấp	Có	Uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày
5	TD0014 liều cao	Có	Uống TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày

Chuột được sử dụng thuốc thử hoặc dung môi mỗi ngày 1 lần vào buổi sáng, trong vòng 10 ngày. Sau lần dùng thuốc cuối cùng 24 giờ, cân trọng lượng chuột và giết chuột.

- Lấy máu động mạch cảnh, ly tâm tách huyết thanh để làm xét nghiệm định lượng nồng độ testosterone máu bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang (ECLIA).
- Bóc tách các cơ quan sinh dục phụ bao gồm: túi tinh, tuyến cowper, cơ nâng hậu môn – hành hang, tuyến tiền liệt, đầu dương vật. Sau đó cân ngay trên cân phân tích, riêng túi tinh được ép nhẹ cho hết tinh dịch rồi mới cân. Kết quả được tính theo trọng lượng cơ quan (mg)/100g trọng lượng cơ thể chuột.

So sánh nồng độ testosterone máu và tỷ lệ trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ trên trọng lượng cơ thể giữa các lô với nhau.

### **2.3.2.2. Hoạt tính androgen của TD0014 trên chuột cống đực non cai sữa**

Đánh giá hoạt tính androgen của TD0014 trên chuột cống trống đực non cai sữa được tiến hành theo hướng dẫn OECD 115 [41]

Chuột cống đực non 20 – 34 ngày tuổi, được nuôi ổn định 5 đến 7 ngày trong môi trường phòng thí nghiệm. Sau đó, chia chuột ngẫu nhiên vào 4 lô, mỗi lô 10 con, như sau:

- Lô 1: uống dung môi pha thuốc, với thể tích 10 mL/kg/ngày
- Lô 2: tiêm dưới da dung dịch testosterone với liều 1,0 mg/kg/ngày
- Lô 3: uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày (*liều tương đương liều dự kiến dùng trên người, tính theo hệ số 6*)
- Lô 4: uống TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày.

Chuột được sử dụng thuốc thử hoặc dung môi mỗi ngày 1 lần vào buổi sáng, trong vòng 10 ngày. Sau lần dùng thuốc cuối cùng 24 giờ, cân trọng lượng chuột và giết chuột.

- Lấy máu động mạch cảnh, ly tâm tách huyết thanh để làm xét nghiệm định lượng nồng độ testosterone máu bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang (ECLIA).
- Bóc tách các cơ quan sinh dục bao gồm: tinh hoàn, mào tinh, túi tinh, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn – hành hang, tuyến tiền liệt. Sau đó cân ngay trên cân phân tích, riêng túi tinh được ép nhẹ cho hết tinh dịch rồi mới cân. Kết quả được tính theo trọng lượng cơ quan (mg)/100g trọng lượng cơ thể chuột.

So sánh nồng độ các hormon trong máu và tỷ lệ trọng lượng các cơ quan sinh dục trên trọng lượng cơ thể giữa các lô với nhau.

### **2.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của TD0014 trên áp lực thể hang (intracarvenous pressure - ICP) của chuột cống đực trắng**

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Gajbhiye và cộng sự (2015) [45] như sau:

- Chuột cống đực được đặt trong phòng yên tĩnh, hạn chế tối đa mọi kích thích
- Chuột cống đực được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 6 con.
  - + Lô 1: uống dung môi pha thuốc với thể tích 10 mL/kg
  - + Lô 2: uống sildenafil liều 6 mg/kg
  - + Lô 3: uống TD0014 liều 1,8 g được liều/kg (*liều tương đương liều dự kiến dùng trên người, tính theo hệ số 6*)

Cho chuột ở các lô nghiên cứu uống nước cất/thuốc thử một lần trước khi tiến hành đo ICP. Sau khi uống thuốc 2 giờ, chuột ở các lô được tiến hành đo ICP theo quy trình như sau:

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

- Tiến hành
  - + Bước 1: Bộc lộ và đặt catheter vào động mạch cảnh để đo huyết áp động mạch
  - + Bước 2: Bộc lộ dây thần kinh hang
  - + Bước 3: Bộc lộ thể hang, đặt một kim 26G vào thể hang, nối kim với một ống PE-50 chứa nước muối sinh lý pha heparin 100 UI/mL để đo ICP
  - + Bước 4: Đo áp lực thể hang, huyết áp động mạch trước khi kích thích dây thần kinh hang.
  - + Bước 5: Đo áp lực thể hang, huyết áp động mạch sau khi kích thích dây thần kinh hang. Số lần kích thích là 3 lần, khoảng cách giữa các lần kích thích là 10 phút, mỗi lần kích thích kéo dài 1 phút. Dòng điện kích thích dây thần kinh hang có cường độ 5V, tần số 20Hz, độ rộng xung 2ms.
  - + Bước 6: Phân tích số liệu offline bằng phần mềm Labchart pro. Kết quả sau phân tích cho ra các thông số về áp lực thể hang, huyết áp động mạch (đơn vị mmHg).

*Các chỉ số nghiên cứu*

- ICP trước khi kích thích dây thần kinh hang (ICP nền) (mmHg)
- ICP đỉnh sau khi kích thích dây thần kinh hang (mmHg) và thời gian đạt đến ICP đỉnh (ms)
- Sự biến đổi của ICP theo thời gian (diện tích dưới đường cong ICP) (mmHg-s)
- Thời gian đáp ứng với kích thích (ms)
- Tỷ số ICP đỉnh/huyết áp động mạch trung bình (ICP/MAP)

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

### 2.3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của TD0014 trên chuột cống trắng bị gây suy giảm chức năng sinh sản bằng natri valproat

#### 2.3.4.1. Tác dụng bảo vệ của TD0014 trên chuột cống trắng bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Chuột cống đực trưởng thành, được chia ngẫu nhiên thành 4 lô nghiên cứu. Chuột đực ở các lô được uống natri valproat (dung môi pha là nước cất) để gây suy giảm sinh sản (SGSS) và uống thuốc thử (dung môi pha là nước cất) theo thứ tự trong ngày như sau:

Lô nghiên cứu	Uống lần 1	Uống lần 2
Lô 1 (Chứng sinh học)	Uống nước cất 10 mL/kg	Uống nước cất 10 mL/kg
Lô 2 (Mô hình)	Uống nước cất 10 mL/kg	Uống natri vaproat 500 mg/kg
Lô 3 (TD0014 liều thấp)	Uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	Uống natri vaproat 500 mg/kg
Lô 4 (TD0014 liều cao)	Uống TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	Uống natri vaproat 500 mg/kg

Chuột đực uống song song natri valproat và thuốc thử liên tục trong thời gian 7 tuần, khoảng cách giữa 2 lần uống trong ngày cách nhau ít nhất 3 giờ. Sau 5 tuần nghiên cứu, tiến hành ghép chuột, 1 chuột đực được ghép ngẫu nhiên với 2 chuột cái trong thời gian 2 tuần. Kết thúc 7 tuần nghiên cứu, đánh giá các chỉ số nghiên cứu trên chuột đực và chuột cái như sau:

- Chuột đực:
  - + Lấy máu động mạch cảnh, ly tâm lấy huyết thanh để định lượng nồng độ testosterone bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang (ECLIA)
  - + Các cơ quan sinh dục (tinh hoàn, túi tinh, mào tinh, tuyến Cowper, đầu dương vật, tuyến tiền liệt, cơ nâng hậu môn – hành hang) được bóc tách và đem cân trọng lượng.
  - + Mật độ tinh trùng và tỷ lệ sống của tinh trùng, tiêu bản hình thái tinh trùng.

- + Tỷ lệ di động của tinh trùng (tiến tới nhanh, tiến tới chậm, không tiến tới, và không di động), và tốc độ di động của tinh trùng.
- + Hình thái mô học của tinh hoàn sử dụng kỹ thuật nhuộm Hematoxyline-Eosin (do PGS.TS Nguyễn Thị Bình đọc kết quả).
- Chuột cái: tỷ lệ mang thai của chuột cống cái.

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

#### **2.3.4.2. Tác dụng phục hồi của TD0014 trên chuột cống trắng bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat**

Chuột cống đực trưởng thành, được chia ngẫu nhiên thành 4 lô nghiên cứu. Chuột đực ở các lô 2, 3 và 4 được uống natri valproat (dung môi pha là nước cất) liên tục trong 7 tuần để gây SGSS. Sau 7 tuần uống natri valproat, chuột đực ở các lô được uống nước cất hoặc thuốc thử như sau:

- Lô 1 (Chứng sinh học): uống nước cất với thể tích 10 mL/kg
- Lô 2 (Mô hình): uống nước cất với thể tích 10 mL/kg
- Lô 3 (TD0014 liều thấp): uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày
- Lô 4 (TD0014 liều cao): uống TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày

Chuột đực uống nước cất hoặc thuốc thử liên tục trong thời gian 10 ngày. Sau 10 ngày uống thuốc, tiến hành ghép chuột, 1 chuột đực được ghép ngẫu nhiên với 2 chuột cái trong thời gian 2 tuần. Kết thúc thời gian ghép cặp, đánh giá các chỉ số nghiên cứu trên chuột đực và chuột cái như sau:

- Chuột đực:
  - + Lấy máu động mạch cảnh, ly tâm lấy huyết thanh để định lượng nồng độ testosterone bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang (ECLIA)
  - + Các cơ quan sinh dục (tinh hoàn, mào tinh, túi tinh, tuyến Cowper, đầu dương vật, tuyến tiền liệt, cơ nâng hậu môn – hành hang) được bóc tách và đem cân trọng lượng.
  - + Mật độ tinh trùng và tỷ lệ sống của tinh trùng, tiêu bản hình thái tinh trùng
  - + Tỷ lệ di động của tinh trùng (tiến tới nhanh, tiến tới chậm, không tiến tới, và không di động), và tốc độ di động của tinh trùng.

- + Hình thái mô học của tinh hoàn sử dụng kỹ thuật nhuộm Hematoxyline-Eosin (do PGS.TS Nguyễn Thị Bình đọc kết quả).
- Chuột cái: tỷ lệ mang thai của chuột cống cái.  
Các chỉ số nghiên cứu được so sánh giữa các lô với nhau.

#### **2.4. Xử lý số liệu**

Các số liệu thu được đều được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 và SPSS 22.0, sử dụng thuật toán thống kê thích hợp (Student's t-test, Paired t-test, Mann-Whitney U test, Chi-square test) với số liệu thu được. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p < 0,05$ .

#### **2.5. Địa điểm nghiên cứu**

- Bộ môn Dược lý – Đại học Y Hà Nội
- Bộ môn Sinh lý học – Học viện Quân Y.
- Trung tâm nghiên cứu và phát hiện sớm ung thư – Liên hiệp các Hội khoa học và kỹ thuật Việt Nam.
- Bộ môn Y sinh học-Di truyền – Đại học Y Hà Nội.
- Bộ môn Mô-Phôi – Đại học Y Hà Nội.
- Khoa Sinh hóa – Bệnh viện Phụ sản Trung ương



### Chương 3

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Nghiên cứu độc tính của TD0014 trên thực nghiệm

#### 3.1.1. Độc tính cấp của TD0014 theo đường uống trên chuột nhắt trắng

Chuột nhắt trắng ở các lô đã được uống thuốc thử TD0014 ở dạng dung dịch có mức độ đậm đặc tối đa có thể cho chuột nhắt uống bằng kim đầu tù chuyên dụng, uống từ liều thấp nhất đến liều cao nhất. Theo dõi thấy không có chuột nào chết, không xuất hiện triệu chứng bất thường nào trong 72 giờ sau uống thuốc và trong suốt 7 ngày. Mối tương quan giữa liều dùng TD0014 và tỷ lệ chuột chết ở các lô tương ứng được thể hiện trong bảng 3.1.

**Bảng 3.1.** Mối tương quan giữa liều dùng TD0014 và tỷ lệ chuột chết

Lô chuột (n = 10)	Liều dùng (g dược liệu/kg)	Tỷ lệ chết (%)	Dấu hiệu bất thường khác
Lô 1	22,50	0	Không
Lô 2	33,75	0	Không
Lô 3	45,00	0	Không
Lô 4	56,25	0	Không

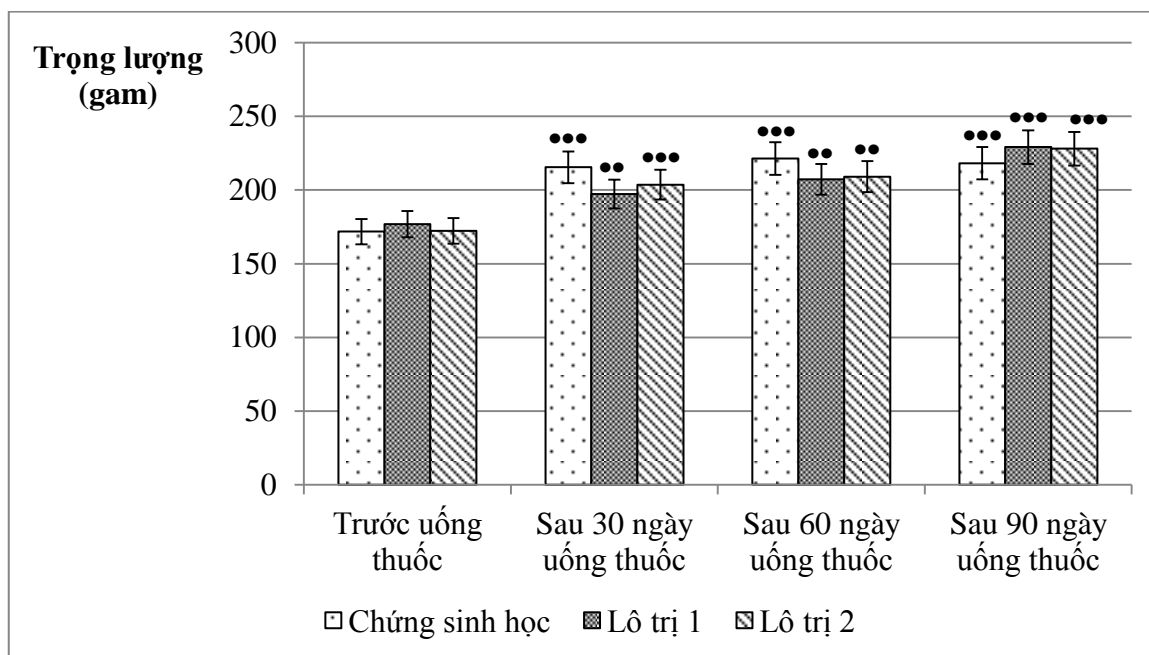
Số liệu ở bảng 3.1 cho thấy, không có chuột chết ở tất cả các lô, vì vậy chưa xác định được LD<sub>50</sub> của TD0014 trên chuột nhắt trắng theo đường uống bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon.

#### 3.1.2. Độc tính bán trường diễn của TD0014 trên chuột cống trắng

##### 3.1.2.1. Tình trạng chung của động vật thực nghiệm

- Trong thời gian nghiên cứu, chuột cống ở cả 3 lô hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, ăn uống tốt, phân khô.
- Sau 90 ngày nghiên cứu có 1/11 chuột bị chết ở lô trị 2 (uống TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày). Chuột bị chết đã được mổ quan sát đại thể các cơ quan, kết quả kiểm tra cho thấy không có thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan tim, phổi, gan, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá của chuột cống.

### 3.1.2.1. Sự thay đổi thể trọng chuột cống trắng



•• $p < 0,01$ ; ••• $p < 0,001$  so với thời điểm trước uống thuốc (Paired t-test)

#### Biểu đồ 3.1. Ảnh hưởng của TD0014 đến thể trọng chuột cống

Kết quả ở biểu đồ 3.1 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống thuốc thử, trọng lượng chuột cống ở cả 3 lô (lô chứng và 2 lô trị) đều tăng có ý nghĩa thống kê so với trước khi nghiên cứu ( $p < 0,05$ ). Không có sự khác biệt về trọng lượng giữa lô chứng và các lô dùng thuốc thử ( $p > 0,05$ ) tại các thời điểm nghiên cứu.

### 3.1.2.2. Đánh giá chức năng tạo máu

**Bảng 3.2.** Ảnh hưởng của TD0014 đến số lượng hồng cầu trong máu chuột cống

Thời gian	Số lượng hồng cầu ( $10^{12}/L$ )		
	Lô chứng (n = 11)	Lô trị 1 (n = 11)	Lô trị 2 (n = 10)
Trước uống thuốc	$6,78 \pm 0,26$	$6,91 \pm 0,57$	$7,09 \pm 0,71$
Sau 30 ngày uống thuốc	$7,15 \pm 1,19$	$7,55 \pm 0,79$	$7,35 \pm 0,42$
p (trước - sau)	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$
Sau 60 ngày uống thuốc	$7,14 \pm 0,60$	$7,41 \pm 0,67$	$7,41 \pm 0,64$
p (trước - sau)	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$
Sau 90 ngày uống thuốc	$7,26 \pm 0,93$	$7,36 \pm 0,56$	$7,47 \pm 0,74$
p (trước - sau)	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống TD0014, số lượng hồng cầu ở cả lô trị 1 (uống TD0014 liều thấp) và lô trị 2 (uống TD0014 liều cao) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.3.** Ảnh hưởng của TD0014 đến hemoglobin và hematocrit trong máu chuột cống

Thời gian	Lô chứng (n = 11)	Lô trị 1 (n = 11)	Lô trị 2 (n = 10)
<b>Huyết sắc tố (g/dL)</b>			
Trước uống thuốc	13,15 ± 0,46	13,33 ± 0,55	13,49 ± 0,68
Sau 30 ngày uống thuốc	12,47 ± 1,51	13,35 ± 0,89	13,12 ± 0,92
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 60 ngày uống thuốc	13,07 ± 0,89	12,65 ± 0,77	13,17 ± 0,57
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 90 ngày uống thuốc	13,64 ± 1,06	12,76 ± 0,3	13,00 ± 1,08
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<b>Hematocrit (%)</b>			
Trước uống thuốc	41,34 ± 2,43	42,71 ± 1,72	42,20 ± 2,29
Sau 30 ngày uống thuốc	39,77 ± 5,11	43,32 ± 2,46	41,27 ± 3,16
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 60 ngày uống thuốc	40,92 ± 3,18	40,89 ± 3,64	42,40 ± 2,44
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 90 ngày uống thuốc	41,53 ± 3,40	40,40 ± 4,20	40,07 ± 3,42
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống TD0014, hàm lượng huyết sắc tố và hematocrit ở cả lô trị 1 (uống TD0014 liều thấp) và lô trị 2 (uống TD0014 liều cao) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.4.** Ảnh hưởng của TD0014 đến thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột cống

Thời gian	Thể tích trung bình hồng cầu (fL)		
	Lô chứng (n = 11)	Lô trị 1 (n = 11)	Lô trị 2 (n = 10)
Trước uống thuốc	51,93 ± 2,91	52,39 ± 2,64	52,70 ± 3,57
Sau 30 ngày uống thuốc	51,28 ± 5,73	49,70 ± 2,98	50,23 ± 3,26
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 60 ngày uống thuốc	51,57 ± 3,13	51,05 ± 2,69	52,55 ± 1,77
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 90 ngày uống thuốc	49,22 ± 2,73	50,20 ± 1,88	51,25 ± 3,70
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.4 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống TD0014, thể tích trung bình hồng cầu ở cả lô trị 1 (uống TD0014 liều thấp) và lô trị 2 (uống TD0014 liều cao) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.5.** Ảnh hưởng của TD0014 đến số lượng bạch cầu trong máu chuột cống

Thời gian	Số lượng bạch cầu ( $10^9/L$ )		
	Lô chứng (n = 11)	Lô trị 1 (n = 11)	Lô trị 2 (n = 10)
Trước uống thuốc	5,12 ± 1,49	5,05 ± 1,00	4,76 ± 0,64
Sau 30 ngày uống thuốc	6,10 ± 1,82	5,20 ± 1,71	5,56 ± 1,05
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 60 ngày uống thuốc	5,74 ± 1,71	5,51 ± 1,59	5,07 ± 1,08
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 90 ngày uống thuốc	5,79 ± 1,78	4,95 ± 0,91	5,57 ± 1,26
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.5 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống TD0014, số lượng bạch cầu ở cả lô trị 1 (uống TD0014 liều thấp) và lô trị 2 (uống TD0014 liều cao) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.6.** Ảnh hưởng của TD0014 đến công thức bạch cầu trong máu chuột cống

Thời gian	Công thức bạch cầu					
	Lô chứng (n = 11)		Lô trị 1 (n = 11)		Lô trị 2 (n = 10)	
	<i>Lympho</i> (%)	<i>Trung</i> <i>tính</i> (%)	<i>Lympho</i> (%)	<i>Trung</i> <i>tính</i> (%)	<i>Lympho</i> (%)	<i>Trung</i> <i>tính</i> (%)
Trước uống thuốc	70,69 ± 5,05	23,27 ± 12,63	69,75 ± 5,44	25,64 ± 13,59	70,55 ± 3,66	23,64 ± 9,16
Sau 30 ngày uống thuốc	64,99 ± 10,26	29,72 ± 9,02	70,12 ± 2,76	26,23 ± 2,90	67,75 ± 6,99	27,42 ± 7,29
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 60 ngày uống thuốc	69,41 ± 4,83	25,48 ± 4,32	65,15 ± 7,86	30,44 ± 6,67	68,62 ± 10,19	27,55 ± 9,87
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 90 ngày uống thuốc	69,38 ± 5,87	25,50 ± 4,87	65,28 ± 7,42	31,37 ± 8,19	68,09 ± 3,93	27,93 ± 4,04
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.6 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống TD0014, công thức bạch cầu ở cả lô trị 1 (uống TD0014 liều thấp) và lô trị 2 (uống TD0014 liều cao) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.7.** Ảnh hưởng của TD0014 đến số lượng tiểu cầu trong máu chuột cống

Thời gian	Số lượng tiểu cầu ( $10^9/L$ )		
	Lô chứng (n = 11)	Lô trị 1 (n = 11)	Lô trị 2 (n = 10)
Trước uống thuốc	410,80 ± 59,98	424,84 ± 62,10	412,30 ± 58,15
Sau 30 ngày uống thuốc	362,91 ± 64,61	427,36 ± 85,11	395,09 ± 79,42
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 60 ngày uống thuốc	371,18 ± 85,06	419,91 ± 92,20	418,36 ± 79,80
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 90 ngày uống thuốc	419,91 ± 85,89	414,82 ± 72,43	418,10 ± 90,09
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.7 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống TD0014, số lượng tiểu cầu ở cả lô trị 1 (uống TD0014 liều thấp) và lô trị 2 (uống TD0014 liều cao) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.2.3. Đánh giá mức độ hủy hoại tế bào gan

**Bảng 3.8.** Ảnh hưởng của TD0014 đến hoạt độ transaminase trong máu chuột cống

Thời gian	Hoạt độ transaminase (UI/L)		
	Lô chứng (n = 11)	Lô trị 1 (n = 11)	Lô trị 2 (n = 10)
<b>AST</b>			
Trước uống thuốc	112,91 ± 25,04	108,64 ± 15,52	121,00 ± 24,31
Sau 30 ngày uống thuốc	110,27 ± 10,62	103,82 ± 26,04	117,36 ± 30,40
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 60 ngày uống thuốc	101,55 ± 7,06	113,36 ± 20,21	112,55 ± 17,46
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 90 ngày uống thuốc	104,73 ± 22,00	106,73 ± 17,70	107,90 ± 17,04
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<b>ALT</b>			
Trước uống thuốc	60,00 ± 18,07	62,18 ± 13,55	59,00 ± 7,76
Sau 30 ngày uống thuốc	50,64 ± 7,12	51,00 ± 11,74	50,91 ± 8,84
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 60 ngày uống thuốc	53,45 ± 9,13	58,45 ± 14,08	61,64 ± 10,68
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 90 ngày uống thuốc	66,00 ± 12,24	60,91 ± 11,78	60,40 ± 14,71
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.8 cho thấy: sau 90 ngày uống TD0014, hoạt độ AST và ALT trong máu chuột cống ở cả lô trị 1 (uống TD0014 liều thấp) và lô trị 2 (uống TD0014 liều cao) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.2.4. Đánh giá chức năng gan

**Bảng 3.9.** Ảnh hưởng TD0014 đến nồng độ bilirubin trong máu chuột cống

Thời gian	Bilirubin toàn phần (mmol/L)		
	Lô chứng (n = 11)	Lô trị 1 (n = 11)	Lô trị 2 (n = 10)
Trước uống thuốc	13,38 ± 0,41	13,43 ± 0,55	13,48 ± 0,29
Sau 30 ngày uống thuốc	13,40 ± 0,49	13,40 ± 0,29	13,58 ± 0,43
<i>p (trước - sau)</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 60 ngày uống thuốc	13,45 ± 0,41	13,61 ± 0,39	13,44 ± 0,48
<i>p (trước - sau)</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 90 ngày uống thuốc	13,47 ± 0,53	13,44 ± 0,50	13,49 ± 0,44
<i>p (trước - sau)</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.9 cho thấy: sau 90 ngày uống TD0014, nồng độ bilirubin toàn phần trong máu chuột cống ở cả hai lô trị đều không có sự khác biệt so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.10.** Ảnh hưởng của TD0014 đến hàm lượng albumin trong máu chuột cống

Thời gian	Albumin (g/dL)		
	Lô chứng (n = 11)	Lô trị 1 (n = 11)	Lô trị 2 (n = 10)
Trước uống thuốc	3,39 ± 0,27	3,57 ± 0,46	3,53 ± 0,26
Sau 30 ngày uống thuốc	3,52 ± 0,39	3,85 ± 0,39	3,39 ± 0,24
<i>p (trước - sau)</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 60 ngày uống thuốc	3,39 ± 0,39	3,68 ± 0,29	3,65 ± 0,29
<i>p (trước - sau)</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 90 ngày uống thuốc	3,52 ± 0,19	3,53 ± 0,41	3,53 ± 0,52
<i>p (trước - sau)</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở các bảng 3.10 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống TD0014, nồng độ albumin trong máu chuột cống ở lô trị 1 (uống TD0014 liều thấp) và lô trị 2 (uống TD0014 liều cao) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.11.** Ảnh hưởng của TD0014 đến nồng độ cholesterol trong máu chuột cống

Thời gian	Cholesterol (mmol/L)		
	Lô chứng (n = 11)	Lô trị 1 (n = 11)	Lô trị 2 (n = 10)
Trước uống thuốc	1,70 ± 0,28	1,81 ± 0,16	1,75 ± 0,25
Sau 30 ngày uống thuốc	1,88 ± 0,23	1,93 ± 0,28	1,75 ± 0,27
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 60 ngày uống thuốc	1,68 ± 0,31	1,85 ± 0,25	1,81 ± 0,12
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 90 ngày uống thuốc	1,68 ± 0,20	1,64 ± 0,25	1,69 ± 0,17
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.11 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống TD0014, nồng độ cholesterol trong máu chuột cống ở cả lô trị 1 (uống TD0014 liều thấp) và lô trị 2 (uống TD0014 liều cao) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.2.5. Đánh giá chức năng lọc của thận

**Bảng 3.12.** Ảnh hưởng của TD0014 đến hàm lượng creatinin trong máu chuột cống

Thời gian	Creatinin (mg/dL)		
	Lô chứng (n = 11)	Lô trị 1 (n = 11)	Lô trị 2 (n = 10)
Trước uống thuốc	1,04 ± 0,09	1,05 ± 0,08	1,05 ± 0,08
Sau 30 ngày uống thuốc	1,05 ± 0,08	1,07 ± 0,06	1,08 ± 0,06
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 60 ngày uống thuốc	1,00 ± 0,08	1,05 ± 0,08	1,07 ± 0,09
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 90 ngày uống thuốc	1,04 ± 0,08	1,02 ± 0,06	1,07 ± 0,12
<i>p</i> (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.12 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống TD0014, ở cả hai lô trị, nồng độ creatinin trong máu chuột cống đều không có sự thay đổi khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ( $p > 0,05$ )



### 3.1.2.6. Thay đổi về mô bệnh học

Sau khi cho chuột cống trắng uống thuốc 90 ngày, tiến hành mổ để kiểm tra cấu trúc đại thể các cơ quan và kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan và thận của 30% số chuột cống trắng ở mỗi lô, kết quả như sau:

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

**Bảng 3.13.** Kết quả vi thể gan, thận chuột cống sau 90 ngày uống TD0014

<b>Lô nghiên cứu</b>	<b>Gan</b>	<b>Thận</b>
Chứng sinh học	3/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan thoái hóa nhẹ	2/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh thận bình thường 1/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gằn
TD0014 liều thấp	1/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan bình thường 2/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan thoái hóa nhẹ	3/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh thận bình thường
TD0014 liều cao	3/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan bình thường	3/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh thận bình thường

(Xem chi tiết hình ảnh vi thể gan, thận chuột ở các lô nghiên cứu tại Phụ lục 2)

### 3.2. Nghiên cứu hoạt tính androgen của TD0014 trên động vật thực nghiệm

#### 3.2.1. Hoạt tính androgen của TD0014 trên chuột cống đực non thiếu

**Bảng 3.14.** Ảnh hưởng của TD0014 lên trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ của chuột cống đực non thiếu

Trọng lượng (mg/100 g thể trọng)	Lô nghiên cứu (n = 9)				
	Chứng sinh học	Mô hình	Testosteron 0,4 mg/kg	TD0014 1,8 g/kg	TD0014 5,4 g/kg
Đầu dương vật	28,2 ± 7,8	21,0 ± 5,8*	42,2 ± 4,2 <sup>†††</sup>	22,3 ± 4,5	22,6 ± 6,3
Túi tinh	19,7 ± 5,7	8,7 ± 2,1 <sup>***</sup>	81,6 ± 19,2 <sup>†††</sup>	9,3 ± 2,4	8,2 ± 2,6
Tuyến tiền liệt	22,2 ± 6,4	5,0 ± 1,6 <sup>***</sup>	34,2 ± 8,3 <sup>†††</sup>	8,9 ± 2,8 <sup>††</sup>	17,7 ± 4,2 <sup>†††</sup>
Tuyến Cowper	8,4 ± 1,9	1,3 ± 0,2 <sup>***</sup>	10,7 ± 2,6 <sup>†††</sup>	1,9 ± 0,6 <sup>†</sup>	1,6 ± 0,3 <sup>†</sup>
Cơ nâng hậu môn-hành hang	104,1 ± 19,2	44,6 ± 9,0 <sup>***</sup>	139,6 ± 30,2 <sup>†††</sup>	39,8 ± 9,2	36,5 ± 9,8

\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student't-test)

<sup>†</sup> $p < 0,05$ ; <sup>††</sup> $p < 0,01$ ; <sup>†††</sup> $p < 0,001$  so với lô mô hình (Student't-test)

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.14 cho thấy:

- Chuột cống đực non thiếu ở lô mô hình có trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học với  $p < 0,05$  và  $p < 0,001$ .
- Chuột cống đực non thiếu được tiêm dưới da dung dịch testosteron liều 0,4 mg/kg/ngày trong 10 ngày liên tiếp có sự tăng rõ rệt trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .
- TD0014 ở cả hai liều thể hiện tác dụng làm tăng trọng lượng tuyến tiền liệt và tuyến Cowper của chuột cống đực non thiếu so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$ . Trọng lượng đầu dương vật, túi tinh và cơ nâng hậu môn-hành hang của chuột cống đực non thiếu ở cả hai lô uống TD0014 đều không có sự khác biệt so với lô mô hình ( $p > 0,05$ )

**Bảng 3.15.** Ảnh hưởng của TD0014 lên nồng độ testosterone trong huyết thanh của chuột cống đực non thiếu

Lô nghiên cứu	n	Nồng độ testosterone trong máu (nmol/L)
Lô 1: Chứng sinh học	9	1,817 ± 0,491
Lô 2: Mô hình	9	0,120 ± 0,038***
Lô 3: Testosteron 0,4 mg/kg	9	3,098 ± 0,975 <sup>†††</sup>
Lô 4: TD0014 liều 1,8 g/kg	9	0,166 ± 0,031 <sup>†</sup>
Lô 5: TD0014 liều 5,4 g/kg	9	0,366 ± 0,113 <sup>†††</sup>

\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student't-test)

<sup>†</sup> $p < 0,05$ ; <sup>†††</sup> $p < 0,001$  so với lô mô hình (Student't-test)

Số liệu ở bảng 3.15 cho thấy:

- Nồng độ testosterone huyết thanh ở lô mô hình giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học ( $p < 0,001$ ).
- Có sự tăng cao rõ rệt nồng độ testosterone huyết thanh ở lô chuột đực thiếu được tiêm dưới da testosteron liều 0,4 mg/kg/ngày ( $p < 0,001$ ), TD0014 liều 1,8 g được liều/kg ( $p < 0,05$ ) và TD0014 liều 5,4 g được liều/kg ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.2. Hoạt tính androgen của TD0014 trên chuột cống đực non cai sữa

**Bảng 3.16.** Ảnh hưởng của TD0014 lên trọng lượng các cơ quan sinh dục của chuột cống đực non cai sữa

Trọng lượng (mg/100 g thể trọng)	Lô nghiên cứu (n = 10)			
	Chứng sinh học	Testosteron	TD0014 liều thấp	TD0014 liều cao
Tinh hoàn	901,8 ± 180,9	786,5 ± 159,1	891,6 ± 117,9	893,7 ± 162,9
Túi tinh	24,1 ± 6,7	215,8 ± 48,4***	19,5 ± 5,6	21,9 ± 5,7
Mào tinh hoàn	127,6 ± 24,0	252,2 ± 35,4***	130,1 ± 30,0	123,8 ± 22,6
Tuyến tiền liệt	24,4 ± 8,0	100,2 ± 17,6***	21,7 ± 5,1	37,6 ± 7,9**
Tuyến Cowper	3,4 ± 0,7	21,2 ± 3,0***	4,8 ± 1,3**	4,3 ± 0,8*
Cơ nâng hậu môn-hành hang	55,0 ± 11,0	194,6 ± 23,4***	46,0 ± 10,2	70,8 ± 15,4*

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student't-test)

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.16 cho thấy:

- Tiêm dưới da testosterone liều 1,0 mg/kg trong 10 ngày làm tăng rõ rệt trọng lượng của 5 cơ quan sinh dục phụ của chuột cống đực non cai sữa so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ . Trọng lượng tinh hoàn ở lô tiêm testosterone có xu hướng giảm so với lô chứng sinh học, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê.
- Trọng lượng tuyến Cowper của chuột cống đực non cai sữa uống TD0014 liều thấp (1,8 g dược liệu/kg) tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học ( $p < 0,05$ ). TD0014 liều thấp không ảnh hưởng đến trọng lượng của tinh hoàn, túi tinh, mào tinh hoàn, tuyến tiền liệt và cơ nâng hậu môn-hành hang so với lô chứng sinh học ( $p > 0,05$ ).
- Chuột cống đực non cai sữa uống TD0014 liều cao (5,4 g dược liệu/kg) có sự tăng rõ rệt trọng lượng tuyến tiền liệt, tuyến Cowper và cơ nâng hậu môn-hành hang so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$ . TD0014 liều cao không làm thay đổi trọng lượng tinh hoàn, mào tinh hoàn và túi tinh so với lô chứng sinh học ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.17.** Ảnh hưởng của TD0014 lên nồng độ testosterone trong huyết thanh của chuột cống đực non cai sữa

Lô nghiên cứu	n	Nồng độ testosterone trong máu (nmol/L)
Lô 1: Chứng sinh học	10	0,087 ± 0,002
Lô 2: Testosterone 1,0 mg/kg	10	15,343 ± 1,939***
Lô 3: TD0014 liều 1,8 g/kg	10	0,235 ± 0,089***
Lô 4: TD0014 liều 5,4 g/kg	10	0,293 ± 0,062***

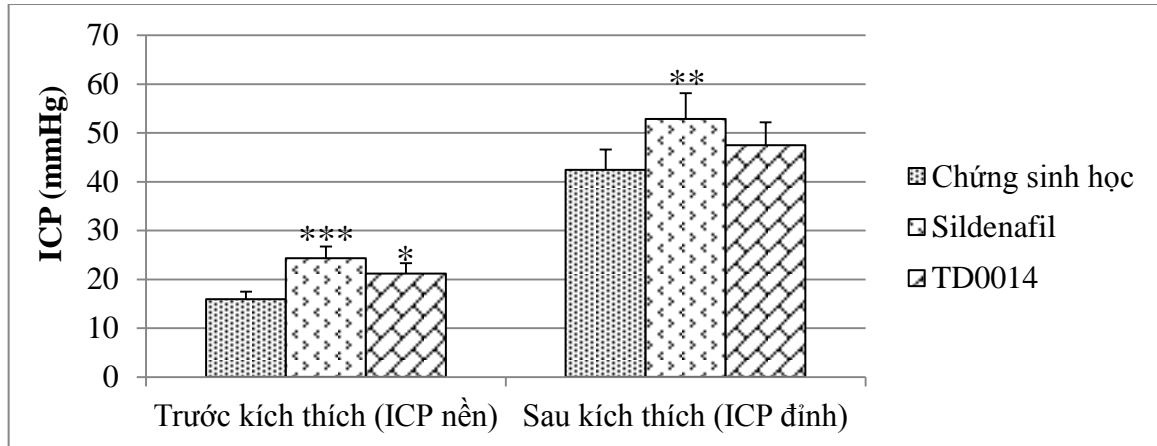
\*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student's t-test)

Từ số liệu ở bảng 3.17 nhận thấy:

- Tiêm dưới da testosterone liều 1,0 mg/kg/ngày trong thời gian 10 ngày làm tăng rõ rệt nồng độ testosterone huyết thanh chuột cống đực non cai sữa khi so sánh với lô chứng sinh học với  $p < 0,001$ .

- TD0014 ở cả hai liều nghiên cứu đều làm tăng có ý nghĩa thống kê nồng độ testosterone trong huyết thanh so với lô chứng sinh học ( $p > 0,001$ ).

### 3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của TD0014 trên áp lực thể hang ở chuột cống đực trưởng thành



\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  so với chứng sinh học (Student's t-test)

**Biểu đồ 3.2.** Áp lực thể hang (ICP) trước và sau khi kích thích điện vào dây thần kinh hang của chuột cống đực trưởng thành

Kết quả ở biểu đồ 3.2 cho thấy:

- Giá trị ICP trước kích thích (giá trị ICP nền) và ICP đỉnh sau kích thích ở lô chuột uống sildenafil liều 6 mg/kg đều tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$  và  $< 0,01$ , tương ứng.
- Chuột cống đực uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg có giá trị ICP nền tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học ( $p < 0,05$ ), giá trị ICP đỉnh sau kích thích có xu hướng tăng nhưng chưa khác biệt so với lô chứng sinh học.

**Bảng 3.18.** Ảnh hưởng của TD0014 đến thời gian đạt đến ICP đỉnh

Lô nghiên cứu (n = 6)	Thời gian đạt đến ICP đỉnh (giây)
Lô 1: chứng sinh học	38,833 ± 20,614
Lô 2: sildenafil liều 6 mg/kg	40,016 ± 18,290
Lô 3: TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	38,819 ± 14,245

Số liệu ở bảng 3.18 cho thấy: không có sự khác biệt về thời gian đạt đến ICP đỉnh ở các lô nghiên cứu ( $p > 0,05$ ).

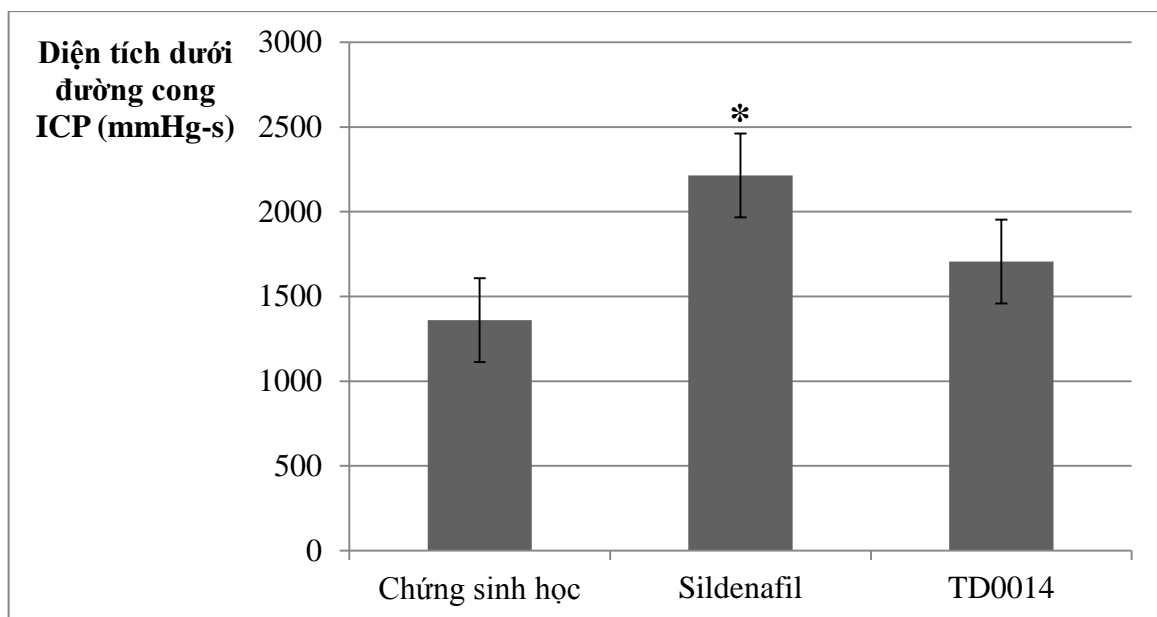
**Bảng 3.19.** Ảnh hưởng của TD0014 đến thời gian đáp ứng với kích thích

Lô nghiên cứu (n = 6)	Thời gian đáp ứng với kích thích (giây)
Lô 1: chứng sinh học	109,441 ± 50,721
Lô 2: sildenafil liều 6 mg/kg	158,902 ± 47,607**
Lô 3: TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	114,196 ± 17,298

\*\* $p < 0,01$  so với chứng sinh học (Mann–Whitney U test)

Số liệu ở bảng 3.19 cho thấy:

- Sildenafil liều 6 mg/kg làm tăng rõ rệt thời gian đáp ứng với kích thích điện vào dây thần kinh hang của chuột cống đực so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,003$ .
- Thời gian đáp ứng với kích thích điện vào dây thần kinh hang của chuột cống đực uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg có xu hướng kéo dài hơn so với lô chứng sinh học, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê ( $p = 0,476$ ).



\* $p < 0,05$  so với chứng sinh học (Mann–Whitney U test)

**Biểu đồ 3.3.** Ảnh hưởng của TD0014 đến diện tích dưới đường cong ICP

Số liệu ở biểu đồ 3.3 cho thấy:

- Sildenafil liều 6 mg/kg làm tăng rõ rệt diện tích dưới đường cong ICP so với lô chứng sinh học ( $p = 0,010$ ).
- Diện tích dưới đường cong ở lô chuột cống đực uống TD0014 liều 1,8 g được liệu/kg có xu hướng tăng so với lô chứng sinh học, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,094$ .

**Bảng 3.20.** Ảnh hưởng của TD0014 đến huyết áp động mạch trung bình sau kích thích điện lên dây thần kinh hang

Lô nghiên cứu (n = 6)	MAP (mmHg)	ICP đỉnh/MAP
Lô 1: chứng sinh học	106,34 ± 18,08	0,40 ± 0,11
Lô 2: sildenafil liều 6 mg/kg	96,43 ± 13,76	0,56 ± 0,14***
Lô 3: TD0014 liều 1,8 g được liệu/kg	110,67 ± 5,05	0,44 ± 0,09

\* $p < 0,001$  so với chứng sinh học (Student's t-test)

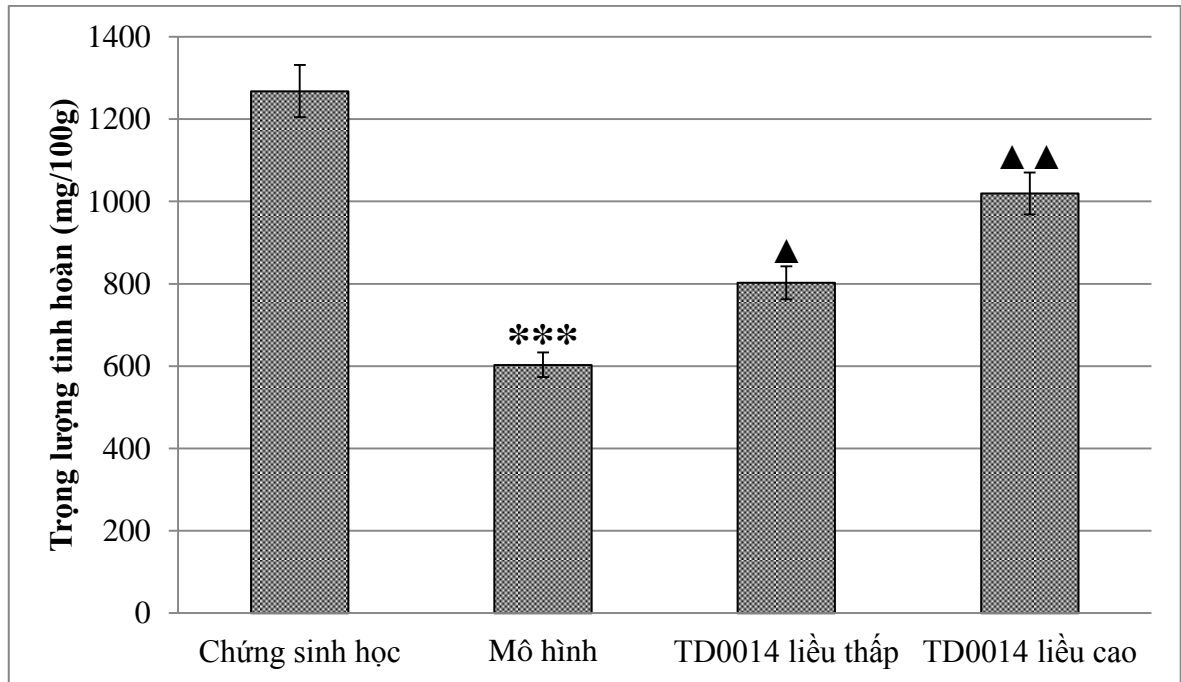
Kết quả ở bảng 3.20 cho thấy:

- Lô chuột đực uống sildenafil 6 mg/kg: giá trị huyết áp động mạch trung bình giảm nhẹ so với lô chứng sinh học, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Tỷ số ICP đỉnh/MAP tăng cao đáng kể so với lô chứng sinh học với  $p < 0,001$ .
- Lô chuột đực uống TD0014 liều 1,8 g được liệu/kg: không có sự khác biệt về giá trị huyết áp động mạch trung bình và tỷ lệ ICP đỉnh/MAP so với lô chứng sinh học ( $p > 0,05$ ).

### 3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của TD0014 trên chuột cống trắng bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

#### 3.4.1. Tác dụng bảo vệ của TD0014 trên chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

##### 3.4.1.1. Ảnh hưởng của TD0014 đến cấu trúc và chức năng của tinh hoàn



\*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student's t-test)

▲ $p < 0,05$ ; ▲▲ $p < 0,01$  so với lô mô hình (Student's t-test)

**Biểu đồ 3.4.** Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng tinh hoàn của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Số liệu ở biểu đồ 3.4 cho thấy:

- Natri valproat liều 500 mg/kg uống liên tục trong 7 tuần làm giảm rõ rệt trọng lượng tinh hoàn của chuột cống đực ở lô mô hình so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .
- Chuột cống đực ở các lô uống TD0014 đồng thời với uống natri valproat 500 mg/kg trong 7 tuần có sự cải thiện rõ rệt trọng lượng tinh hoàn so với lô mô hình. Mức tăng trọng lượng tinh hoàn ở các lô uống TD0014 liều 1,8 g được/liều/kg/ngày và liều 5,4 g được/liều/kg/ngày khác biệt so với lô mô hình với giá trị  $p$  tương ứng là  $< 0,05$  và  $< 0,01$ .



**Bảng 3.21.** Ảnh hưởng của TD0014 đến kích thước ống sinh tinh của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô nghiên cứu	n	Kích thước ống sinh tinh (pixell)
Lô 1: Chứng sinh học	6	452,74 ± 55,12
Lô 2: Mô hình	6	326,09 ± 38,81***
Lô 3: TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	6	371,97 ± 25,62 <sup>▲</sup>
Lô 4: TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	6	462,20 ± 58,25 <sup>▲▲▲</sup>

\*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student 't-test)

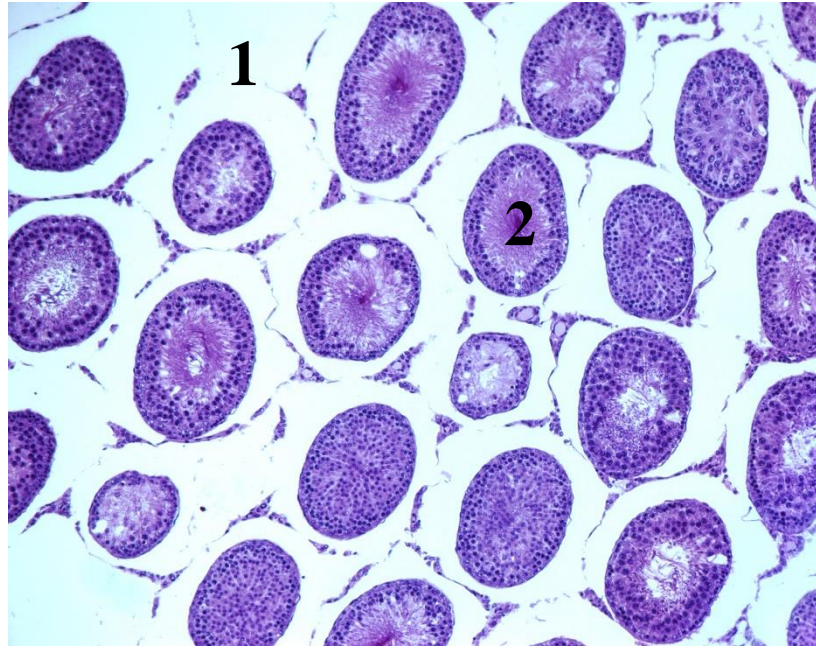
<sup>▲</sup> $p < 0,05$ ; <sup>▲▲▲</sup> $p < 0,001$  so với lô mô hình (Student 't-test)

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.21 cho thấy:

- Lô mô hình: chuột cống đực uống natri valproat 500 mg/kg liên tục 7 tuần có kích thước ống sinh tinh giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .
- Lô uống TD0014: chuột cống đực uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày (lô 3) và TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày (lô 4) có kích thước ống sinh tinh tăng đáng kể so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị  $p$  tương ứng là  $< 0,05$  và  $< 0,001$

**Bảng 3.22.** Mô học tinh hoàn của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

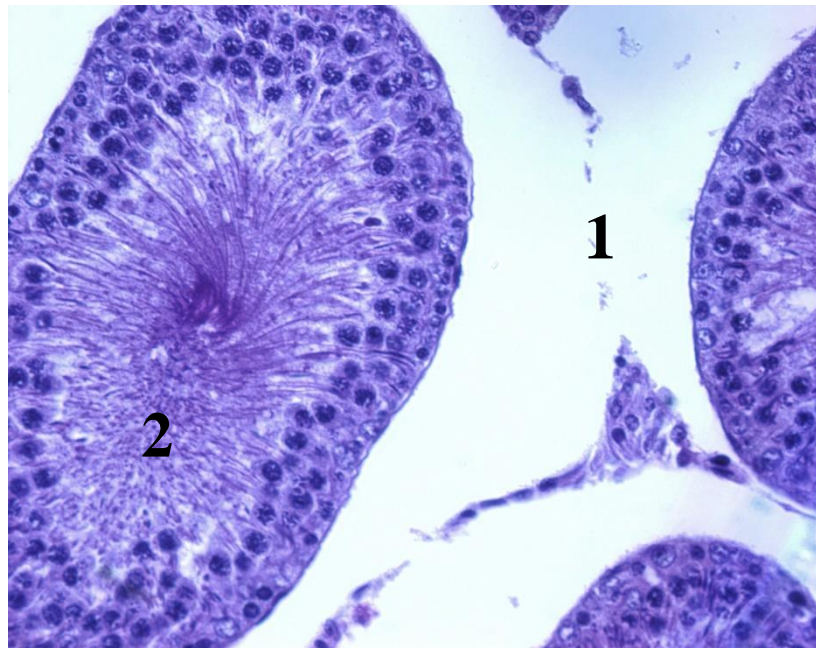
Lô	Mô học tinh hoàn
<i>Chứng sinh học</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Các ống sinh tinh tròn căng, có vỏ xơ mỏng. Đa số các ống có lòng hẹp và chứa nhiều tinh trùng.</li> <li>- Biểu mô tinh dày, có đủ các loại tế bào dòng tinh: tinh nguyên bào, tinh bào, tiền tinh trùng, và tinh trùng. Các tế bào có nhân rõ, ranh giới bào tương không rõ. Tỷ lệ các tế bào dòng tinh khác nhau ở các ống sinh tinh.</li> <li>- Mô kẽ thưa thớt, các mạch máu trong mô kẽ nhỏ.</li> </ul>
<i>Mô hình</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Trong tinh hoàn không có biểu hiện của viêm nhiễm</li> <li>- Các ống sinh tinh có kích thước nhỏ, lòng rộng, biểu mô tinh mỏng, số lượng các tế bào dòng tinh rất khác nhau ở các chuột:               <ul style="list-style-type: none"> <li>+ 2/6 mẫu tinh hoàn có đầy đủ các loại tế bào dòng tinh</li> <li>+ 3/6 mẫu tinh hoàn trong biểu mô tinh không có tiền tinh trùng và tinh trùng</li> <li>+ 1/6 mẫu tinh hoàn chỉ có tế bào Sertoli và tinh nguyên bào trên thành ống sinh tinh.</li> </ul> </li> <li>- Mô kẽ có hiện tượng xung huyết và ứ dịch.</li> </ul>
<i>TD0014 liều 1,8 g được liệu/kg</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Trong tinh hoàn không có biểu hiện của viêm nhiễm</li> <li>- Các ống sinh tinh của các chuột ở trạng thái đa dạng.               <ul style="list-style-type: none"> <li>+ 3/6 mẫu tinh hoàn có biểu mô tinh bình thường.</li> <li>+ 3/6 mẫu tinh hoàn có lòng ống sinh tinh có ít tinh trùng, một số có biểu mô tinh mỏng, một số có biểu mô tinh thoái hóa.</li> </ul> </li> <li>- Mô kẽ của đa số chuột không xung huyết, ứ dịch.</li> </ul>
<i>TD0014 liều 5,4 g được liệu/kg</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Trong tinh hoàn không có biểu hiện của viêm nhiễm</li> <li>- Các ống sinh tinh của các chuột ở trạng thái đa dạng.               <ul style="list-style-type: none"> <li>+ 5/6 mẫu tinh hoàn có ống sinh tinh cấu tạo bình thường: ống căng tròn, lòng hẹp, biểu mô tinh đầy đủ các tế bào dòng tinh.</li> <li>+ 1/6 mẫu tinh hoàn có một số ống sinh tinh bị thoái hóa, lòng ống ít tinh trùng.</li> </ul> </li> <li>- Mô kẽ của đa số chuột không xung huyết, ứ dịch.</li> </ul>



**Hình 3.1.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô chứng sinh học (HE x 250)

1 – Mô kẽ

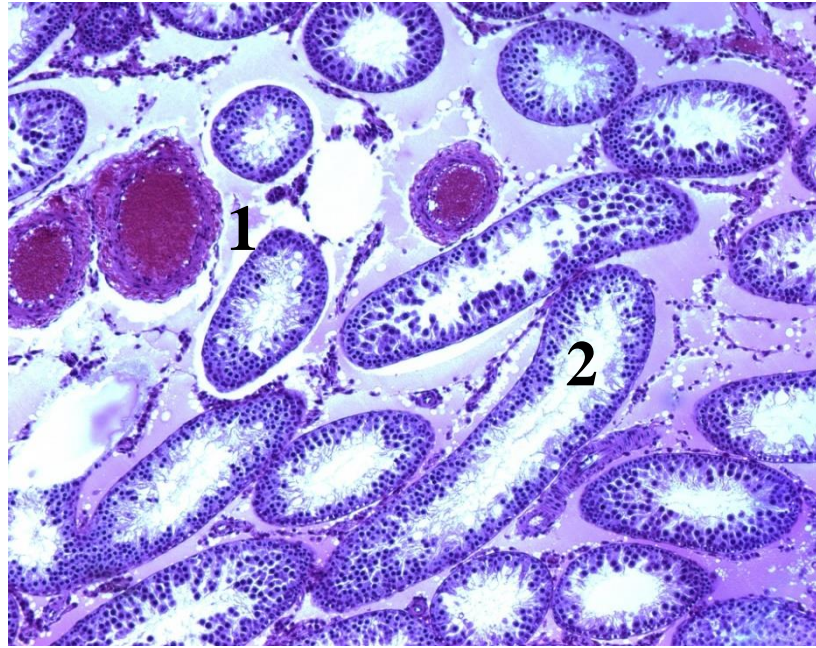
2 – Ống sinh tinh



**Hình 3.2.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô chứng sinh học (HE x 1000)

1 – Mô kẽ

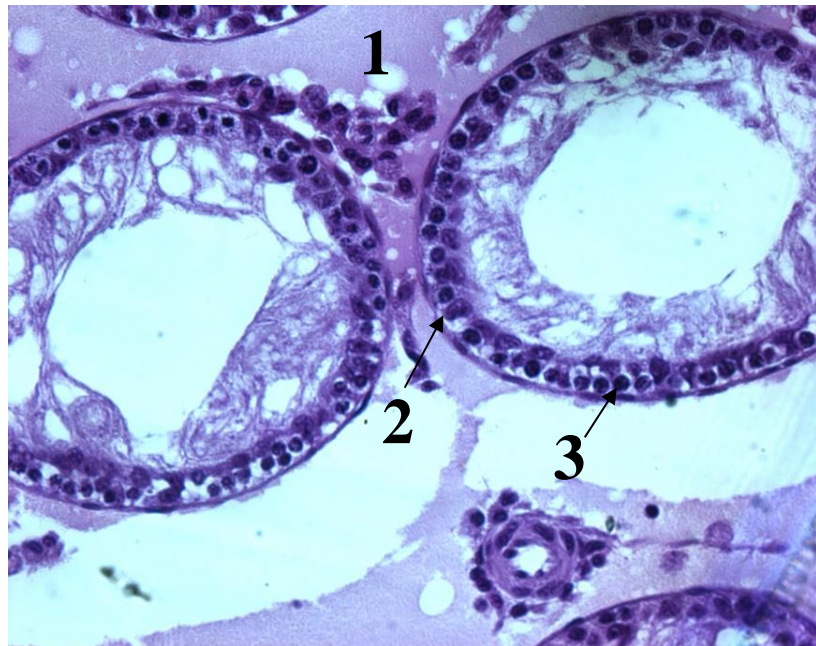
2 – Ống sinh tinh



**Hình 3.3.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô mô hình (HE x 250)

1 – Mô kẽ ứ dịch, sung huyết

2 - Ống sinh tinh lòng rộng



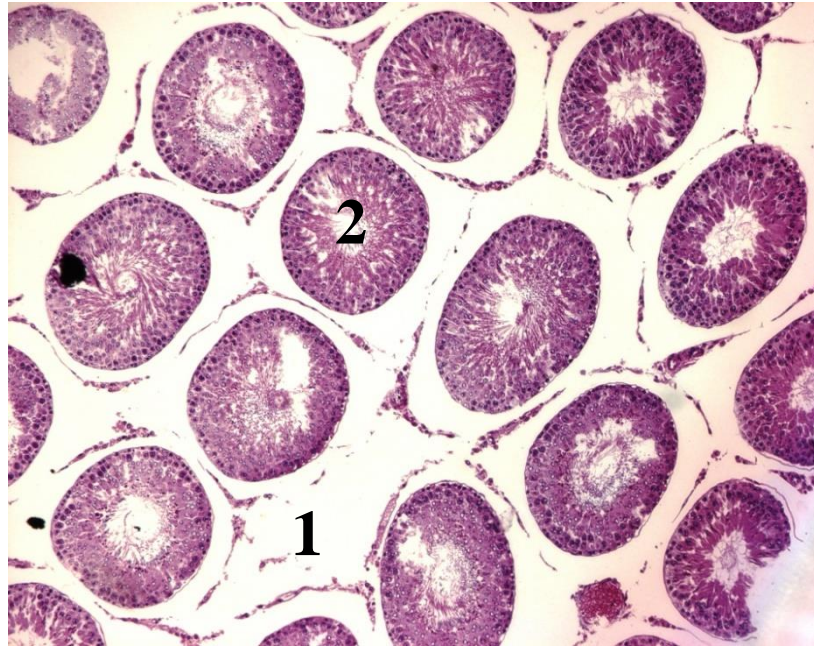
**Hình 3.4.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô mô hình (HE x 1000)

1 – Mô kẽ sung huyết

2 – Tế bào Sertoli

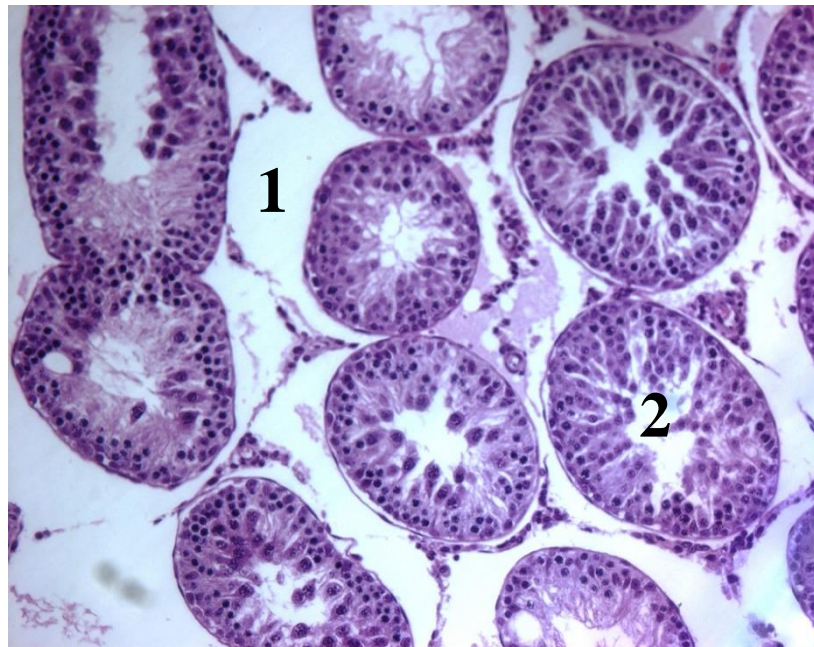
3 – Tinh nguyên bào





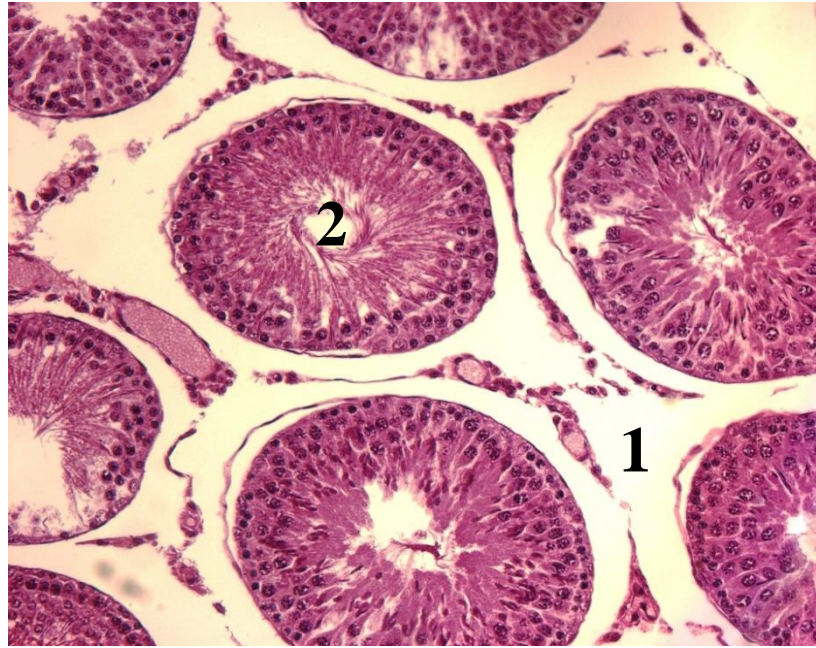
**Hình 3.5.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg  
(HE x 250)

1 – Mô kẽ      2 – Ống sinh tinh bình thường



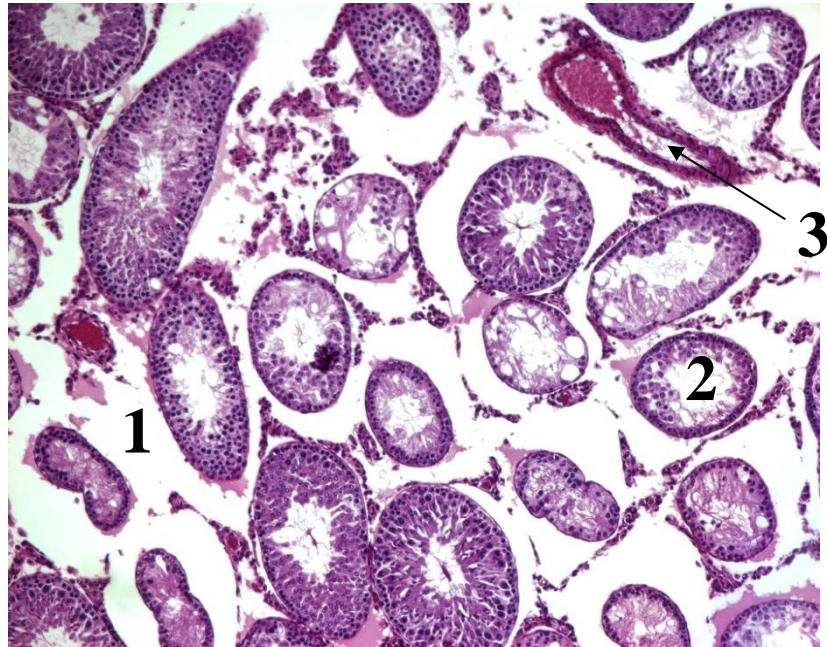
**Hình 3.6.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg  
(HE x 500)

1 – Mô kẽ      2 – Ống sinh tinh lòng rộng, không có tiền tinh trùng và tinh trùng



**Hình 3.7.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg  
(HE x 500)

1 – Mô kẽ      2 – Ống sinh tinh bình thường



**Hình 3.8.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg  
(HE x 250)

1 – Mô kẽ      2 – Lòng ống sinh tinh ít tinh trùng      3 – Động mạch

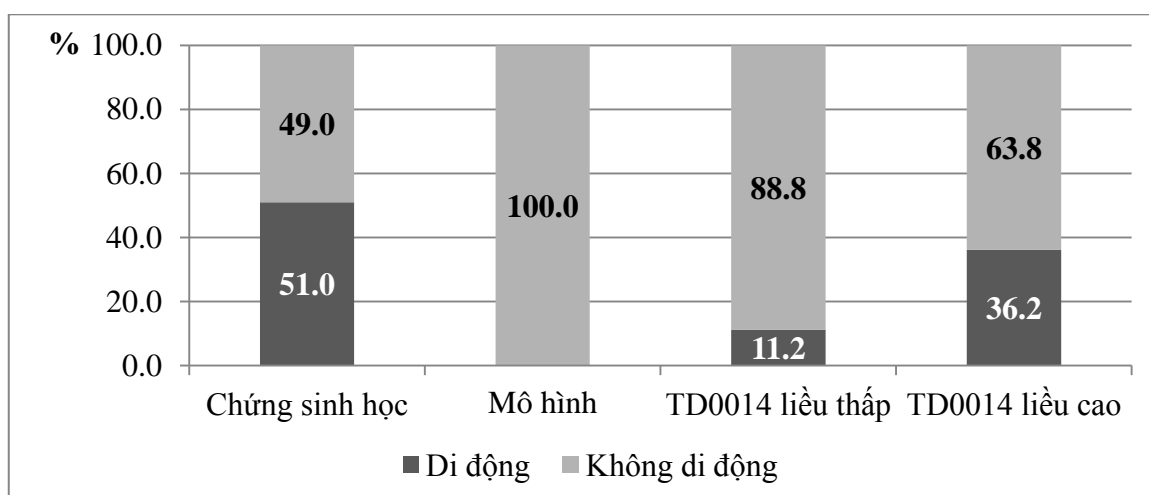
**Bảng 3.23.** Ảnh hưởng của TD0014 đến mật độ và tỷ lệ tinh trùng sống của tinh trùng của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô nghiên cứu	n	Mật độ tinh trùng ( $10^6$ /mL)	Tỷ lệ sống của tinh trùng (%)
Chứng sinh học	8	144,74 ± 18,73	93,71 ± 2,50
Mô hình	6	3,83 ± 1,17***	59,83 ± 12,73***
TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	6	18,33 ± 5,85▲▲▲	51,67 ± 15,11
TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	10	106,20 ± 33,13▲▲▲	88,70 ± 6,18▲▲▲

\*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student 't-test); ▲▲▲ $p < 0,001$  so với lô mô hình (Student 't-test)

Kết quả ở bảng 3.23 cho thấy:

- Mật độ tinh trùng và tỷ lệ tinh trùng sống của chuột cống đực ở lô mô hình giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ( $p < 0,001$ )
- TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày có tác dụng cải thiện mật độ tinh trùng so với lô mô hình ( $p < 0,001$ ), tuy nhiên chưa cải thiện được tỷ lệ sống của tinh trùng so với lô mô hình ( $p > 0,05$ ).
- TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày làm tăng cả mật độ tinh trùng và tỷ lệ sống của tinh trùng so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .

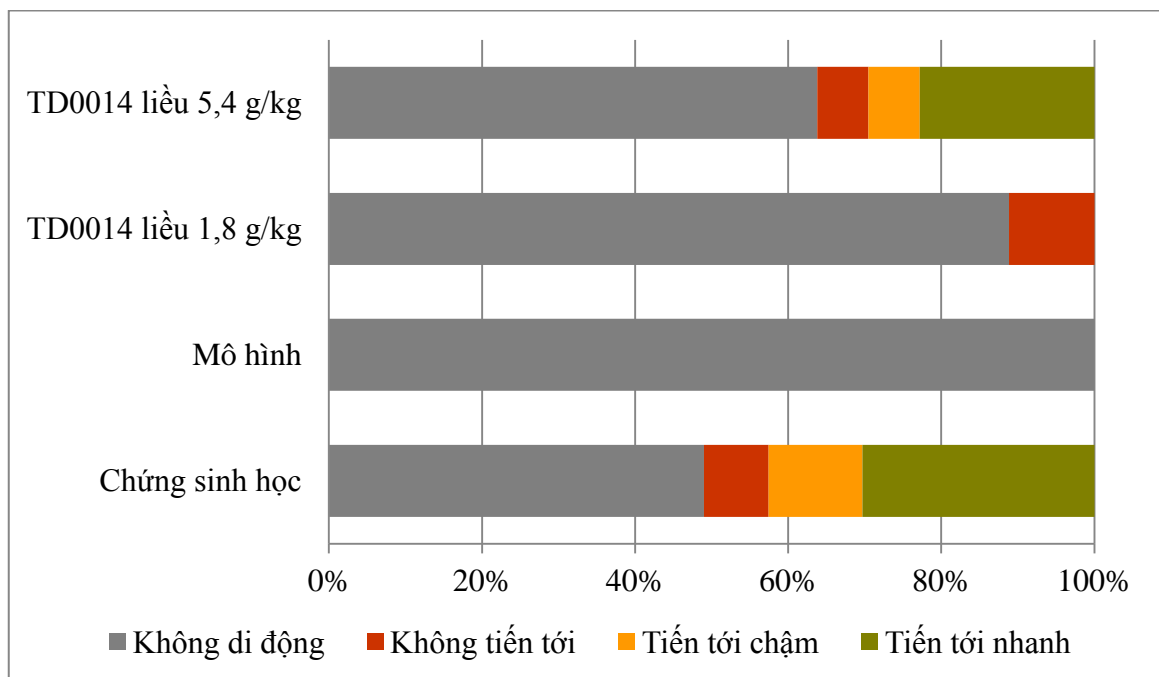


**Biểu đồ 3.5.** Ảnh hưởng của TD0014 đến độ di động tinh trùng của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Số liệu ở biểu đồ 3.5 cho thấy:



- Không có hiện tượng di động của tinh trùng của các chuột cống đực ở lô mô hình được uống natri valproat liều 500 mg/kg liên tục trong 7 tuần.
- Có sự cải thiện về mức độ di động tinh trùng của chuột cống đực ở các lô uống TD0014 so với lô mô hình. Tỷ lệ tinh trùng di động của chuột cống đực ở lô uống TD0014 liều 1,8 g được liệu là 11,2%, ở lô uống TD0014 liều 5,4 g được liệu/kg/ngày là 36,2%.



**Biểu đồ 3.6.** Ảnh hưởng của TD0014 lên khả năng tiến tới của tinh trùng của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Kết quả ở biểu đồ 3.6 cho thấy:

- Lô uống TD0014 liều thấp: so với lô mô hình không có tinh trùng di động, tinh dịch của chuột cống đực uống TD0014 liều 1,8 g được liệu/kg/ngày đã có các tinh trùng di động, tuy nhiên các tinh trùng chỉ di động tại chỗ, không có hoạt động tiến tới.
- Lô uống TD0014 liều cao: đã có sự cải thiện rõ độ di động của tinh trùng so với lô mô hình, tinh trùng của chuột cống đực uống TD0014 liều 5,4 g được liệu/kg/ngày đã có các hoạt động tiến tới nhanh, tiến tới chậm và có các tinh trùng di động tại chỗ.



**Bảng 3.24.** Ảnh hưởng của TD0014 lên hình thái tinh trùng của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô nghiên cứu	n	Tỷ lệ bình thường (%)	Tỷ lệ bất thường (%)		
			Đầu	Cổ	Đuôi
Chứng sinh học	8	59,00 ± 6,98	14,57 ± 4,20	10,00 ± 1,63	16,43 ± 5,32
Mô hình	6	29,17 ± 1,17 ***	31,33 ± 6,98 ***	20,83 ± 3,76 ***	18,67 ± 3,44
TD0014 liều 1,8 g được liệu/kg	6	37,83 ± 11,07	24,17 ± 5,38	14,50 ± 3,39 <sup>▲</sup>	23,50 ± 6,41
TD0014 liều 5,4 g được liệu/kg	10	40,90 ± 12,62 <sup>▲</sup>	18,70 ± 5,03 ▲▲▲	16,00 ± 4,64 <sup>▲</sup>	24,40 ± 7,12

\*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student 't-test)

<sup>▲</sup> $p < 0,05$ ; <sup>▲▲▲</sup> $p < 0,001$  so với lô mô hình (Student 't-test)

Số liệu ở bảng 3.24 cho thấy:

- Chuột ở lô mô hình (lô 2) có tỷ lệ tinh trùng bình thường giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học (lô 1) ( $p < 0,001$ ), đồng thời tỷ lệ tinh trùng bất thường tăng cao hơn so với lô chứng sinh học, trong đó tỷ lệ bất thường đầu và cổ là tăng có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .
- Chuột ở lô uống TD0014 liều thấp có tỷ lệ tinh trùng bình thường cao hơn so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê; tỷ lệ tinh trùng bất thường đầu và cổ đã giảm so với lô mô hình, trong đó tỷ lệ bất thường cổ giảm có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình; tỷ lệ tinh trùng bất thường đuôi không có sự khác biệt so với lô mô hình.
- Chuột ở lô uống TD0014 liều cao có tỷ lệ tinh trùng bình thường tăng cao đáng kể so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ); tỷ lệ tinh trùng bất thường đầu và cổ giảm rõ rệt so với lô mô hình với giá trị  $p$  lần lượt là  $< 0,001$  và  $< 0,05$ ; không có sự khác biệt về tỷ lệ tinh trùng bất thường đuôi so với lô mô hình.

**Bảng 3.25.** Ảnh hưởng của TD0014 lên nồng độ testosterone trong máu ở chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô nghiên cứu	n	Nồng độ testosterone (nmol/L)
Lô 1: Chứng sinh học	8	4,17 ± 1,22
Lô 2: Mô hình	6	1,35 ± 0,44***
Lô 3: TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	6	4,30 ± 1,10 <sup>▲▲▲</sup>
Lô 4: TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	10	5,64 ± 1,03 <sup>▲▲▲#</sup>

\*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student't-test); ▲▲▲ $p < 0,001$  so với lô mô hình (Student't-test);

# $p < 0,05$  so với lô TD0014 liều thấp (Student't-test)

Kết quả ở bảng 3.25 cho thấy:

- Natri valproat liều 500 mg/kg uống liên tục trong 7 tuần làm giảm rõ rệt nồng độ testosterone so với lô chứng sinh học ( $p < 0,001$ ).
- TD0014 ở cả hai mức liều nghiên cứu đều làm tăng rõ rệt nồng độ testosterone trong huyết thanh so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ . TD0014 liều cao thể hiện tác dụng làm tăng nồng độ testosterone trong máu tốt hơn liều thấp ( $p < 0,05$ ).

#### 3.4.1.2. Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ

**Bảng 3.26.** Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng mào tinh, đầu dương vật và cơ nâng hậu môn-hành hang của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô nghiên cứu	n	Trọng lượng cơ quan sinh dục (mg/100g thể trọng)		
		Mào tinh	Đầu dương vật	Cơ nâng
Chứng sinh học	8	371,06 ± 43,06	51,29 ± 10,72	252,18 ± 68,00
Mô hình	6	175,40 ± 33,83***	39,25 ± 4,33*	162,71 ± 36,97*
TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	6	268,41 ± 63,37 <sup>▲▲</sup>	50,62 ± 12,23 <sup>▲</sup>	167,18 ± 33,68
TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	10	281,92 ± 57,25 <sup>▲▲▲</sup>	54,43 ± 9,63 <sup>▲▲</sup>	190,51 ± 40,73

\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student't-test)

▲ $p < 0,05$ ; ▲▲ $p < 0,01$ ; ▲▲▲ $p < 0,001$  so với lô mô hình (Student't-test)

Kết quả ở bảng 3.26 cho thấy:

- Uống natri valproat liên tục trong 7 tuần gây giảm rõ rệt trọng lượng não tinh, đầu dương vật và cơ nâng hậu môn-hành hang ở lô mô hình so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$  và  $p < 0,05$ .
- TD0014 ở cả hai mức liều nghiên cứu đều có tác dụng làm tăng có ý nghĩa thống kê trọng lượng não tinh và đầu dương vật so với lô mô hình với các giá trị  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$ .
- Trọng lượng cơ nâng hậu môn-hành hang của chuột cống đực ở các lô uống TD0014 có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

**Bảng 3.27.** Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng các tuyến sinh dục phụ của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô nghiên cứu	n	Trọng lượng các tuyến sinh dục phụ (mg/100g thể trọng)		
		<i>Túi tinh</i>	<i>Tuyến tiền liệt</i>	<i>Tuyến Cowper</i>
Chứng sinh học	8	110,52 ± 29,81	69,42 ± 21,24	17,17 ± 1,66
Mô hình	6	65,45 ± 18,64**	32,61 ± 8,73**	14,62 ± 2,13*
TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	6	70,27 ± 6,73**	33,60 ± 7,89**	16,59 ± 3,93
TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	10	92,22 ± 24,69 <sup>▲</sup>	40,59 ± 7,65***	18,02 ± 2,66 <sup>▲</sup>

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student't-test)

<sup>▲</sup> $p < 0,05$  so với lô mô hình (Student't-test)

Kết quả ở bảng 3.27 cho thấy:

- Chuột cống đực ở lô mô hình uống natri valproat 500 mg/kg trong 7 tuần liên tục có trọng lượng các tuyến sinh dục phụ (túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper) giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ( $p < 0,05$  và  $p < 0,01$ )

- Chuột ở lô uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày (lô 3) có trọng lượng các tuyến sinh dục phụ có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).
- Chuột ở lô uống TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày (lô 4)
  - + Trọng lượng túi tinh và tuyến Cowper tăng rõ rệt so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ).
  - + Trọng lượng tuyến tiền liệt có xu hướng tăng nhưng chưa có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ( $p > 0,05$ )

### 3.4.1.3. Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng gan, thận, tuyến thượng thận

**Bảng 3.28.** Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng gan, thận, tuyến thượng thận của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô nghiên cứu	n	Gan (g/100g thể trọng)	Thận (g/100g thể trọng)	Tuyến thượng thận (mg/100g thể trọng)
Chứng sinh học	8	3,30 ± 0,25	0,61 ± 0,04	18,02 ± 2,55
Mô hình	6	2,72 ± 0,51*	0,55 ± 0,05*	12,89 ± 3,01**
TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	6	2,95 ± 0,65	0,64 ± 0,11	25,64 ± 8,26 <sup>▲▲</sup>
TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	10	2,54 ± 0,17	0,58 ± 0,07	24,04 ± 4,31 <sup>▲▲▲</sup>

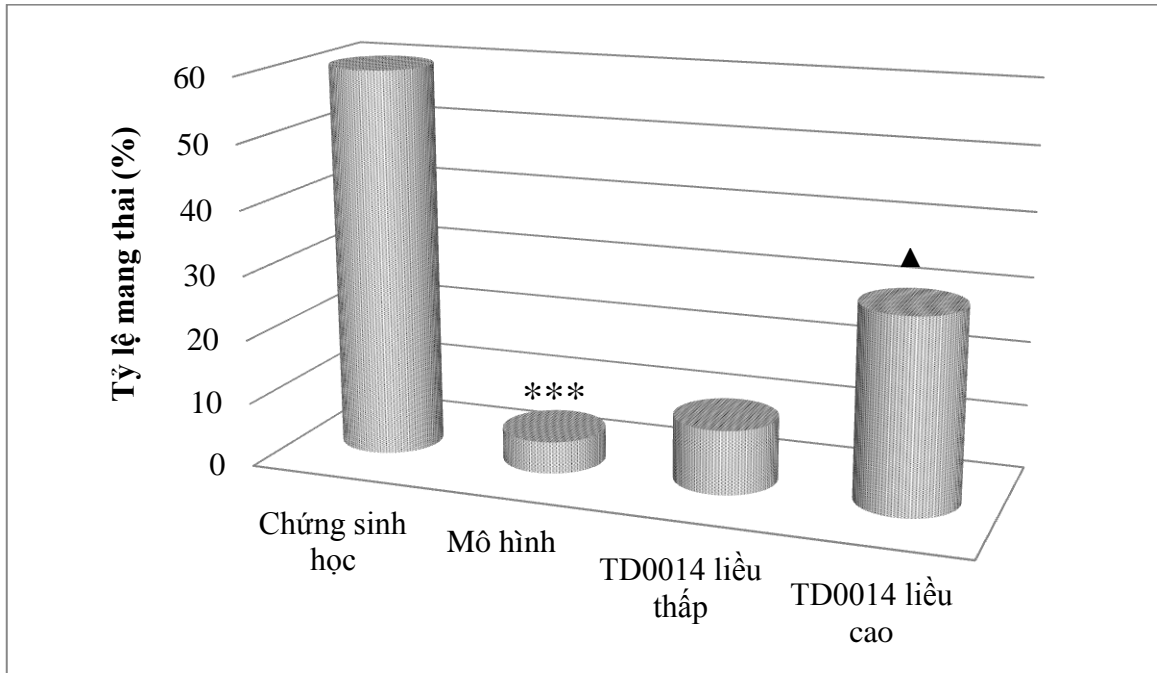
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  so với lô chứng sinh học (Student 't-test)

▲▲ $p < 0,01$ ; ▲▲▲ $p < 0,001$  so với lô mô hình (Student 't-test)

Kết quả ở bảng 3.28 cho thấy:

- Chuột cống đực ở lô mô hình (lô 2) uống natri valproat 500 mg/kg liên tục 7 tuần có giảm rõ rệt trọng lượng gan, thận và tuyến thượng thận so với lô chứng sinh học với  $p < 0,05$ .
- TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày và 5,4 g dược liệu/kg/ngày không làm thay đổi trọng lượng gan và thận của chuột cống đực so với lô mô hình ( $p > 0,05$ )
- TD0014 ở cả hai mức liều nghiên cứu đều làm tăng rõ rệt trọng lượng của tuyến thượng thận so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$ .

### 3.4.1.4. Ảnh hưởng của TD0014 đến các chỉ số nghiên cứu trên chuột cống cái



\*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Chi-square test)

^ $p < 0,05$  so với lô mô hình (Chi-square test)

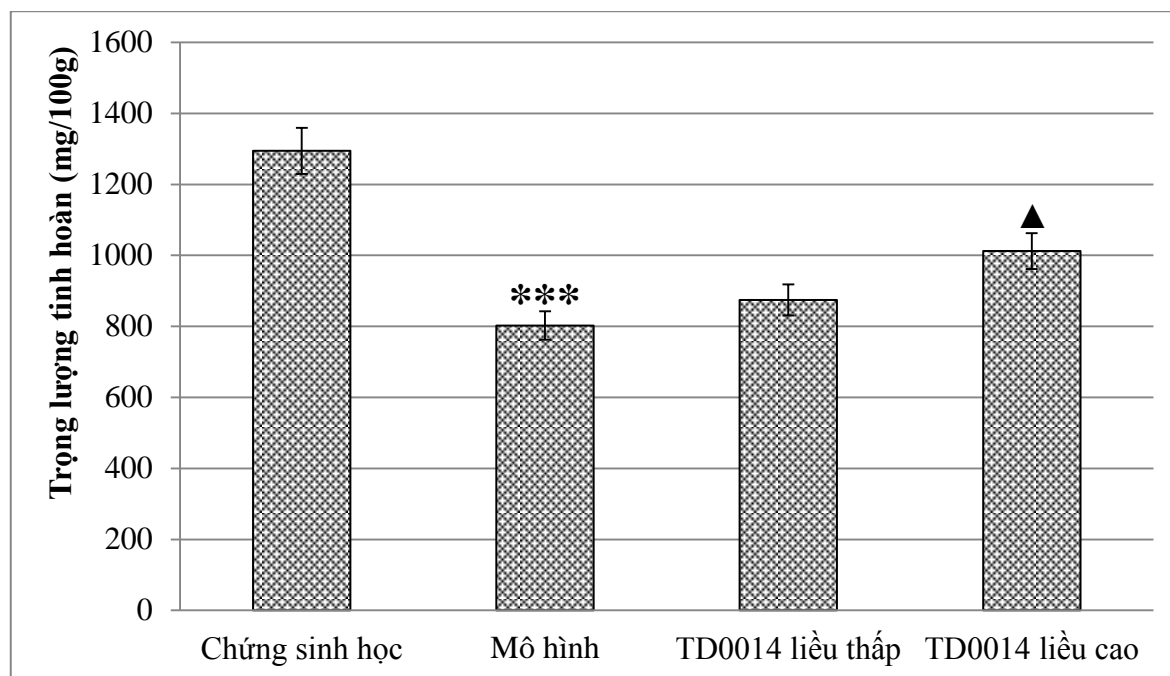
**Biểu đồ 3.7.** Ảnh hưởng của TD0014 đến tỷ lệ mang thai của chuột cống cái

Số liệu ở biểu đồ 3.7 cho thấy:

- Lô mô hình (chuột đực uống natri valproat 500 mg/kg trong 7 tuần liên tục, không dùng thuốc gì): ở lô mô hình chỉ có 1/20 chuột cái mang thai (tỷ lệ mang thai là 5%) và giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học (60%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p(X > \chi^2) = 0,000 < \alpha = 0,05$ .
- Lô TD0014 liều thấp (chuột đực uống natri valproat 500 mg/kg đồng thời với TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày liên tục trong 7 tuần): không có sự khác biệt về tỷ lệ chuột cái mang thai ở lô TD0014 liều thấp (10%) và lô mô hình (5%) ( $p(X > \chi^2) = 0,548 > \alpha = 0,05$ ).
- Lô TD0014 liều cao (chuột đực uống natri valproat 500 mg/kg đồng thời với TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày liên tục trong 7 tuần): tỷ lệ chuột cái mang thai ở lô TD0014 liều cao (30%) cao hơn rõ rệt so với lô mô hình (5%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p(X > \chi^2) = 0,037 < \alpha = 0,05$ .

### 3.4.2. Tác dụng phục hồi của TD0014 trên chuột cống đực gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

#### 3.4.2.1. Ảnh hưởng của TD0014 đến cấu trúc và chức năng của tinh hoàn



\*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student 't-test)

▲ $p < 0,05$  so với lô mô hình (Student 't-test)

**Biểu đồ 3.8.** Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng tinh hoàn của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Số liệu ở biểu đồ 3.8 cho thấy:

- Natri valproat liều 500 mg/kg uống liên tục trong 7 tuần làm giảm rõ rệt trọng lượng tinh hoàn của chuột cống đực ở lô mô hình so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .
- TD0014 liều thấp (1,8 g dược liệu/kg/ngày) uống liên tục trong 10 ngày có xu hướng làm tăng trọng lượng tinh hoàn của chuột cống đực đã bị gây SGSS bằng uống NVP 500 mg/kg trong 7 tuần so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).
- TD0014 liều cao (5,4 g dược liệu/kg/ngày) uống liên tục trong 10 ngày có tác dụng làm tăng có ý nghĩa thống kê trọng lượng tinh hoàn của chuột cống đực đã bị gây SGSS bằng uống NVP 500 mg/kg trong 7 tuần so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ).

**Bảng 3.29.** Ảnh hưởng của TD0014 đến kích thước ống sinh tinh của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô nghiên cứu	n	Kích thước ống sinh tinh (pixell)
Lô 1: Chứng sinh học	6	429,70 ± 20,00
Lô 2: Mô hình	6	380,87 ± 15,20***
Lô 3: TD0014 liều 1,8 g đực liệu/kg	6	405,82 ± 21,57 <sup>▲</sup>
Lô 4: TD0014 liều 5,4 g đực liệu/kg	6	405,70 ± 15,84 <sup>▲</sup>

\*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student't-test)

<sup>▲</sup> $p < 0,05$  so với lô mô hình (Student't-test)

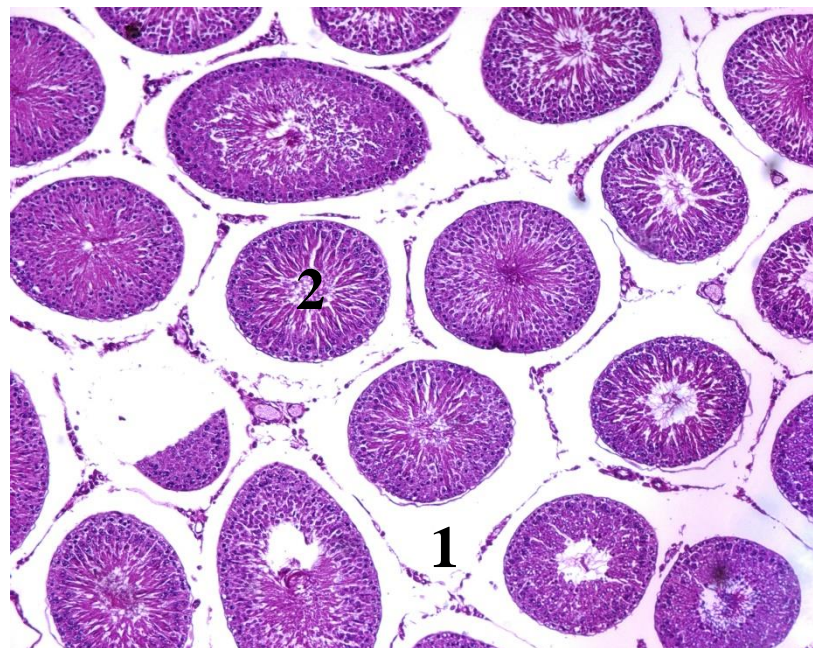
Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.29 cho thấy:

- Lô mô hình: chuột cống đực uống natri valproat 500 mg/kg liên tục 7 tuần có giảm rõ rệt kích thước ống sinh tinh so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .
- Lô uống TD0014: chuột cống đực uống TD0014 ở cả 2 mức liều nghiên cứu liên tục trong 10 ngày có kích thước ống sinh tinh tăng rõ rệt so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

**Bảng 3.30.** Ảnh hưởng của TD0014 đến mô học tinh hoàn của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô	Mô học tinh hoàn
<i>Chứng sinh học</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Các ống sinh tinh tròn căng, có vỏ xơ mỏng. Đa số các ống có lòng hẹp và chứa nhiều tinh trùng.</li> <li>- Biểu mô tinh dày, có đủ các loại tế bào dòng tinh: tinh nguyên bào, tinh bào, tiền tinh trùng, và tinh trùng. Các tế bào có nhân rõ, ranh giới bào tương không rõ. Tỷ lệ các tế bào dòng tinh khác nhau ở các ống sinh tinh.</li> <li>- Mô kẽ thưa thớt, các mạch máu trong mô kẽ nhỏ.</li> </ul>
<i>Mô hình</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Trong tinh hoàn không có biểu hiện của viêm nhiễm</li> <li>- 3/6 mẫu tinh hoàn có hiện tượng ứ dịch nhẹ trong mô kẽ ngay dưới</li> </ul>

Lô	Mô học tinh hoàn
	vỏ xơ, biểu mô tinh có ít tinh trùng. - 3/6 mẫu tinh hoàn có cấu trúc bình thường, không ứ dịch, biểu mô tinh có đầy đủ các tế bào dòng tinh
<i>TD0014</i> <i>liều thấp</i>	- Trong tinh hoàn không có biểu hiện của viêm nhiễm - 4/6 mẫu tinh hoàn có biểu mô tinh dày với đầy đủ các loại tế bào dòng tinh. - 2/6 mẫu tinh hoàn có ứ dịch nhẹ ở mô kẽ dưới vỏ xơ, lòng ống sinh tinh có ít tinh trùng.
<i>TD0014</i> <i>liều cao</i>	- Trong tinh hoàn không có biểu hiện của viêm nhiễm - 4/6 mẫu tinh hoàn có biểu mô tinh dày với đầy đủ các loại tế bào dòng tinh. - 2/6 mẫu tinh hoàn trong biểu mô tinh có ít tinh trùng.

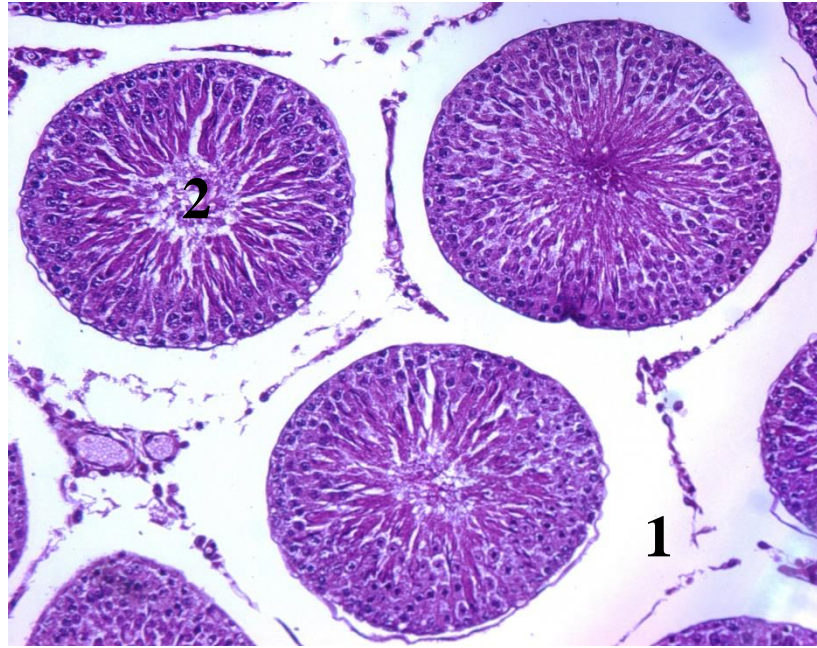


**Hình 3.9.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô chứng sinh học (HE x 250)

1 – Mô kẽ

2 – Ống sinh tinh

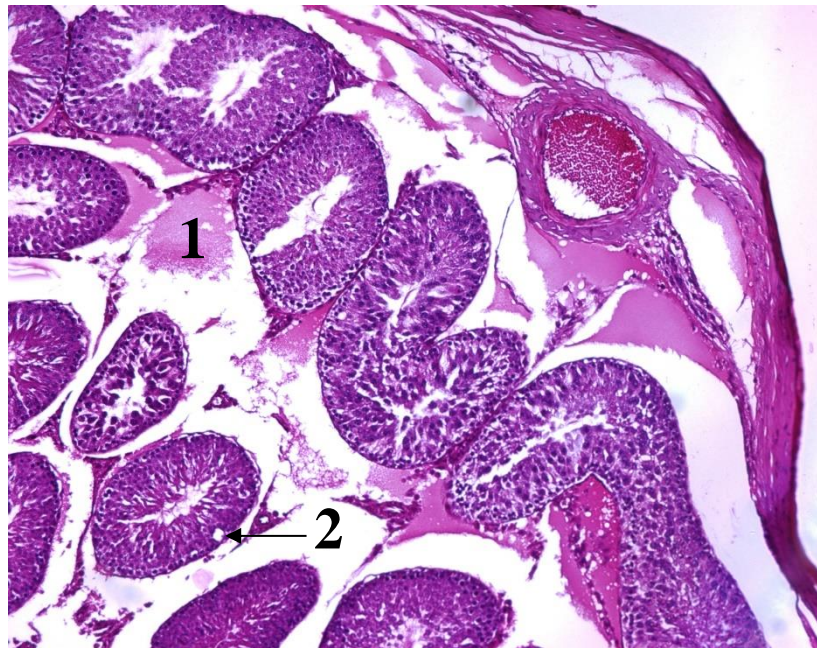




**Hình 3.10.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô chứng sinh học (HE x 500)

1 – Mô kẽ

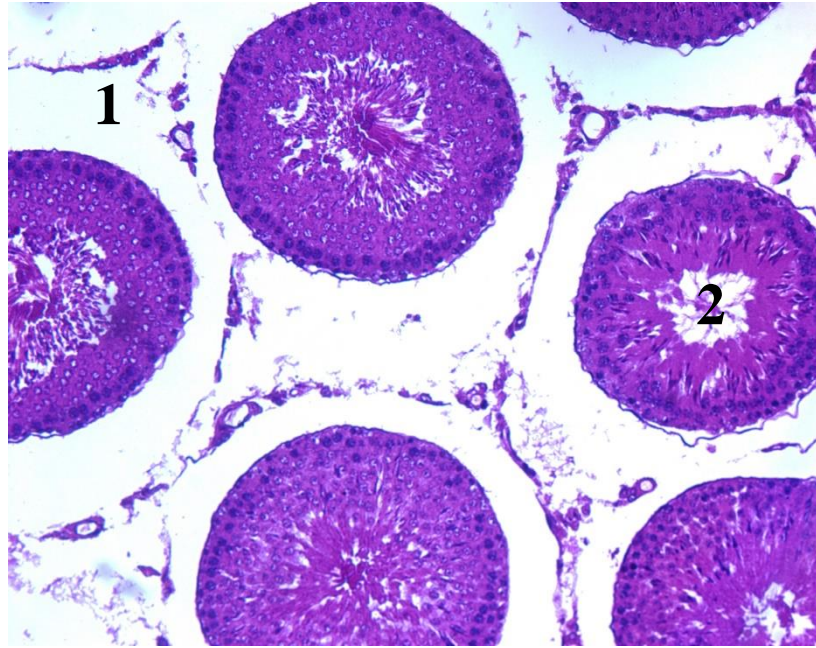
2 – Ống sinh tinh



**Hình 3.11.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô mô hình (HE x 250)

1 – Mô kẽ ứ dịch

2 – Ống sinh tinh



**Hình 3.12.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô mô hình (HE x 500)

1 – Mô kẽ

2 – Ống sinh tinh

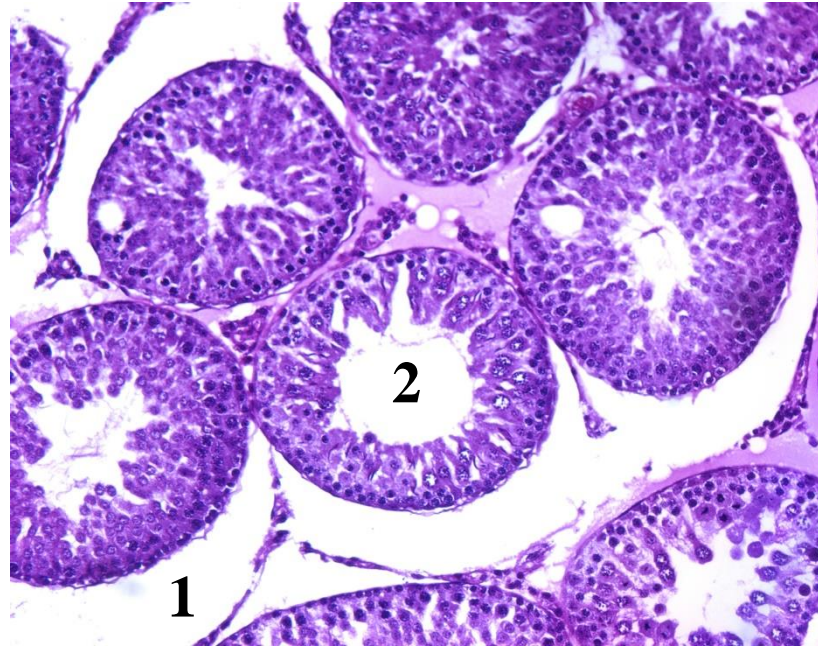


**Hình 3.13.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 1,8 g đực liệu/kg  
(HE x 250)

1 – Mô kẽ ứ dịch

2 – Ống sinh tinh

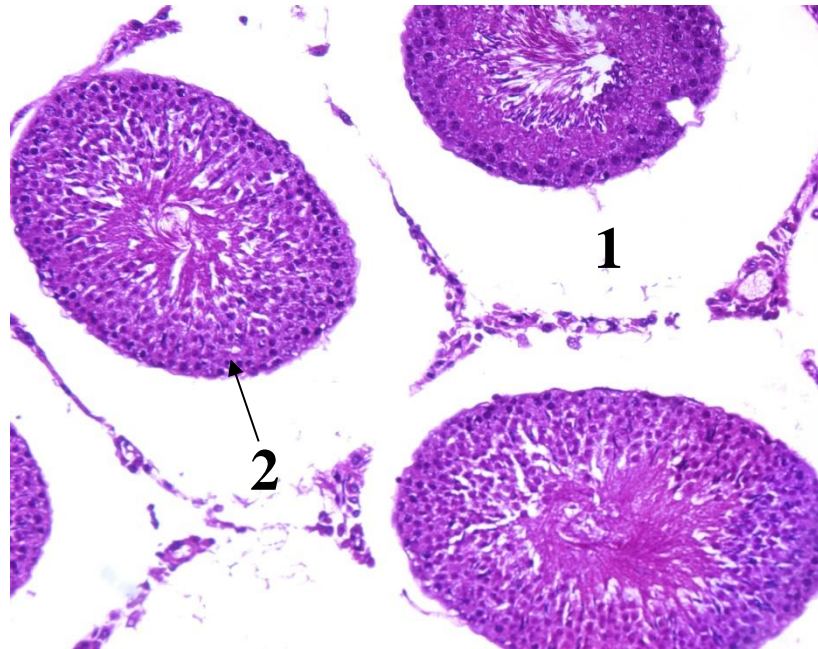




**Hình 3.14.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg  
(HE x 500)

1 – Mô kẽ

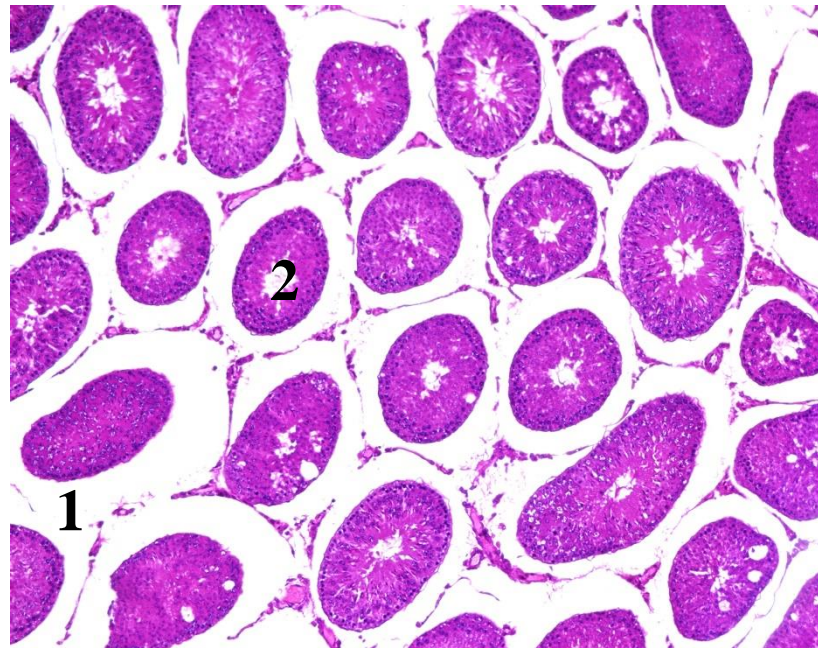
2 – Ống sinh tinh có ít tinh trùng



**Hình 3.15.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg  
(HE x 500)

1 – Mô kẽ

2 – Ống sinh tinh



**Hình 3.16.** Mô học tinh hoàn chuột cống đực lô TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg (HE x 250)

1 – Mô kẽ

2 – Ống sinh tinh nhỏ, có ít tinh trùng

**Bảng 3.31.** Ảnh hưởng của TD0014 đến mật độ và tỷ lệ tinh trùng sống của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô nghiên cứu (n = 9)	Mật độ tinh trùng (10 <sup>6</sup> /mL)	Tỷ lệ sống của tinh trùng (%)
Chứng sinh học	161,78 ± 24,15	71,67 ± 6,67
Mô hình	60,44 ± 16,48***	58,22 ± 10,03**
TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	98,44 ± 19,82▲▲▲	58,89 ± 14,42
TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	107,00 ± 25,62▲▲▲	67,00 ± 4,21▲

\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student't-test)

▲ $p < 0,05$ ; ▲▲▲ $p < 0,001$  so với lô mô hình (Student't-test)

Kết quả ở bảng 3.31 cho thấy:

- Mật độ tinh trùng và tỷ lệ tinh trùng sống của chuột cống đực ở lô mô hình (lô 2) giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ( $p < 0,001$ )

- TD0014 liều thấp (1,8 g dược liệu/kg/ngày) uống trong 10 ngày liên tục cải thiện được mật độ tinh trùng ( $p < 0,001$ ), tuy nhiên chưa cải thiện được tỷ lệ sống của tinh trùng ( $p > 0,05$ ) so với lô mô hình.
- TD0014 liều cao (5,4 g dược liệu/kg/ngày) uống trong 10 ngày liên tục có tác dụng cải thiện rõ rệt mật độ tinh trùng ( $p < 0,001$ ) và tỷ lệ sống của tinh trùng ( $p < 0,05$ ) so với lô mô hình.

**Bảng 3.32.** Ảnh hưởng của TD0014 lên khả năng di động của tinh trùng của chuột công đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

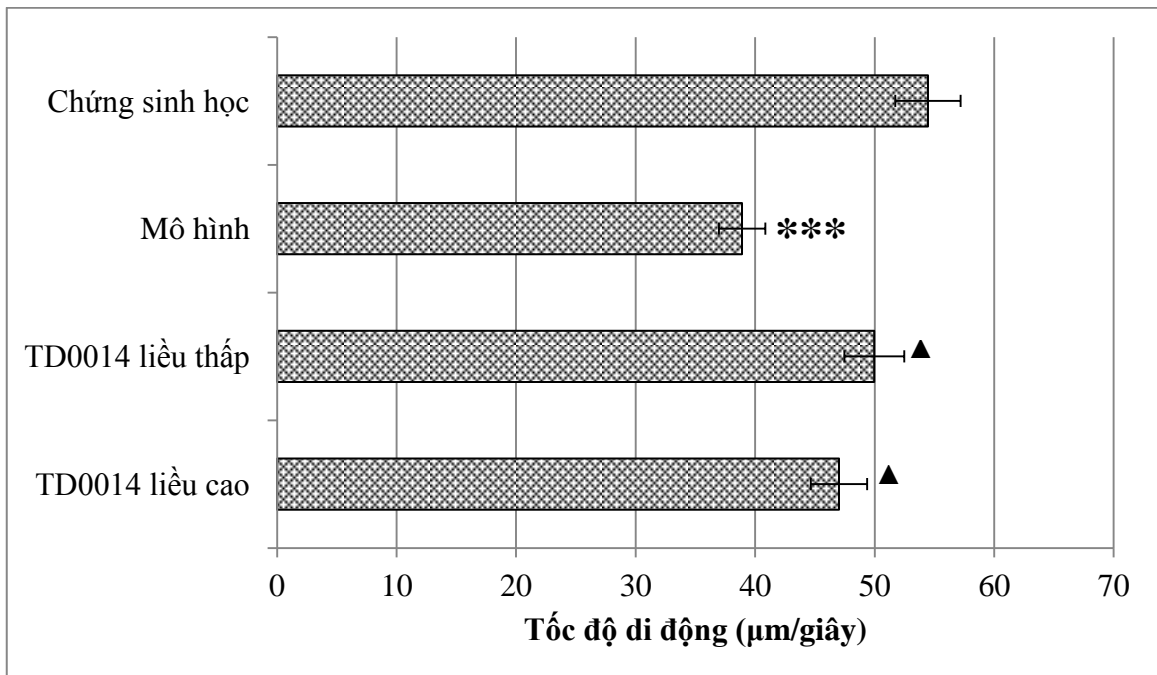
Lô nghiên cứu (n = 9)	Di động (%)			Không di động (%)
	Tiến tới nhANH	Tiến tới chẬM	Không tiến tới	
Chứng sinh học	30,33 ± 6,58	15,67 ± 4,18	5,00 ± 1,12	49,00 ± 5,96
Mô hình	2,33 ± 0,71***	4,33 ± 1,22***	6,67 ± 2,00	86,67 ± 2,96***
TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	16,44 ± 4,82▲▲▲	10,22 ± 3,07▲▲▲	4,22 ± 1,09▲▲	69,11 ± 6,77▲▲▲
TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	14,11 ± 4,51▲▲▲	10,89 ± 3,41▲▲▲	4,22 ± 1,86▲	70,67 ± 7,45▲▲▲

\*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student't-test)

▲ $p < 0,05$ ; ▲▲ $p < 0,01$ ; ▲▲▲ $p < 0,001$  so với lô mô hình (Student't-test)

Kết quả ở bảng 3.32 cho thấy:

- Lô mô hình: tỷ lệ tinh trùng không di động tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh học ( $p < 0,001$ ).
- Lô uống TD0014 liều thấp và liều cao: tỷ lệ tinh trùng tiến tới tăng cao, đồng thời tỷ lệ tinh trùng không tiến tới và tinh trùng không di động giảm rõ rệt so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các giá trị  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  hoặc  $p < 0,001$ .



\*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student's *t*-test); ▲ $p < 0,05$  so với lô mô hình (Student's *t*-test)

**Biểu đồ 3.9.** Ảnh hưởng của TD0014 lên tốc độ di động của tinh trùng của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Kết quả ở biểu đồ 3.9 cho thấy:

- Natri valproat liều 500 mg/kg uống liên tục trong 7 tuần làm giảm rõ rệt tốc độ di động của tinh trùng so với lô chứng sinh học ( $p < 0,001$ ).
- TD0014 ở cả hai mức liều nghiên cứu đều làm tăng có ý nghĩa thống kê tốc độ di động của tinh trùng so với lô mô hình với  $p < 0,05$ .

**Bảng 3.33.** Ảnh hưởng của TD0014 lên hình thái tinh trùng của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô nghiên cứu (n = 9)	Tỷ lệ bình thường (%)	Tỷ lệ bất thường (%)		
		Đầu	Cổ	Đuôi
Chứng sinh học	56,83 ± 4,12	19,67 ± 1,21	10,33 ± 2,07	13,17 ± 1,17
Mô hình	44,14 ± 3,67***	26,43 ± 2,88***	14,29 ± 2,63*	15,14 ± 1,86*
TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	51,67 ± 4,59 <sup>▲▲</sup>	22,50 ± 4,93	11,00 ± 1,41 <sup>▲</sup>	14,83 ± 1,94
TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	49,75 ± 5,12 <sup>▲</sup>	23,88 ± 2,36	11,75 ± 1,67 <sup>▲</sup>	14,63 ± 2,45

\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student 't-test)

<sup>▲</sup> $p < 0,05$ ; <sup>▲▲</sup> $p < 0,01$  so với lô mô hình (Student 't-test)

Số liệu ở bảng 3.33 cho thấy:

- Chuột ở lô mô hình (lô 2) có tỷ lệ tinh trùng bình thường giảm thấp hơn cùng với tỷ lệ tinh trùng bất thường (đầu, cổ, đuôi) tăng cao hơn rõ rệt so với lô chứng sinh học (lô 1) ( $p < 0,001$  và  $p < 0,05$ ).
- Chuột ở các lô uống TD0014 đều có tỷ lệ tinh trùng bình thường tăng cao đáng kể so với lô mô hình ( $p < 0,01$  và  $p < 0,05$ , tương ứng); tỷ lệ tinh trùng bất thường (đầu, cổ, đuôi) có xu hướng giảm so với lô mô hình, trong đó tỷ lệ tinh trùng bất thường cổ là giảm có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với  $p < 0,05$ .

**Bảng 3.34.** Ảnh hưởng của TD0014 lên nồng độ testosterone trong máu ở chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô nghiên cứu (n = 9)	Nồng độ testosterone (nmol/L)
Lô 1: Chứng sinh học	8,50 ± 1,57
Lô 2: Mô hình	4,93 ± 1,60***
Lô 3: TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	8,25 ± 2,00 <sup>▲▲▲</sup>
Lô 4: TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	10,59 ± 2,31 <sup>▲▲▲</sup> <sup>≠</sup>

\*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student 't-test); <sup>▲▲▲</sup> $p < 0,001$  so với lô mô hình (Student 't-test);

<sup>≠</sup> $p < 0,05$  so với lô TD0014 liều thấp (Student 't-test)

Kết quả ở bảng 3.34 cho thấy:

- Natri valproat liều 500 mg/kg uống liên tục trong 7 tuần làm giảm rõ rệt nồng độ testosterone so với lô chứng sinh học ( $p < 0,001$ ).
- TD0014 ở cả hai mức liều nghiên cứu đều làm tăng rõ rệt nồng độ testosterone trong huyết thanh so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$ . TD0014 liều cao thể hiện tác dụng làm tăng nồng độ testosterone trong máu tốt hơn liều thấp ( $p < 0,05$ ).

### 3.4.2.2. Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ

**Bảng 3.35.** Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng mào tinh, đầu dương vật và cơ nâng hậu môn-hành hang của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô nghiên cứu (n = 9)	Trọng lượng cơ quan sinh dục (mg/100g thể trọng)		
	Mào tinh	Đầu dương vật	Cơ nâng
Chứng sinh học	341,74 ± 78,77	44,24 ± 2,99	213,70 ± 55,86
Mô hình	198,18 ± 44,69***	39,47 ± 5,73*	161,52 ± 46,75*
TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	233,61 ± 48,55	39,92 ± 9,77	236,12 ± 51,03 <sup>▲</sup>
TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	263,49 ± 46,94 <sup>▲▲</sup>	44,39 ± 5,62	234,83 ± 72,76 <sup>▲</sup>

\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  so với lô chứng sinh học (Student 't-test)

<sup>▲</sup> $p < 0,05$ ; <sup>▲▲</sup> $p < 0,01$  so với lô mô hình (Student 't-test)

Kết quả ở bảng 3.35 cho thấy:

- Uống natri valproat liên tục trong 7 tuần gây giảm rõ rệt trọng lượng mào tinh, đầu dương vật và cơ nâng hậu môn-hành hang ở lô mô hình so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$  và  $p < 0,05$ .
- TD0014 liều thấp (1,8 g dược liệu/kg/ngày) có tác dụng làm tăng trọng lượng cơ nâng hậu môn-hành hang so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Trọng lượng mào tinh hoàn và đầu dương vật ở lô uống TD0014 liều thấp có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).



- TD0014 liều cao (5,4 g dược liệu/kg/ngày) làm tăng rõ rệt trọng lượng mào tinh hoàn ( $p < 0,01$ ) và cơ nâng hậu môn-hành hang ( $p < 0,05$ ) của chuột cống đực so với lô mô hình. Trọng lượng đầu dương vật ở lô uống TD0014 liều cao có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

**Bảng 3.36.** Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng các tuyến sinh dục phụ của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

Lô nghiên cứu (n = 9)	Trọng lượng các tuyến sinh dục phụ (mg/100g thể trọng)		
	Túi tinh	Tuyến tiền liệt	Tuyến Cowper
Chứng sinh học	93,34 ± 22,46	66,27 ± 17,91	21,73 ± 4,40
Mô hình	65,60 ± 20,67*	51,30 ± 11,03*	15,93 ± 4,65*
TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	108,85 ± 30,58 <sup>▲▲</sup>	60,44 ± 16,46	18,76 ± 3,92
TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	105,46 ± 22,98 <sup>▲▲▲</sup>	61,89 ± 17,46	19,45 ± 4,67

\* $p < 0,05$  so với lô chứng sinh học (Student 't-test)

▲▲ $p < 0,01$ ; ▲▲▲ $p < 0,001$  so với lô mô hình (Student 't-test)

Kết quả ở bảng 3.36 cho thấy:

- Chuột cống đực ở lô mô hình uống natri valproat 500 mg/kg trong 7 tuần liên tục có trọng lượng các tuyến sinh dục phụ (túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper) giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ( $p < 0,05$ )
- Trọng lượng túi tinh của chuột cống đực ở các lô uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày (lô 3) và liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày tăng rõ rệt so với lô mô hình (lô 2), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$ , tương ứng.
- Trọng lượng tuyến tiền liệt và tuyến Cowper của chuột cống đực ở các lô uống TD0014 đều có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

### 3.4.2.3. Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng gan, thận, tuyến thượng thận

**Bảng 3.37.** Ảnh hưởng của TD0014 đến trọng lượng gan, thận, tuyến thượng thận của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

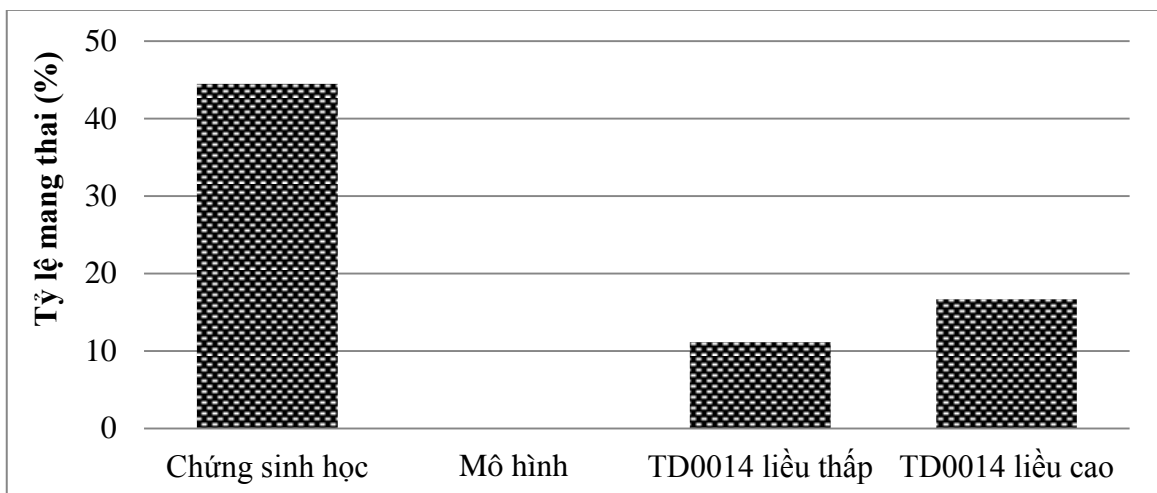
Lô nghiên cứu (n = 9)	Gan (g/100g thể trọng)	Thận (g/100g thể trọng)	Tuyến thượng thận (mg/100g thể trọng)
Chứng sinh học	3,72 ± 0,30	0,65 ± 0,04	33,56 ± 6,50
Mô hình	3,10 ± 0,44**	0,58 ± 0,04**	24,62 ± 8,70*
TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg	3,20 ± 0,48	0,62 ± 0,08	27,44 ± 8,57
TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg	3,23 ± 0,24	0,64 ± 0,09	27,94 ± 5,73

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  so với lô chứng sinh học (Student's t-test)

Kết quả ở bảng 3.37 cho thấy:

- Chuột cống đực ở lô mô hình (lô 2) uống natri valproat 500 mg/kg liên tục 7 tuần có giảm rõ rệt trọng lượng gan, thận và tuyến thượng thận so với lô chứng sinh học với các giá trị  $p < 0,05$  và  $p < 0,01$ .
- TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày và 5,4 g dược liệu/kg/ngày có xu hướng làm tăng trọng lượng gan, thận và tuyến thượng thận so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

### 3.4.2.4. Ảnh hưởng của TD0014 đến các chỉ số nghiên cứu trên chuột cống cái



**Biểu đồ 3.10.** Ảnh hưởng của TD0014 đến tỷ lệ mang thai của chuột cống cái

Số liệu ở biểu đồ 3.10 cho thấy:

- Lô mô hình (chuột đực uống natri valproat 500 mg/kg trong 7 tuần liên tục, không dùng thuốc gì): không có chuột cái mang thai sau 2 tuần ghép cặp.
- Lô TD0014 liều thấp (chuột đực uống natri valproat 500 mg/kg liên tục trong 7 tuần, sau đó uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày trong 10 ngày): tỷ lệ mang thai của chuột cái sau 2 tuần ghép cặp là 11,1%.
- Lô TD0014 liều cao (chuột đực uống natri valproat 500 mg/kg liên tục trong 7 tuần, sau đó uống TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày trong 10 ngày): tỷ lệ mang thai của chuột cái sau 2 tuần ghép cặp là 16,7%.
- Không có sự khác biệt về tỷ lệ chuột cái mang thai giữa lô TD0014 liều cao và liều thấp ( $p(X > \chi^2) = 0,630 > \alpha = 0,05$ ).

## **Chương 4**

### **BÀN LUẬN**

#### **4.1. Độc tính của TD0014 trên động vật thực nghiệm**

Các thuốc YHCT có nguồn gốc từ thực vật và động vật đã được sử dụng từ rất lâu trên thế giới để duy trì sức khỏe và điều trị bệnh. Ở hầu hết các nước đang phát triển, việc sử dụng các thuốc YHCT được xem như là một phần của văn hóa và cũng là phương pháp trị liệu được áp dụng rất phổ biến. Do các thuốc tân dược có nguồn gốc tổng hợp thường có nhiều tác dụng không mong muốn, kèm theo đó là sự gia tăng của tình trạng kháng thuốc, các thuốc YHCT cũng đang dần trở nên phổ biến ở các nước phát triển. Trước đây, người ta cho rằng việc sử dụng các dược liệu theo kinh nghiệm lâu đời là an toàn và không có độc tính. Tuy nhiên, các khảo sát gần đây đã chỉ ra các tác dụng bất lợi của nhiều dược liệu. Điều này làm tăng mối lo ngại về các độc tính tiềm ẩn có thể xuất hiện khi sử dụng các dược liệu ngắn hạn hoặc dài hạn. Vì vậy, việc đánh giá độc tính của bất kỳ dược liệu dùng làm thuốc nào trước khi áp dụng trên lâm sàng là một bước không thể thiếu, trong đó xác định độc tính trên động vật thực nghiệm cần được tiến hành trước tiên nhằm cung cấp các bằng chứng an toàn trước khi sử dụng trên người. Các nghiên cứu độc tính thường được thực hiện là nghiên cứu độc tính cấp và độc tính bán trường diễn.

##### **4.1.1. Độc tính cấp**

Theo định nghĩa của Hệ thống hài hòa toàn cầu (Global Harmonization System – GHS), độc tính cấp theo đường uống là những tác dụng không mong muốn xảy ra sau khi uống một chất với liều đơn hoặc đa liều trong vòng 24 giờ [107]. Thử độc tính cấp nhằm cung cấp thông tin cho việc xếp loại mức độ độc của thuốc, dự đoán triệu chứng và dự kiến biện pháp điều trị ngộ độc cấp, đồng thời làm căn cứ để thiết lập mức liều cho các nghiên cứu tiếp theo (nghiên cứu độc tính dài hạn, nghiên cứu tác dụng dược lý). Các chỉ số cần xác định trong phép thử độc tính cấp bao gồm: liều an toàn; liều dung nạp tối đa; liều gây ra độc tính có thể quan sát được; liều thấp nhất có thể gây chết động vật thí nghiệm (nếu có); liều LD<sub>50</sub> (liều

gây chết 50% số động vật thực nghiệm) gần đúng (nếu có thể xác định được); và những triệu chứng ngộ độc điển hình có thể quan sát được trên động vật và khả năng hồi phục (nếu có) [105].

Loài động vật thường được sử dụng trong nghiên cứu độc tính cấp là loài gặm nhấm, có thể là chuột cống hoặc chuột nhắt [105]. Động vật giống cái thường nhạy cảm với độc tính của thuốc hơn nên là lựa chọn thích hợp để xác định các biểu hiện độc cấp tính [108]. Tuy nhiên, TD0014 hướng tới đối tượng sử dụng là nam giới, do vậy, động vật thí nghiệm được sử dụng trong phép thử độc tính cấp trong luận án này là chuột nhắt trưởng thành giống đực với phương pháp tiến hành được lựa chọn thực hiện theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới về thuốc có nguồn gốc dược liệu và xác định liều chết 50% (LD<sub>50</sub>) theo phương pháp Litchfield-Wilcoxon.

Pha 01 gói TD0014 (tương đương 7,5 gam dược liệu) trong nước cất thành vừa đủ 10 mL dung dịch có mức độ đậm đặc tối đa có thể cho chuột nhắt uống bằng kim đầu tù chuyên dụng. Chuột nhắt đã được uống thuốc thử TD0014 ở dạng dung dịch có mức độ đậm đặc tối đa với thể tích 0,25 mL/10g/lần, uống 3 lần/ngày, mỗi lần cách nhau 3 giờ; sau đó pha loãng dần dung dịch đậm đặc này để chuột uống thuốc thử ở các mức liều khác nhau. Theo dõi số chuột chết trong vòng 72 giờ đầu sau khi uống thuốc và tình trạng chung của chuột trong 7 ngày sau khi uống thuốc. Kết quả quan sát cho thấy, tất cả chuột trong các lô không có hiện tượng gì đặc biệt: ăn uống, vận động bình thường, chuột không bị khó thở, đi ngoài phân khô, không thấy xuất hiện chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc thử. Một tuần sau khi uống thuốc thử, tất cả các chuột đều sống và không thấy gì bất thường ở tất cả các lô. Vì không có chuột chết ở tất cả các lô (bảng 3.1) nên chưa xác định được LD<sub>50</sub> của TD0014 theo đường uống bằng phương pháp Litchfield - Wilcoxon.

Liều tối đa chuột đã được uống là 0,25 mL/10g thể trọng chuột dung dịch TD0014 có mức độ đậm đặc tối đa có thể cho chuột nhắt uống bằng kim đầu tù chuyên dụng, uống 3 lần liên tiếp, tương đương 75 mL/kg thể trọng chuột. Như vậy chuột đã uống TD0014 với liều 56,25 g dược liệu/kg thể trọng chuột nhưng không thấy xuất hiện dấu hiệu độc tính cấp, không thấy bất thường gì sau một tuần kể từ khi uống thuốc

thử lần đầu. Giá trị LD<sub>50</sub> của TD0014 được ước tính > 56,25 g dược liệu/kg thể trọng. Theo Ghosh (1984) và Klassen và cộng sự (1995), với giá trị LD<sub>50</sub> > 15 g/kg, thuốc thử có thể được phân loại vào nhóm thuốc không có độc tính (non-toxic) [109],[110].

Liều dùng khuyến cáo trên người là 15 g dược liệu/ngày, tính liều theo kg thể trọng cho người trưởng thành 50 kg thì liều TD0014 trên người là 0,3 g dược liệu/kg/ngày. Chuột nhắt trắng đã được uống đến liều 56,25 g dược liệu/kg/ngày tức là gấp 15,625 lần liều dùng trên người nhưng không có độc tính cấp (tính hệ số ngoại suy trên chuột nhắt là 12). Từ kết quả nghiên cứu trên, theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới, TD0014 là thuốc thử có nguồn gốc dược liệu có tính an toàn chấp nhận được [105].

#### 4.1.2. Độc tính bán trường diễn

Thử độc tính dài ngày được tiến hành sau khi đã có thông tin về độc tính cấp trên động vật và mẫu thử được dự định sử dụng dài ngày trên người. Mục đích của thử độc tính dài ngày là xác định khả năng dung nạp của động vật thí nghiệm khi dùng mẫu thử nhiều lần [105].

Theo Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu của Bộ Y tế, trường hợp mẫu thử không thể hiện độc tính cấp hoặc rất ít độc, có thể thử độc tính dài ngày trên một loài động vật (gặm nhấm) [105]. Căn cứ vào kết quả thử độc tính cấp, TD0014 được phân loại vào nhóm thuốc không có độc tính, do vậy có thể tiến hành nghiên cứu độc tính bán trường diễn của chế phẩm trên một loài động vật, cụ thể là chuột cống.

Theo hướng dẫn của WHO, thời gian thử độc tính dài ngày trên động vật thường được tính dựa theo thời gian dự kiến dùng trên người (bảng 4.1).

**Bảng 4.1.** Thời gian thử độc tính dài ngày quy đổi từ người sang động vật [105]

Thời gian dự kiến dùng trên người	Thời gian thử độc tính trên động vật
Liều duy nhất hoặc liều lặp lại < 1 tuần	2 tuần đến 1 tháng
Liều lặp lại 1-4 tuần	4 tuần đến 3 tháng
Liều lặp lại 1-6 tháng	3-6 tháng
Liều lặp lại > 6 tháng	9-12 tháng

TD0014 dự kiến dùng 3 tháng trên người, do vậy nghiên cứu độc tính bán trường diễn theo đường uống của TD0014 trong luận án được tiến hành trong thời gian 90 ngày.

Nghiên cứu này đánh giá độc tính bán trường diễn của TD0014 ở hai mức liều tương đương liều dự kiến dùng trên lâm sàng (1,8 g dược liệu/kg/ngày) và liều gấp 3 lần liều dự kiến dùng trên lâm sàng (5,4 g dược liệu/kg/ngày). Theo hướng dẫn của WHO, đánh giá độc tính bán trường diễn của một thuốc y học cổ truyền nên kiểm tra càng nhiều chỉ số càng tốt, bao gồm: tình trạng chung và sự thay đổi trọng lượng, các chỉ số huyết học, các chỉ số sinh hóa máu và hình ảnh giải phẫu vi thể đánh giá chức năng của nhiều cơ quan, trong đó có gan, thận [105].

#### **4.1.2.1. Tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng**

Tình trạng chung của động vật thực nghiệm là một chỉ số bắt buộc phải theo dõi định kỳ khi tiến hành các nghiên cứu *in vivo* nói chung và nghiên cứu độc tính bán trường diễn nói riêng [105]. Theo dõi trong suốt thời gian nghiên cứu nhận thấy, chuột cống đực ở cả 3 lô (lô uống nước cất và 2 lô trị) đều ăn uống và hoạt động bình thường, mắt sáng, lông mượt, phân khô. Bên cạnh các chỉ tiêu quan sát về khả năng tiêu thụ thức ăn, nước uống, tình trạng phân và nước tiểu của động vật thực nghiệm, sự thay đổi trọng lượng cơ thể cũng đóng vai trò là một dấu hiệu nhạy cảm để đánh giá tình trạng sức khỏe chung của động vật và cũng là một trong những dấu hiệu nguy hiểm đầu tiên cảnh báo về độc tính. Số liệu tại biểu đồ 3.1 cho thấy, sau 90 ngày uống thuốc thử, cân nặng của chuột ở cả 3 lô đều tăng so với trước nghiên cứu, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở 2 lô trị so với lô uống nước cất ở các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử. Từ các kết quả trên có thể thấy rằng, TD0014 ở các mức liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày và 5,4 g dược liệu/kg/ngày đều không ảnh hưởng xấu tới tình trạng chung và mức độ thay đổi thể trọng của chuột khi uống liên tục trong 90 ngày.

#### **4.1.2.2. Ảnh hưởng của TD0014 đến chức năng tạo máu**

Hệ thống tạo máu là một trong những cơ quan đích nhạy cảm nhất với các hợp chất có độc tính và là một chỉ số quan trọng về tình trạng sinh lý và bệnh lý ở người

và động vật [105]. Các thành phần của máu có liên quan mật thiết đến chức năng và hoạt động của nhiều cơ quan trong cơ thể, do vậy những sự thay đổi xảy ra ở máu có thể phản ánh tình trạng bệnh lý của các cơ quan này cũng như của chính cơ quan tạo máu. Các chỉ số trong xét nghiệm tế bào máu ngoại vi có giá trị lớn trong việc đánh giá chức năng tạo máu [111].

Hồng cầu là loại tế bào máu có chức năng chủ yếu là vận chuyển hemoglobin – một protein chứa sắt có nhiệm vụ vận chuyển oxy và carbon dioxid trong cơ thể. Hematocrit là tỷ lệ % thể tích hồng cầu so với thể tích máu toàn bộ. Thể tích trung bình hồng cầu (MCV) là tỷ lệ giữa hematocrit và số lượng hồng cầu [111],[112]. Các chỉ số về hồng cầu bao gồm số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit, và thể tích trung bình (MCV) là các chỉ số giúp đánh giá chức năng của hồng cầu, đồng thời cũng là những chỉ số hữu ích nhất trong chẩn đoán thiếu máu ở hầu hết các loài động vật. Kết quả nghiên cứu trong các bảng 3.2 đến bảng 3.4 cho thấy, các chỉ số về hồng cầu không có sự khác biệt giữa các lô uống TD0014 và lô chứng sinh học. Như vậy, TD0014 ở hai mức liều nghiên cứu uống liên tục trong 90 ngày không gây ảnh hưởng tới kích thước và chức năng của hồng cầu, các tình trạng thiếu máu hồng cầu to hoặc hồng cầu nhỏ đều không xảy ra.

Trong xét nghiệm huyết học, các chỉ số về bạch cầu bao gồm số lượng bạch cầu và công thức bạch cầu cũng là các giá trị quan trọng cần được xác định. Số lượng bạch cầu là số bạch cầu có trong một đơn vị máu. Công thức bạch cầu là tỷ lệ phần trăm các loại bạch cầu trong máu [111],[112]. Bạch cầu là một phần của hệ miễn dịch, do đó sự thay đổi trong các chỉ số về bạch cầu, ngoài việc phản ánh chức năng của cơ quan tạo máu, còn là các thông số giúp đánh giá hoạt động của hệ miễn dịch trong việc chống lại các bệnh truyền nhiễm và các vật thể lạ trong máu. Số liệu trong các bảng 3.5 và 3.6 cho thấy, sự thay đổi của số lượng bạch cầu và tỷ lệ phần trăm các loại bạch cầu trong máu không có sự khác biệt khi so sánh giữa 2 lô trị và lô chứng sinh học. Kết quả này đã chỉ ra rằng, TD0014 không có chứa các thành phần gây ảnh hưởng đến số lượng bạch cầu và thành phần các loại bạch cầu trong máu ngoại vi.



Bên cạnh các chỉ số về hồng cầu và bạch cầu, số lượng tiểu cầu cũng là một thông số giúp đánh giá chức năng của cơ quan tạo máu. Số lượng tiểu cầu là số tiểu cầu có trong một đơn vị máu. Tiểu cầu có vai trò quan trọng trong quá trình đông máu, cầm máu. Thuốc thử ảnh hưởng đến số lượng tiểu cầu sẽ ảnh hưởng đến quá trình đông-cầm máu trong cơ thể. Trong bảng 3.7, số lượng tiểu cầu ở các lô uống TD0014 không có sự khác biệt so với lô chứng sinh học, điều này cho thấy thuốc thử không ảnh hưởng đến quá trình sản xuất tiểu cầu, không gây ra hiện tượng tăng phá hủy tiểu cầu trong máu ngoại vi.

Từ các kết quả trên có thể kết luận rằng, TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày và 5,4 g dược liệu/kg/ngày uống liên tục trong 90 ngày không làm thay đổi các chỉ số máu ngoại vi trong xét nghiệm huyết học, điều này có nghĩa chế phẩm nghiên cứu không thể hiện các tác động có hại đến chức năng của cơ quan tạo máu trên động vật thực nghiệm.

#### **4.1.2.3. Ảnh hưởng của TD0014 đến cấu trúc và chức năng gan**

Gan là cơ quan có rất nhiều chức năng trong cơ thể, gan còn là nơi các thuốc được chuyển hoá và thải trừ, dễ gây ra độc tính. Do đó, khi nghiên cứu độc tính, cần phải đánh giá ảnh hưởng của thuốc đến gan.

Mức độ tổn thương tế bào gan thường được đánh giá thông qua hoạt độ các enzym transaminase là ALT và AST trong huyết thanh [111],[112]. AST không đặc hiệu hoàn toàn cho gan vì AST còn có mặt trong nhiều loại tế bào khác như cơ tim, cơ vân, thận, não, tụy, phổi, bạch cầu và hồng cầu, và cũng có thể tăng cao do tổn thương các cơ quan này. Trên lâm sàng, AST còn được sử dụng như một marker sinh học để chẩn đoán nhồi máu cơ tim cấp [111],[112]. Không giống như AST, ALT được tìm thấy phần lớn ở gan và hoạt độ enzym này thường được sử dụng như một dấu ấn sinh học đặc hiệu cho các vấn đề về gan. Tăng nồng độ trong huyết thanh của cả AST và ALT có thể xảy ra khi có sự thay đổi tính thấm của màng tế bào gan, và AST thường được giải phóng chậm hơn so với ALT do sự phân bố khác nhau của hai enzym này trong tế bào gan: ALT nằm chủ yếu trong bào tương, trong khi đó phần lớn AST được tìm thấy trong ty thể. Vì vậy xét nghiệm ALT đặc hiệu

cho tổn thương tế bào gan hơn so với AST [111],[112]. Kết quả tại bảng 3.8 cho thấy, không có sự khác biệt về hoạt độ transaminase huyết thanh tại các lô uống TD0014 so với lô chứng sinh học tại tất cả các thời điểm định lượng. Như vậy có thể nói, TD0014 uống liên tục trong 90 ngày không gây hủy hoại tế bào gan của chuột cống trắng. Kết quả này cũng tương ứng với những quan sát về đại thể và vi thể gan chuột. Tại thời điểm kết thúc nghiên cứu, quan sát đại thể gan của chuột cống ở tất cả các lô đều thấy gan có kích thước, màu sắc và mật độ bình thường. Hình ảnh vi thể lô chứng và hai lô trị cũng đều không có sự khác biệt, cụ thể không quan sát thấy tình trạng đảo lộn cấu trúc của gan, không có tình trạng xơ hóa khoảng cửa, không có xâm nhập viêm, không tăng sinh ống mật ở tất cả các mẫu bệnh phẩm.

Chức năng của gan biểu hiện qua khả năng tổng hợp và khả năng bài tiết. Gan tham gia vào nhiều quá trình chuyển hóa trong cơ thể, trong đó có chuyển hóa protein và lipid. Với quá trình chuyển hóa protein, gan tổng hợp phần lớn protein trong huyết thanh (albumin, một số globulin và yếu tố đông máu) [113]. Do albumin chỉ được tổng hợp tại gan nên định lượng albumin trong máu sẽ đánh giá được một phần chức năng chuyển hóa protein của gan [114]. Một trong các vai trò của gan trong chuyển hóa lipid là tổng hợp cholesterol và sử dụng cholesterol để sản xuất muối mật [113]. Vì vậy có thể đánh giá một phần chức năng chuyển hóa lipid của gan thông qua định lượng cholesterol toàn phần [114]. Số liệu nghiên cứu tại các bảng 3.10 và 3.11 cho thấy, TD0014 ở cả hai mức liều đều không làm thay đổi nồng độ albumin và cholesterol toàn phần khi so sánh với lô chứng sinh học tại tất cả các thời điểm định lượng. Một chức năng quan trọng nữa của gan là tổng hợp và bài tiết mật. Mỗi ngày các tế bào gan bài tiết 800-1000 mL mật, chất lỏng màu vàng, nâu hoặc xanh ô liu. Các thành phần của mật bao gồm nước, muối mật, cholesterol, một phospholipid được gọi là lecithin, sắc tố mật, và một vài ion. Bilirubin, sản phẩm giáng hóa hemoglobin trong hồng cầu, là thành phần chính trong sắc tố mật [113]. Vì vậy, khả năng bài tiết của gan có thể được đánh giá thông qua định lượng nồng độ bilirubin toàn phần trong huyết thanh [114]. Quan sát số

liệu trong bảng 3.9 có thể thấy, TD0014 ở cả hai mức liều nghiên cứu đều không làm thay đổi lượng bilirubin toàn phần trong máu chuột cống khi so sánh với lô chứng sinh học và so với thời điểm trước khi bắt đầu dùng thuốc. Kết quả này phù hợp với kết quả đánh giá về ảnh hưởng của TD0014 đến số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố đã được bàn luận ở trên. Như vậy, uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày và 5,4 g dược liệu/kg/ngày liên tục trong 90 ngày không gây ảnh hưởng đến chức năng chuyển hóa protein và lipid, và chức năng bài tiết mật của gan chuột cống.

#### ***4.1.2.4. Ảnh hưởng của TD0014 đến chức năng lọc của cầu thận***

Thận là cơ quan bài tiết của cơ thể và là mô có nhiều máu qua, do đó cầu thận và ống thận rất nhạy cảm và dễ bị tổn thương bởi các chất nội sinh hoặc ngoại sinh. Đánh giá cấu trúc và chức năng thận là một yêu cầu bắt buộc khi nghiên cứu độc tính của các sản phẩm hoặc thuốc mới [105]. Có thể đánh giá chức năng thận thông qua định lượng nồng độ ure và creatinin trong huyết thanh. Ure trong máu được tạo ra từ quá trình phân hủy protein có trong những thực phẩm sử dụng hàng ngày. Ure được lọc qua cầu thận và khoảng 40% trong số đó được tái hấp thu ở ống thận. Do đó chỉ số này thường hay phụ thuộc vào chế độ ăn uống hàng ngày. Creatinin là chất chuyển hóa cuối cùng do quá trình hoạt động của cơ bắp tiết ra. Creatinin được bài tiết qua thận nhờ quá trình lọc tại cầu thận và không được tái hấp thu ở ống thận. Vì lý do này, xét nghiệm creatinin máu là chỉ số đáng tin cậy hơn để đánh giá chức năng lọc của cầu thận và theo dõi tiến triển của chức năng thận [111],[112],[114]. Kết quả ở bảng 3.12 cho thấy, nồng độ creatinin huyết thanh đều không có sự thay đổi khi so sánh giữa các lô nghiên cứu tại tất cả các thời điểm định lượng. Như vậy, TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày và 5,4 g dược liệu/kg/ngày uống liên tục trong 90 ngày không gây tác động xấu tới chức năng lọc của cầu thận. Hình ảnh đại thể và vi thể thận chuột cống tại thời điểm kết thúc nghiên cứu là bằng chứng củng cố thêm cho nhận định này. Quan sát đại thể thận ở cả ba lô nghiên cứu đều thấy thận có kích thước, màu sắc và mật độ bình thường. Trên hình ảnh vi thể, cầu thận của

chuột cống tại lô chứng và hai lô trị cũng có hình thái và cấu trúc trong giới hạn bình thường, không có hiện tượng xơ hóa, không có hiện tượng tăng sinh tế bào.

Từ các kết quả nghiên cứu trên có thể đưa ra nhận định rằng, TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày và 5,4 g dược liệu/kg/ngày uống liên tục trong 90 ngày không gây ra độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng, cụ thể là không ảnh hưởng đến các chỉ số đánh giá chức năng của cơ quan tạo máu, không gây tổn thương cấu trúc gan, không làm thay đổi một số chức năng gan (chuyển hóa protein, chuyển hóa lipid, bài tiết mật), không có tác động tiêu cực tới chức năng lọc của cầu thận. Điều này rất quan trọng trong việc xem xét khả năng có thể sử dụng sản phẩm này lâu dài trên thực tế lâm sàng.

Với các kết quả nghiên cứu về độc tính ở trên, có thể phân loại TD0014 vào nhóm thuốc không có độc tính cấp và không có độc tính khi sử dụng liều lặp lại trong 90 ngày. Tìm kiếm thông tin về độc tính của các dược liệu thành phần trong sản phẩm TD0014, chúng tôi nhận thấy phần lớn các thảo dược này có giá trị  $LD_{50} > 2$  g/kg và được GHS phân loại vào nhóm có độc tính thấp [107], đồng thời khi dùng dài ngày trên động vật thực nghiệm cũng không gây ra những ảnh hưởng xấu đến cấu trúc và chức năng của một số cơ quan trong cơ thể.

**Bảng 4.2.** Các nghiên cứu về độc tính của một số dược liệu trong sản phẩm TD0014

<b>Dược liệu [tham khảo]</b>	<b>Kết quả nghiên cứu độc tính</b>
Bạch tật lê [115]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính cấp theo đường uống trên chuột cống: <math>LD_{50} &gt; 2,0</math> g/kg</li> <li>- Độc tính dài ngày: Chuột cống uống dịch chiết butanol giàu saponin của bạch tật lê (100, 200, 400 mg/kg) trong 28 ngày không có sự thay đổi về chỉ số huyết học, sinh hóa, mô bệnh học cơ quan</li> </ul>
Cúc hoa [116],[117]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính cấp theo đường uống trên chuột nhắt: <math>LD_{50} &gt; 2,0</math> g/kg</li> <li>- Độc tính cấp theo đường uống trên chuột cống: Theo dõi 2 tuần sau khi uống liều duy nhất 15 g/kg dịch chiết giàu carotenoid từ cúc hoa không xuất hiện các dấu hiệu độc tính</li> </ul>

<b>Dược liệu [tham khảo]</b>	<b>Kết quả nghiên cứu độc tính</b>
Bá bệnh [118]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính cấp theo đường uống trên chuột cống: LD<sub>50</sub> &gt; 6,0 g/kg</li> <li>- Độc tính dài ngày: Chuột cống uống bột rễ bá bệnh (0,6; 1,2; 2 g/kg) trong 13 tuần không có sự thay đổi cân nặng, chỉ số huyết học và sinh hóa, kết quả phân tích nước tiểu, hình ảnh đại thể và vi thể cơ quan</li> </ul>
Hoa hòe [119]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Giá trị LD<sub>50</sub> theo đường tiêm màng bụng của thành phần rutin trong hoa hòe trên chuột cống là 950 mg/kg</li> <li>- Giá trị LD<sub>50</sub> theo đường uống của thành phần quercetin trong hoa hòe trên chuột cống là 160 mg/kg</li> </ul>
Hà thủ ô đỏ [120]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính cấp theo đường uống của dịch chiết alcohol của hà thủ ô đỏ: LD<sub>50</sub> = 287,87 g/kg; liều tối thiểu gây chết là 184 g/kg</li> </ul>
Trần bì [121]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Giá trị LD<sub>50</sub> theo đường uống của thành phần <math>\gamma</math>-terpinene trong trần bì trên chuột cống &gt; 2 g/kg</li> </ul>
Rễ đinh lăng [122]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính cấp theo đường uống của dịch chiết petroleum ether của rễ đinh lăng: LD<sub>50</sub> &gt; 2 g/kg</li> </ul>
Dây đau xương [123]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính cấp theo đường uống của dịch chiết ethanol của lá dây đau xương trên chuột cống: LD<sub>50</sub> &gt; 2000 mg/kg</li> </ul>
Lạc tiên [124],[125]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính cấp theo đường uống của các dịch chiết nước, hexan và methanol của lá lạc tiên trên chuột cống: LD<sub>50</sub> &gt; 5000 mg/kg</li> <li>- Độc tính trường diễn: Chuột cống uống dịch chiết nước của lá lạc tiên (16, 160, 800 và 1600 mg/kg/ngày) trong 6 tháng không có sự thay đổi cân nặng, chỉ số huyết học và sinh hóa, trọng lượng tương đối của các cơ quan (não, tim, phổi, gan, dạ dày, lách, thận, tuyến thượng thận, bàng quang, tử cung, buồng trứng), hình ảnh đại thể và vi thể cơ quan (tim, phổi, gan, thận, ruột, tuyến thượng thận)</li> </ul>
Đại táo [126]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính cấp theo đường uống của dịch chiết ethanol của đại táo</li> </ul>

Dược liệu [tham khảo]	Kết quả nghiên cứu độc tính
	trên chuột nhắt: LD <sub>50</sub> > 2000 mg/kg
Đương quy [127],[128]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính của đương quy khi tiêm vào tế bào màng đệm túi niệu gà: sự phát triển của phôi gà không bị ức chế bởi đương quy, không có sự khác biệt giữa nhóm tiêm thuốc và nhóm chứng.</li> <li>- Độc tính cấp theo đường uống của phức hợp polysaccharid đương quy-sắt trên chuột nhắt: không quan sát thấy biểu hiện độc tính cấp ở tất cả các nhóm; liều dung nạp tối đa là 4800 mg/kg, cao gấp 1920 lần liều hàng ngày ở người lớn.</li> <li>- Độc tính dài ngày: Chuột cống uống dịch chiết đương quy (1000, 2000 mg/kg) trong 28 ngày không có sự khác biệt về trọng lượng cơ thể, trọng lượng các cơ quan (tim, gan, lách, thận, tinh hoàn, tử cung), và một số chỉ số sinh hóa máu so với lô chứng.</li> </ul>
Ba kích [129]	- Độc tính cấp theo đường uống của dịch chiết ba kích trên chuột nhắt: LD <sub>50</sub> > 5000 mg/kg
Kim anh tử [130]	- Độc tính bán trường diễn: Chuột cống uống flavonoid toàn phần phân lập từ kim anh tử (500, 1000 và 2000 mg/kg/ngày) trong 90 ngày. Kết quả nghiên cứu đã xác định nồng độ cao nhất mà không quan sát được tác hại của thuốc thử tới cơ thể tiếp nhận (NOAEL) là 500 mg/kg/ngày.
Tỏi khô [131]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính cấp theo đường uống trên chuột nhắt: LD<sub>50</sub> &gt; 5000 mg/kg</li> <li>- Độc tính dài ngày: Chuột cống uống dịch chiết tỏi (300, 600 và 1200 mg/kg) trong 5 tuần, kết quả cho thấy mức liều thấp 300 mg/kg không làm thay đổi hoặc thay đổi nhẹ một vài chỉ số nghiên cứu và được coi là mức liều tương đối an toàn.</li> </ul>
Kỷ tử [132]	- Độc tính cấp theo đường tiêm dưới da của dịch chiết nước của kỷ tử trên chuột nhắt: LD <sub>50</sub> = 8,32 g/kg

Dược liệu [tham khảo]	Kết quả nghiên cứu độc tính
Cam thảo [133]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính cấp theo đường uống của các dạng muối glycyrrhizin khác nhau trên chuột nhắt có giá trị LD<sub>50</sub> dao động từ 1220 đến 12700 mg/kg.</li> <li>- Độc tính cấp theo đường uống của dịch chiết cam thảo có chứa 53% glycyrrhizic acid               <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Chuột nhắt: LD<sub>50</sub> &gt; 7,5 g/kg</li> <li>+ Chuột cống: LD<sub>50</sub> ở con đực = 18,0 g/kg; LD<sub>50</sub> ở con cái = 14,2 g/kg</li> </ul> </li> <li>- Độc tính bán trường diễn: Chuột cống uống dịch chiết cam thảo có chứa 53% glycyrrhizin (0,31; 0,63; 1,25; hoặc 2,5 g/kg/ngày) trong 90 ngày. Kết quả nghiên cứu đã xác định NOAEL là 0,31–0,63 g/kg (tương đương 165–334 mg glycyrrhizin/kg)</li> </ul>
Nhân sâm [134]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính cấp theo đường uống trên chuột cống và chuột nhắt: LD<sub>50</sub> &gt; 1000 mg/kg.</li> <li>- Độc tính dài ngày: Không thấy dấu hiệu độc tính ở chuột cống uống sản phẩm G115 (sản phẩm nhân sâm chuẩn hóa có chứa 4% ginsenoside) liều 4000 mg/kg (160 mg ginsenoside/kg) trong 20 ngày</li> </ul>
Nhục thung dung [135],[136]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính cấp theo đường uống trên chuột nhắt: LD<sub>50</sub> &gt; 5000 mg/kg.</li> <li>- Độc tính bán trường diễn: Chuột cống ăn thức ăn có chứa bột nhục thung dung với các hàm lượng 8, 4, 2 và 0% trong 90 ngày. Kết quả nghiên cứu đã xác định NOAEL là 7,8 g/kg đối với chuột đực và 8 g/kg đối với chuột cái.</li> </ul>
Đảng sâm [137]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc tính cấp theo đường uống của dịch chiết nước từ rễ đảng sâm trên chuột cống: LD<sub>50</sub> &gt; 5000 mg/kg</li> <li>- Độc tính bán trường diễn: Chuột cống uống dịch chiết nước từ rễ</li> </ul>

Dược liệu [tham khảo]	Kết quả nghiên cứu độc tính
	<p>đăng sâm (1250, 2500, và 5000 mg/kg/ngày) trong 28 ngày có làm thay đổi mức tiêu thụ thức ăn, nước uống, sự bài tiết protein, lượng bạch cầu, nồng độ TG, BUN, và trọng lượng tuyệt đối và tương đối của gan, lách và phổi. Tuy nhiên những thay đổi này là thoáng qua và được coi là không liên quan tới thuốc thử vì không cho thấy mức độ thay đổi có sự phụ thuộc liều một cách rõ ràng.</p>
Phá cố chỉ [138]	<p>- Độc tính cấp của 2 hoạt chất psoralen và isopsoralen</p> <p>+ Psoralen LD<sub>50</sub> theo đường uống trên chuột nhắt = 625 mg/kg LD<sub>50</sub> theo đường uống trên chuột cống = 1330 mg/kg</p> <p>+ Isopsoralen LD<sub>50</sub> theo đường uống trên chuột nhắt = 180 ± 29,6 mg/kg</p> <p>- Độc tính dài ngày: Hỗn hợp psoralen, isopsoralen, imperatorin gây phì đại gan, thận, lách trên chuột cống uống liều hàng ngày 2,5 mg/75 g trong 60 ngày</p>
Nhưng hươu [139]	<p>- Độc tính cấp theo đường uống trên chuột nhắt: liều gây chết tối thiểu &gt; 5 g/kg</p> <p>- Độc tính cấp theo đường uống trên chuột cống: LD<sub>50</sub> &gt; 2 g/kg</p> <p>- Độc tính dài ngày:</p> <p>+ Chuột cống uống bột nhưng hươu 3 g/kg/ngày trong 14 ngày không có sự khác biệt về sự gia tăng trọng lượng cơ thể, trọng lượng các cơ quan, hoạt tính transaminase so với lô chứng</p> <p>+ Không xuất hiện các dấu hiệu độc tính trên các quan sát đại thể và vi thể ở chuột cống sử dụng nhưng hươu với liều 1 g/kg trong 90 ngày</p>



## **4.2. Hoạt tính androgen và tác dụng trên chức năng cương dương của TD0014 trên động vật thực nghiệm**

### **4.2.1. Hoạt tính androgen của TD0014 trên động vật thực nghiệm**

Androgen là hormon sinh dục nam, có vai trò trong sự hình thành các đặc tính sinh dục nam, duy trì chức năng sinh sản, hoạt động sinh tinh và hành vi tình dục của nam giới khi trưởng thành. Thử nghiệm xác định hoạt tính androgen được xem là một bước sàng lọc cần thiết để đánh giá ảnh hưởng của thuốc thử đến chức năng sinh sản nam.

Thử nghiệm Hershberger là một phương pháp nghiên cứu *in vivo* tương đối nhanh để xác định hoạt tính androgen hoặc kháng androgen của một hợp chất hóa học dựa trên sự thay đổi trọng lượng của các cơ quan sinh dục phụ đáp ứng với androgen. Tại các cơ quan sinh dục phụ, dưới sự xúc tác của 5 $\alpha$ -reductase, testosterone sẽ được chuyển thành dihydrotestosteron, chất chuyển hóa này sẽ liên kết với các receptor ở tế bào đích và kích hoạt một loạt các phản ứng tổng hợp protein trong tế bào và dẫn đến tăng trọng lượng. Mô hình này đã được thực hiện từ những năm 1930, đây là thử nghiệm có phương pháp tiến hành đơn giản, không đòi hỏi kỹ thuật phức tạp, thời gian nghiên cứu ngắn và có độ tin cậy cao. Hiện nay thử nghiệm Hershberger đã được điều chỉnh và chuẩn hóa các bước thực hiện theo hướng dẫn của OECD. Đây được xem là mô hình thực nghiệm có giá trị nhất và được dùng phổ biến để chứng minh hoạt tính androgen của thuốc.

Loài động vật gặm nhấm, thường là chuột cống hoặc chuột nhắt, là những lựa chọn phổ biến trong các nghiên cứu đánh giá hoạt tính androgen. Về mặt sinh học, cả chuột cống và chuột nhắt đều có đáp ứng tương tự nhau, tuy nhiên việc phẫu tích một số cơ quan sinh dục phụ trên chuột nhắt khó thực hiện hơn chuột cống. Tuyến tiền liệt của chuột nhắt mủn và nhỏ, rất khó bóc tách được nguyên vẹn. Đầu dương vật của chuột nhắt có kích thước nhỏ, không có mốc giải phẫu rõ ràng nên cũng khó tiến hành phân lập [40],[41]. Khó khăn trong việc bóc tách cơ quan nên dễ dẫn tới sai số lớn khi xác định trọng lượng, do vậy, cũng như phần lớn các nghiên cứu đánh

giá hoạt tính androgen đã được thực hiện, nghiên cứu này của chúng tôi sử dụng động vật thực nghiệm là chuột cống.

Để đảm bảo độ nhạy, thử nghiệm Hershberger được tiến hành trên những động vật thực nghiệm giống đực có khả năng sản xuất androgen nội sinh ở mức tối thiểu, có thể lựa chọn chuột cống đực non bị thiếu hoặc chuột cống đực non cai sữa [40],[41].

#### ***4.2.1.1. Hoạt tính androgen của TD0014 trên chuột cống đực non thiếu***

Thử nghiệm Hershberger trên chuột cống đực non thiếu sẽ giúp phát hiện được cả những hoạt chất có hoạt tính androgen yếu. Mô hình này được tiến hành bằng cách cắt bỏ hai tinh hoàn của chuột cống đực non, sau đó là thời gian nghỉ ngơi 7 ngày và thuốc thử bắt đầu được uống từ ngày thứ 8 sau thiếu, thời gian uống thuốc kéo dài 10 ngày. Sự thay đổi trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ sau thời gian uống thuốc là các chỉ số được sử dụng để xác định hoạt tính androgen của thuốc.

Tuổi dậy thì của chuột cống là 60-63 ngày tuổi [140]. Chuột cống đực non nếu bị thiếu trước 42 ngày tuổi sẽ dẫn tới khó khăn trong việc lấy được đầu dương vật do vỏ bao quy đầu chưa trượt xuống, do vậy cần tiến hành thiếu sau 42 ngày tuổi. Cùng với thời gian nghỉ ngơi 7 ngày sau thiếu, động vật thực nghiệm có thể uống thuốc thử sớm nhất tại thời điểm 49 ngày tuổi, tuy nhiên không nên muộn hơn 60 ngày tuổi. Thời điểm giết chuột để xác định các chỉ số nghiên cứu không nên quá 70 ngày tuổi [40]. Để đáp ứng những yêu cầu trên, chuột cống đực non 42-50 ngày tuổi là lựa chọn phù hợp nhất.

Chuột cống đực non sẽ bị cắt bỏ hai tinh hoàn nhằm loại bỏ cơ quan sản xuất testosterone chính trong cơ thể, điều này giúp làm mất đi cơ chế feed-back của trục vùng dưới đồi-tuyến yên-tinh hoàn, đồng thời giúp hạn chế sự biến thiên về nồng độ testosterone huyết thanh giữa các cá thể chuột cống đực [40]. Sau khi bị cắt bỏ hai tinh hoàn, chuột sẽ được cho nghỉ ngơi 7 ngày để hồi phục sức khỏe, đồng thời đây được coi là thời gian cần thiết để cơ thể chuột loại bỏ gần như hoàn toàn lượng androgen nội sinh còn lại trong cơ thể, các cơ quan đích sẽ thoái triển về mức nhỏ nhất và đạt được trọng lượng nền đồng nhất giữa các cá thể chuột, đảm bảo độ nhạy

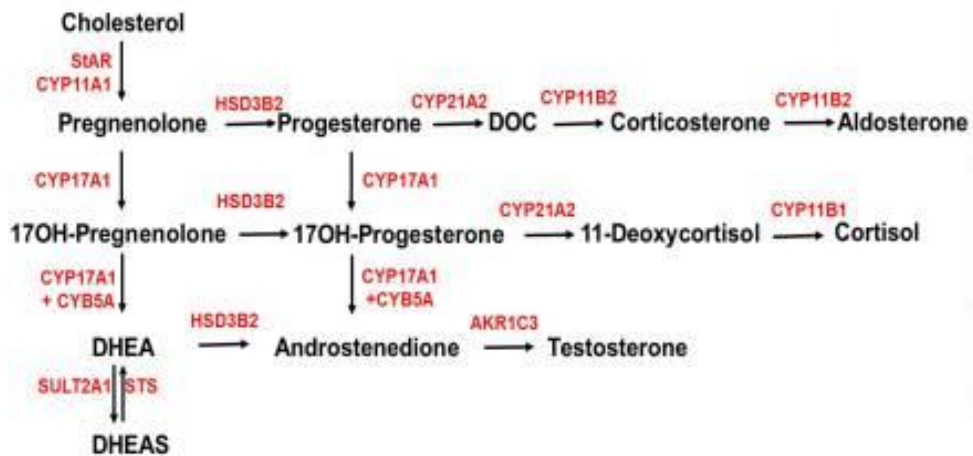
tối đa của các cơ quan đích với nguồn androgen ngoại sinh. Điều này giúp làm giảm số lượng động vật thực nghiệm cần sử dụng để sàng lọc hoạt tính androgen [40]. Với thử nghiệm Hershberger chỉ cần ít nhất 6 chuột cho mỗi lô, trong khi đó các thử nghiệm trên động vật dâ thì hoặc trưởng thành được khuyến cáo số lượng chuột ở mỗi lô cần ít nhất là 15 chuột [40]. Sau 7 ngày nghỉ ngơi, chuột công đực non thiếu sẽ bắt đầu uống thuốc thử. Theo OECD, để sàng lọc hoạt tính androgen, thuốc thử được cho uống trong 10 ngày liên tiếp với ít nhất 2 mức liều khác nhau [40]. Luận án này đánh giá hoạt tính androgen của TD0014 ở hai mức liều: 1,8 g được liều/kg/ngày là mức liều tương đương liều dự kiến dùng trên người có cân nặng 50 kg (tính theo hệ số ngoại suy là 6), và liều cao gấp 3 lần là 5,4 g được liều/kg/ngày. Thuốc chứng dương trong mô hình nghiên cứu này là testosterone liều 0,4 mg/kg, do đáp ứng kém khi dùng theo đường uống nên testosterone được dùng theo đường tiêm dưới da [40].

24 giờ sau khi uống thuốc lần cuối cùng, động vật thực nghiệm ở các lô sẽ bị giết để lấy máu động mạch cảnh và các cơ quan sinh dục phụ. Bình thường, dưới sự kích thích của androgen, các cơ quan sinh dục phụ sẽ phát triển và duy trì trọng lượng trong suốt thời gian dâ thì và sau tuổi dâ thì. Nếu nguồn androgen nội sinh bị loại bỏ, nguồn androgen ngoại sinh sẽ đóng vai trò thay thế trong việc làm tăng hoặc duy trì trọng lượng của các cơ quan này. Trên chuột công đực non thiếu, do tinh hoàn và mào tinh đã bị cắt bỏ, hoạt tính androgen của thuốc thử sẽ được đánh giá thông qua sự biến đổi trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ bao gồm đầu dương vật, túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn-hành hang [40]. Với thuốc chứng dương testosterone, trọng lượng của tất cả các cơ quan sinh dục phụ đều tăng đáng kể so với lô mô hình ( $p < 0,001$ ). Xem xét đến TD0014, số liệu ở bảng 3.14 cho thấy, TD0014 liều 1,8 g được liều/kg/ngày và 5,4 g được liều/kg/ngày đều làm tăng rõ rệt trọng lượng của tuyến tiền liệt và tuyến Cowper của chuột công đực non thiếu so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ). Theo hướng dẫn OECD 441, thuốc thử được xác định là có hoạt tính androgen nếu hợp chất đó có khả năng làm tăng có ý nghĩa thống kê trọng lượng của ít nhất hai cơ quan sinh dục phụ so với lô đối chứng [40].

Dựa theo tiêu chuẩn này, TD0014 có thể được xem là có hoạt tính androgen trong thử nghiệm Hershberger trên chuột cống đực non thiếu. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu khảo sát hoạt tính androgen của một số dược liệu thành phần trong sản phẩm TD0014 đã được thực hiện tại Việt Nam. Nghiên cứu của Trần Thanh Tùng (2009) với nhục thung dung liều 5 g/kg/ngày cho thấy tác dụng làm tăng trọng lượng túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper của dược liệu này trên chuột cống đực non thiếu [88]. Số liệu trong nghiên cứu của Nguyễn Mạnh Quân và cộng sự (2008) đã chỉ ra hoạt tính androgen của ba kích liều 20 g/kg trên chuột cống đực non thiếu, thể hiện ở tác dụng làm tăng trọng lượng túi tinh, tuyến tiền liệt và tuyến Cowper [83]. Tương tự, trong nghiên cứu của Trần Mỹ Tiên và cộng sự (2012), với mức liều nghiên cứu thấp hơn của ba kích (50 mg/kg và 100 mg/kg), hoạt tính androgen của dược liệu này vẫn được thể hiện rõ trên chuột cống đực non thiếu với trọng lượng của túi tinh, tuyến tiền liệt và cơ nâng hậu môn tăng cao hơn đáng kể so với lô mô hình [82]. Tác dụng làm tăng trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ của chuột cống đực non thiếu của thảo ty tử liều 20 g/kg (túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper) và bá bệnh liều 6 g/kg (túi tinh, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn) cũng đã được quan sát thấy trong các nghiên cứu của Dương Thị Ly Hương và cộng sự [78],[99].

Nhận định về hoạt tính androgen của TD0014 trong nghiên cứu này được củng cố thêm khi định lượng nồng độ testosterone trong máu chuột cống đực non thiếu. Kết quả ở bảng 3.15 cho thấy, TD0014 ở cả hai mức liều nghiên cứu đều làm tăng nồng độ testosterone so với lô mô hình, sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  và  $p < 0,001$  tương ứng với mức liều thấp và mức liều cao. Một số giả thuyết có thể được xem xét khi giải thích về tác dụng là tăng nồng độ testosterone máu của một thuốc thử: (1) thuốc thử kích thích tổng hợp và bài tiết testosterone tại tinh hoàn; (2) thuốc thử kích thích tổng hợp testosterone “ngoài tinh hoàn”; (3) thuốc thử đóng vai trò là một testosterone ngoại lai. Nghiên cứu này được thực hiện trên chuột cống đực non đã bị cắt bỏ hai tinh hoàn, do vậy không thể giải thích tác dụng làm tăng nồng độ testosterone máu của TD0014 theo giả thuyết thứ nhất. Với giả thuyết thứ

hai, cần có những nghiên cứu chứng minh ảnh hưởng của các dược liệu thành phần trong sản phẩm TD0014 đến con đường tổng hợp testosterone tại tuyến thượng thận. Thêm vào đó, các dược liệu thành phần của TD0014 có thể chứa những hợp chất có cấu trúc và tác dụng tương tự testosterone, vì vậy cũng chưa thể loại trừ giả thuyết thứ ba. Vậy cơ chế làm tăng nồng độ testosterone máu của TD0014 trên chuột cống đực non thiếu là gì? Điều này sẽ được bàn luận rõ hơn sau khi đánh giá hoạt tính androgen của TD0014 trên chuột cống đực non cai sữa.



**Hình 4.1.** Con đường tổng hợp steroid thượng thận [141]

*StAR*, steroidogenic acute regulatory protein; *CYP11A1*, side-chain cleavage enzyme; *HSD3B2*, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2; *CYP21A2*, 21-hydroxylase; *CYP11B2*, aldosterone synthase; *CYP17A1*, 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase; *CYP11B1*, 11 $\beta$ -hydroxylase; *CYB5A*, cytochrome b5; *AKR1C3*, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 5; *SULTA1/STS*, steroid sulfotransferase type 2A1

#### 4.2.1.2. Hoạt tính androgen của TD0014 trên chuột cống đực non cai sữa

Liên quan đến vấn đề đạo đức trong nghiên cứu, OECD đưa ra phương pháp đánh giá hoạt tính androgen trên chuột cống đực non cai sữa (không bị thiếu) để thay thế cho phương pháp đánh giá trên chuột cống đực non thiếu. Tuy nhiên, OECD nhấn mạnh rằng, thử nghiệm Hershberger trên chuột cống đực non cai sữa không bị cắt bỏ tinh hoàn chủ yếu chỉ giúp phát hiện được những hoạt chất có hoạt tính androgen trung bình hoặc mạnh [41]. Để xác định rõ hơn mức độ hoạt tính androgen của các mức liều khác nhau của TD0014, chúng tôi tiếp tục tiến hành

nghiên cứu đánh giá hoạt tính androgen của TD0014 trên chuột cống đực non cai sữa theo hướng dẫn OECD 115.

Tuổi cai sữa của chuột cống là 21 ngày tuổi [140], vì vậy chuột cống đực non sử dụng trong mô hình nghiên cứu này có độ tuổi 20-34 ngày tuổi. Chuột sẽ được uống thuốc thử hoặc dùng thuốc chứng dương testosterone liều 1 mg/kg/ngày theo đường tiêm dưới da liên tục trong thời gian 10 ngày. Kết thúc thời gian nghiên cứu sẽ tiến hành lấy máu và bóc tách các cơ quan sinh dục phụ, so sánh sự thay đổi trọng lượng của các cơ quan này giữa các lô uống thuốc và lô chứng sinh học để xác định hoạt tính androgen của thuốc thử.

Ở chuột cống đực non cai sữa, vỏ bao quy đầu chưa trượt xuống được, vì vậy hoạt tính androgen của thuốc thử sẽ được đánh giá thông qua sự biến đổi trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ bao gồm túi tinh, mào tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn-hành hang, bên cạnh đó còn xem xét sự thay đổi trọng lượng tinh hoàn và nồng độ testosterone huyết thanh. Thuốc thử được coi là có hoạt tính androgen nếu hợp chất đó làm tăng có ý nghĩa thống kê trọng lượng của ít nhất hai cơ quan sinh dục phụ so với lô đối chứng [41]. Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.16 cho thấy hoạt tính androgen của TD0014 liều 5,4 g được liều/kg/ngày, thể hiện ở tác dụng làm tăng rõ rệt trọng lượng của tuyến tiền liệt, tuyến Cowper và cơ nâng hậu môn-hành hang so với lô chứng sinh học, trong khi đó TD0014 liều 1,8 g được liều/kg/ngày chưa thể hiện rõ tác dụng này do mới chỉ làm tăng được trọng lượng của tuyến Cowper khi so sánh với lô đối chứng. Tuy nhiên ở cả hai mức liều nghiên cứu, TD0014 đều làm tăng nồng độ testosterone huyết thanh so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$  (bảng 3.17). Như vậy, với kết quả này có thể nhận định, TD0014 liều 5,4 g được liều/kg/ngày có hoạt tính androgen mạnh hơn so với liều 1,8 g được liều/kg/ngày.

Từ các kết quả nghiên cứu trên chuột cống đực non thiếu và chuột cống đực non cai sữa ở trên có thể thấy rằng, TD0014 có hoạt tính androgen, và liều 5,4 g được liều/kg/ngày thể hiện hoạt tính androgen mạnh hơn liều 1,8 g được liều/kg/ngày. Để giải thích cho hoạt tính androgen của TD0014 có thể dựa vào vai

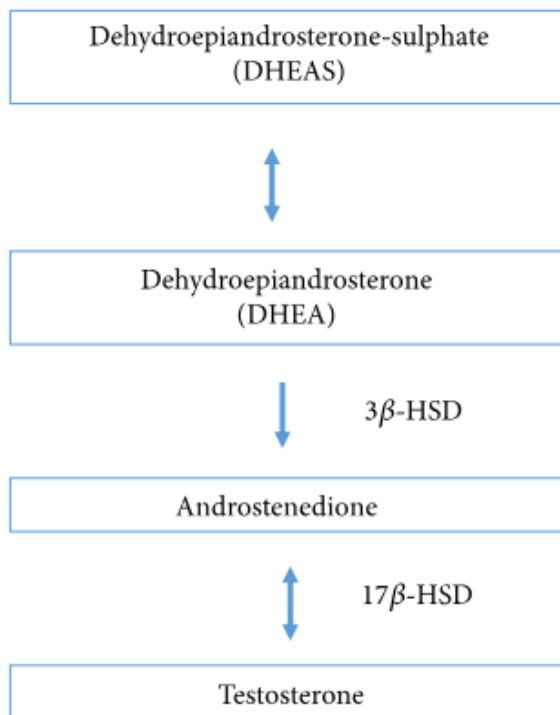
trò của các hợp chất phytoandrogen có mặt trong một số dược liệu thành phần của chế phẩm này. Phytoandrogen được xem là những thành phần đóng vai trò chính trong tác dụng kiểu androgen của nhiều cây thuốc. Dựa vào cơ chế tác dụng, các phytoandrogen có thể được phân loại thành ba nhóm chính: các phytoandrogen thật sự (cognate or true phytoandrogens), các phytoandrogen kích thích sản sinh androgen trong cơ thể (phytoandrogen-ogenic), và các phytoandrogen “bắt chước” tác dụng của androgen (functional mimetics of androgens) [142].

Các phytoandrogen thật là các hợp chất có cấu trúc giống androgen, chúng có thể gắn vào các androgen receptor và tạo ra các đáp ứng sinh học tương tự androgen nhưng thường yếu hơn. Protodioscin là một saponin steroid được phân lập từ phần trên mặt đất của cây bạch tật lê, dược liệu có hàm lượng lớn nhất trong viên hoàn cứng TD0014, được xác định là phytoandrogen thật với khả năng gắn vào và hoạt hóa receptor của testosterone, tạo ra các tác dụng tương tự androgen [142]. Hoạt chất protodioscin còn được tìm thấy trong tỳ giải [143], tuy nhiên cho đến nay vẫn chưa có những nghiên cứu được tiến hành để đánh giá ảnh hưởng của protodioscin phân lập từ tỳ giải đến hoạt động tình dục. Chưa rõ liệu sự có mặt của protodioscin có ảnh hưởng đến kết quả định lượng testosterone trong huyết thanh của chuột cống đực non thiếu và chuột cống đực non cai sữa hay không.

Các phytoandrogen-ogenic là các hợp chất có khả năng kích thích sản xuất các androgen trong cơ thể bằng cách kích thích trực tiếp các mô sản xuất androgen, hoặc tác động vào trục vùng dưới đồi-tuyến yên-tuyến sinh dục làm tăng tổng hợp và bài tiết các gonadotropin. Bên cạnh đó, chúng cũng có thể ảnh hưởng đến sự chuyển đổi androgen thành estrogen, hoặc khả năng gắn của androgen với SHBG hoặc albumin [142]. Có thể tìm thấy loại phytoandrogen này trong nhiều dược liệu thành phần của TD0014.

Trên các nghiên cứu thực nghiệm, các furostanol saponin chính (gồm protodioscin và protogracillin) của bạch tật lê, trong đó chủ yếu là protodioscin, còn thể hiện vai trò là một phytoandrogen-ogenic với tác dụng kích thích sản xuất testosterone từ các tế bào Leydig, đồng thời làm tăng nồng độ chất chuyển hóa có

hoạt tính mạnh của testosterone là dihydrotestosteron [73]. Bạch tật lê còn có khả năng kích thích tuyến yên sản xuất các gonadotropin [144], thậm chí Esfandiari và cộng sự (2011) còn cho rằng bạch tật lê có hoạt tính giống LH nên có thể cảm ứng bài tiết testosterone [145]. Ngoài ra, hiệu quả làm tăng sản xuất testosterone của bạch tật lê còn có thể liên quan đến tác dụng làm tăng lượng dehydroepiandrosteron (DHEA) trong máu [146]. DHEA là một steroid quan trọng lưu hành trong vòng tuần hoàn, được tổng hợp chủ yếu bởi tuyến thượng thận và một phần nhỏ bởi tuyến sinh dục, đây là tiền chất chủ yếu của cả androgen và estrogen. Trên trung ương, DHEA còn thể hiện vai trò như một chất đối kháng GABA giúp thúc đẩy hoạt động tình dục. Cùng với tăng nồng độ DHEA, hoạt tính  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, enzym xúc tác cho quá trình chuyển androstenedion thành testosterone, cũng có xu hướng mạnh hơn khi có mặt bạch tật lê [146]. Có thể thấy, bạch tật lê có thể có những tác động tích cực tới con đường tổng hợp testosterone “ngoài tinh hoàn”, đây có thể là lý do giúp giải thích phần nào cho tác dụng làm tăng nồng độ testosterone trong huyết thanh chuột cống đực non thiếu của TD0014.



**Hình 4.2.** Mối liên quan giữa DHEA-S với nồng độ testosterone [146]

*3β-HSD, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase; 17β-HSD, 17β-hydroxysteroid dehydrogenase*



Bá bệnh cũng được xác định là dược liệu có chứa thành phần phytoandrogenic. Thành phần eurycomanon trong bá bệnh được chứng minh là có tác dụng kích thích sản xuất testosterone tại các tế bào Leydig của tinh hoàn chuột cống bằng cách ức chế aromatase chuyển testosterone thành estrogen, và cũng có thể liên quan đến ức chế phosphodiesterase [76]. Nghiên cứu của Pramoto (2017) còn cho thấy, dịch chiết từ rễ bá bệnh có khả năng ảnh hưởng đến hoạt động của vùng dưới đồi-tuyến yên, cụ thể hơn là làm tăng số lượng và hoạt động của các tế bào ura base chịu trách nhiệm sản xuất LH ở thùy trước của tuyến yên, từ đó kích thích các tế bào Leydig tăng sản xuất androgen, DHEA và testosterone [75]. Một phức hợp polypeptid có hoạt tính sinh học được gọi là các “europeptid” với các đặc tính giúp tăng cường tình dục cũng đã được xác định trong rễ bá bệnh [74],[147]. Các europeptid ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp androgen bằng cách làm tăng nồng độ DHEA, DHEA sẽ tác động trên các androgen receptor để khởi động quá trình chuyển androstenedion và androstenediol thành testosterone và estrogen, tương ứng [74]. Cơ chế làm tăng nồng độ DHEA của các europeptid có liên quan với tăng hoạt hóa CYP17 enzym (17 alpha-hydroxylase và 17,20 lyase) để tăng chuyển hóa pregnenolon và progesteron thành DHEA và androstenedion, tương ứng [148]. Ảnh hưởng của các europeptid đến DHEA và CYP17 enzym có thể làm tăng hoạt động tổng hợp testosterone tại tuyến thượng thận, hiệp đồng với bạch tật lê giúp làm tăng lượng testosterone trong máu động vật non thiếu khi uống TD0014. Ngoài ra, các europeptid còn có thể làm giảm lượng SHBG và do đó làm tăng nồng độ testosterone tự do trong máu [74].

Dịch chiết ethanol của nhục thung dung được chứng minh là có thể làm tăng nồng độ các hormon sinh dục bằng cách cảm ứng các enzym tổng hợp steroid tại tinh hoàn (ví dụ, CYP11A1, CYP17A1) [91], cũng như cảm ứng sự biểu hiện gen của 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (enzym chịu trách nhiệm tổng hợp testosterone), 5 $\alpha$ -reductase-2 và aldo-keto reductase (những enzym chịu trách nhiệm tổng hợp dihydrotestosterone) [87]. Nghiên cứu của Kong và cộng sự (2018) cũng cho thấy hiệu quả tương tự của dịch chiết nhục thung dung giàu thành phần

echinacosid trên các enzym này, bên cạnh đó các tác giả còn quan sát thấy sự tăng biểu hiện của StAR, phân tử protein chịu trách nhiệm vận chuyển cholesterol vào bên trong ty thể để khởi đầu cho quá trình tổng hợp testosterone [149]. Tác dụng làm tăng hoạt động của StAR và tăng hoạt tính của các enzym tham gia tổng hợp testosterone của nhục thung dung đã đóng góp thêm một cơ chế giúp giải thích tác dụng làm tăng nồng độ testosterone của TD0014 trên chuột cống đực non thiếu. Testosterone tham gia vào cơ chế feedback của trục vùng dưới đồi-tuyến yên-tuyến sinh dục bằng cách gắn vào androgen receptor có mặt ở cả vùng dưới đồi và tuyến yên, làm giảm sự bài tiết của các gonadotropin. Ngoài khả năng cảm ứng các enzym trực tiếp tham gia tổng hợp testosterone, hoạt chất echinacosid có mặt trong nhục thung dung còn có thể gắn với androgen receptor, ngăn cản vận chuyển thụ thể này từ bào tương vào nhân tế bào tại vùng dưới đồi, cơ chế feedback âm tính của hormon sinh dục bị ức chế, do đó làm tăng bài tiết GnRH từ vùng dưới đồi, LH từ tuyến yên và testosterone từ tinh hoàn [150].

Ba kích với thành phần chính là các polysaccharid cũng đã được chứng minh là có tác dụng làm tăng nồng độ hormon sinh dục trong nhiều nghiên cứu [80],[81]. Cơ chế tác dụng của ba kích chủ yếu liên quan đến điều hòa hoạt động của trục vùng dưới đồi-tuyến yên-tuyến sinh dục, cụ thể làm tăng bài tiết GnRH. Con đường Kiss1/GPR54, một chất điều hòa kích thích quan trọng của các neuron GnRH, đã được coi là “người gác cổng” của hoạt động sinh sản. Các kisspeptin sẽ gắn vào và hoạt hóa GPR54, tạo ra đáp ứng khử cực mạnh và kéo dài trong các neuron GnRH, và kích thích sự bài tiết GnRH thông qua hoạt hóa con đường PLC-Ca<sup>2+</sup>. Estrogen và testosterone làm giảm sự biểu hiện của Kiss1 neuron tại nhân cung (arcuate nucleus) của vùng dưới đồi, dẫn đến giảm bài tiết GnRH; đây chính là cơ chế điều hòa ngược âm tính của các hormon sinh dục đối với sự sản xuất GnRH [151]. Nghiên cứu của Zhu và cộng sự (2017) cho thấy, các polysaccharid được phân lập từ rễ ba kích làm tăng sự biểu hiện của Kiss1, GPR54, và GnRH tại nhân cung của vùng dưới đồi, kèm theo đó là sự gia tăng nồng độ GnRH, gonadotropin

và testosterone trong huyết thanh chuột cống bị giãn tĩnh mạch thừng tinh, một trong những nguyên nhân chính gây vô sinh nam [81].

Một số nghiên cứu về tác dụng tăng cường hoạt động tình dục của nhân sâm cũng cho thấy khả năng làm tăng nồng độ testosterone máu của dược liệu quý giá này [84]. Thành phần ginsenoside-Rb1 trong nhân sâm đã thể hiện vai trò là một phytoandrogen-ogenic trong nghiên cứu của Tsai và cộng sự (2003). Trong nghiên cứu này, các tác giả đã tiến hành phân lập thùy trước tuyến yên của chuột cống đực, đem các tế bào tuyến yên ủ với môi trường thích hợp có bổ sung thêm ginsenoside-Rb1. Sau thời gian ủ 30 phút, nồng độ LH được định lượng bằng kỹ thuật miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay). Số liệu thu được cho thấy, có sự gia tăng nồng độ LH phụ thuộc lượng ginsenoside-Rb1 bổ sung vào môi trường ủ, sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê với liều ginsenoside-Rb1 dao động từ  $10^{-6}$  tới  $10^{-4}$  M. Kết quả nghiên cứu *in vitro* này đã gợi ý rằng, ginsenoside-Rb1 có thể kích thích trực tiếp các tế bào thùy trước tuyến yên giải phóng LH, từ đó có thể liên quan đến tăng sản xuất và bài tiết testosterone từ các tế bào Leydig của tinh hoàn [152]. Bên cạnh hiệu quả làm tăng nồng độ testosterone máu, nhân sâm còn tăng cường khả năng đáp ứng với hormon này nhờ tác dụng làm tăng sự biểu hiện của androgen receptor, LH receptor, FSH receptor tại mô tinh hoàn. Chưa rõ thành phần hoạt chất nào chịu trách nhiệm chính cho tác dụng này của nhân sâm, có thể là các polysaccharid [153] hoặc là ginsenoside Rg3 [154].

Một số dược liệu khác trong sản phẩm TD0014 cũng đã thể hiện tác dụng kích thích bài tiết testosterone trong nhiều nghiên cứu như kỷ tử [94], thỏ ty tử [97], phá cố chi [101]. Các nhà khoa học vẫn đang tiếp tục tiến hành thêm nhiều thử nghiệm để xác định cụ thể hơn cơ chế chịu trách nhiệm cho hoạt tính androgen của các dược liệu này trên cả thực nghiệm và lâm sàng.

Nhóm phytoandrogen thứ ba là các hợp chất “bắt chước” tác dụng của androgen. Các hợp chất này không cần gắn vào androgen receptor và sẽ tạo ra một đáp ứng sinh lý tương tự các androgen. Đến hiện nay, các phytoandrogen được tìm ra thuộc nhóm này có cơ chế tác dụng chủ yếu liên quan đến sự giải phóng NO và

hoạt tính của phosphodiesterase, vì vậy các hợp chất này sẽ có ảnh hưởng nhiều hơn đến hoạt động cương dương. Vai trò của các dược liệu thành phần trong TD0014 có chứa nhóm phytoandrogen thứ ba sẽ được bàn luận nhiều hơn khi đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm thử trên áp lực thể hang của động vật thực nghiệm.

#### **4.2.2. Ảnh hưởng của TD0014 trên áp lực thể hang trên động vật thực nghiệm**

Cương dương là một hoạt động phức tạp hình thành dưới sự phối hợp của các yếu tố tâm thần, thần kinh, mạch máu, và hormon. Đây là một mắt xích quan trọng trong hoạt động tình dục ở nam giới. Rối loạn cương dương là tình trạng suy giảm chức năng sinh dục gặp khá phổ biến và có xu hướng ngày càng tăng [42]. Việc đánh giá ảnh hưởng của một thuốc đến chức năng cương dương là một bước cần thiết để sàng lọc và phát triển các thuốc điều trị suy sinh dục nam.

Đánh giá ảnh hưởng của thuốc thử đến chức năng cương dương có thể tiến hành trên động vật tỉnh như thỏ, chuột cống. Ưu điểm của phương pháp này là kỹ thuật thực hiện đơn giản, không xâm lấn, không cần phẫu thuật, không cần gây mê, không đòi hỏi nhiều máy móc và thiết bị phục vụ nghiên cứu; tuy nhiên, nhược điểm là tính chính xác không cao do chịu ảnh hưởng nhiều bởi ngoại cảnh và chủ quan của người quan sát, các số liệu nghiên cứu chưa cung cấp được các thông tin về chất lượng cương dương (áp lực thể hang) và sự biến đổi của huyết động trong đáp ứng cương. Để khắc phục nhược điểm này, các nhà khoa học tiến hành đặt một catheter vào trong thể hang để đo áp lực thể hang (ICP) của động vật thực nghiệm, và đây cũng là phương pháp đánh giá ảnh hưởng của thuốc thử đến chức năng cương dương được áp dụng phổ biến hiện nay. Phương pháp này có thể được tiến hành trên động vật gây mê hoặc động vật tỉnh. Đo ICP trên động vật tỉnh tức là theo dõi sự thay đổi ICP trong các hoạt động tự nhiên trong một số test nhờ một bộ cảm biến từ xa được cấy vào trong thể hang của động vật, điều này giúp giảm thiểu tối đa những tác động đến sinh lý cương dương, do đó các số liệu được cung cấp sẽ mang tính xác thực và có giá trị cao. Tuy nhiên, trong điều kiện Việt Nam hiện nay chưa thực hiện được đánh giá ICP trên động vật tỉnh. Vì vậy, trong nghiên cứu này,

ảnh hưởng của TD0014 đến chức năng cương dương được xác định bằng phương pháp đo ICP trên động vật gây mê.

Động vật thực nghiệm là chuột cống đực trưởng thành được gây mê để phẫu thuật bộc lộ thể hang và đặt catheter vào trong để đo ICP, đồng thời một catheter khác cũng được đặt vào động mạch cánh để đo huyết áp động mạch trung bình (MAP). Các catheter này đều được nối với một bộ chuyển đổi áp lực và hệ thống thu thập dữ liệu. Sử dụng một kích thích điện vào dây thần kinh thể hang để tạo nên những thay đổi trong ICP và MAP. Các chỉ số nghiên cứu được xác định bao gồm MAP, ICP (ICP nền trước kích thích, ICP đỉnh sau kích thích), sự thay đổi ICP theo thời gian, tỷ lệ ICP/MAP và thời gian đáp ứng với kích thích là thời gian tính từ lúc ngừng kích thích điện cho đến thời điểm duy trì được giá trị ICP cố định.

Ở trạng thái bình thường không có kích thích, dương vật ở trạng thái xù vẫn có một dung lượng máu tối thiểu lưu thông bên trong tạo một áp lực thể hang nhất định (ICP nền), áp lực này được duy trì nhờ sự cân bằng giữa các tín hiệu từ dây thần kinh giao cảm và phó giao cảm, và một lượng nhỏ NO được giải phóng ra từ các dây phó giao cảm NANC và nội mô mạch máu cùng với nồng độ cGMP nội bào ở mức thấp. Giá trị ICP nền trong nghiên cứu này được xác định tại thời điểm sau uống thuốc thử 2 giờ và trước khi kích thích điện vào dây thần kinh hang. Quan sát biểu đồ 3.2 có thể thấy, giá trị ICP nền ở lô uống thuốc chứng dương sildenafil liều 6 mg/kg/ngày (liều tương đương liều khuyến cáo dùng để điều trị rối loạn cương dương ở trên người, tính theo hệ số 6) tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học ( $p < 0,05$ ). Sildenafil là một chất ức chế PDE5 được cấp phép sử dụng rộng rãi trong điều trị rối loạn cương dương. Thuốc có cấu trúc tương tự cGMP nên sẽ gắn cạnh tranh với PDE5 và ức chế thủy phân cGMP, do đó làm tăng tác dụng của NO giúp kéo dài thời gian cương dương. Các chất ức chế PDE5 nói chung không đóng vai trò là yếu tố khởi động của quá trình cương dương, do đó, sau khi sử dụng thuốc, cần có các kích thích tình dục để hiện tượng cương dương có thể xảy ra [9]. Tuy nhiên, ở đây, giá trị ICP nền ở lô chuột uống sildenafil tức là áp lực thể hang khi chưa có kích thích đã tăng cao hơn so với lô không dùng thuốc. McAuley và

cộng sự (2001) đã tiêm trực tiếp liều cao sildenafil vào mô dương vật của thỏ, tại thời điểm chưa có kích thích dây thần kinh hang, hiện tượng cương dương đã xuất hiện ngay cả với sự có mặt của chất ức chế NO synthase, N( $\omega$ )-L-argininemethyl ester (L-NAME) [155]. Tương tự, Choi và cộng sự (2002) cũng đã tiêm trực tiếp vardenafil và sildenafil vào thể hang của thỏ, giá trị ICP được xác định trước khi kích thích dây thần kinh hang trong nghiên cứu này cũng cho kết quả tăng cao hơn so với lô đối chứng [156]. Lý do tại sao các chất ức chế PDE5 có thể làm tăng ICP khi không có kích thích chưa được biết rõ, các tác giả đưa ra giả thuyết cho rằng, ngoài cơ chế ức chế PDE5, nhóm thuốc này còn có thể gây giãn cơ trơn thể hang theo cơ chế độc lập với con đường NO/cGMP. Theo lý giải của McAuley và cộng sự (2001), sildenafil có cấu trúc tương tự cGMP, vì vậy khi ở nồng độ cao, thuốc có thể đóng vai trò như một chất tương tự cGMP tương tác với các protein (ngoài PDE5) được điều hòa bởi cGMP (ví dụ protein kinase G) [155]. Trong khi con đường NO/cGMP được xem như là một trong những con đường sinh lý chính điều hòa chức năng cương dương, vai trò của các con đường khác chưa thể loại trừ. Những con đường liên quan đến những chất chủ vận receptor ghép cặp với G-protein như PGE1 hoặc chất hoạt hóa adenylate cyclase (forskolin) có thể gây cương dương thông qua cAMP cũng được biết đến với vai trò gây giãn cơ trơn mạch máu. Khi ức chế cơ trơn thể hang cô lập của người với nồng độ cao sildenafil ( $\geq 1 \mu\text{M}$ ), một số nhà nghiên cứu đã nhận thấy có hiện tượng tăng tích lũy cAMP nội bào và cho rằng đây là tác dụng gián tiếp của chất ức chế PDE5. Các tác giả giải thích rằng, sự gia tăng cGMP có thể ức chế PDE3 và dẫn đến tích lũy cAMP và gây giãn cơ trơn [157].

Tiếp tục quan sát biểu đồ 3.2, giá trị ICP nền của lô chuột uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày (liều tương đương liều dùng dự kiến ở trên người, tính theo hệ số 6) cũng gia tăng đáng kể so với lô chứng sinh học. Điều này cho thấy, có thể chế phẩm này có hoạt tính tiền cương dương. Nghiên cứu riêng lẻ với dược liệu chiếm lượng lớn nhất trong TD0014, bạch tật lê, Adaikan và cộng sự (2000) đã nhận thấy bạch tật lê có thể có tác dụng tiền cương dương trên cơ trơn thể hang của

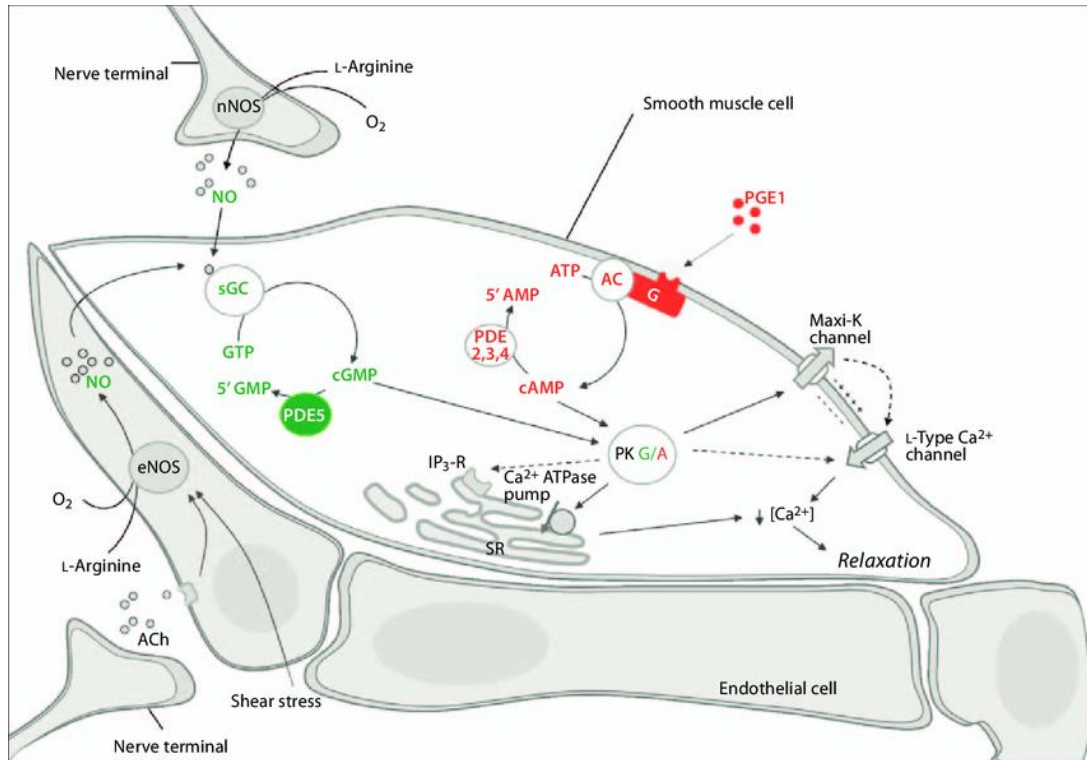
thỏ. Thỏ được uống chiết xuất bạch tật lê ở các liều 2,5, 5 và 10 mg/kg trong 8 tuần, sau đó sẽ tiến hành đánh giá đáp ứng của dương vật thỏ cô lập với các chất gây co và giãn cơ. Kết quả nghiên cứu cho thấy, đáp ứng giãn cơ của dương vật thỏ với acetylcholin, nitroglycerin và kích thích điện tăng thêm 10%, 24% và 10% so với nhóm chứng. Tác dụng này của bạch tật lê có thể do khả năng làm tăng giải phóng NO từ các tế bào nội mô và tận cùng thần kinh nitrergic [72], và thành phần chịu trách nhiệm cho tác dụng này của bạch tật lê được xác định là một hợp chất phenylethanoid glycoside, echinacosid [158]. Cơ chế làm giãn cơ trơn thể hang theo con đường NO/cGMP của bạch tật lê được khẳng định thêm khi trong một nghiên cứu khác của Do J và cộng sự (2013), tác dụng giãn cơ trơn thể hang cô lập của thỏ của dược liệu này đã bị ức chế khi loại bỏ lớp nội mô mạch máu; tuy nhiên các tác giả cũng phát hiện thêm rằng có hiện tượng tăng đáng kể nồng độ cAMP trong cơ trơn thể hang thỏ đã uống bạch tật lê [159], điều này đưa đến giả thuyết về ảnh hưởng của bạch tật lê đến một con đường khác ngoài NO/cGMP trong giãn cơ trơn thể hang. Bá bệnh và thỏ ty tử cũng có thể tham gia vào cơ chế làm tăng ICP khi chưa có kích thích của TD0014. Trong nghiên cứu *ex vivo* trên cơ trơn thể hang cô lập của chuột cống, phân đoạn dichloromethane từ dịch chiết ethanol của rễ bá bệnh đã thể hiện tác dụng đối kháng với sự co cơ trơn thể hang do angiotensin II thông qua ức chế angiotensin II type 1 receptor và tăng cường tác dụng giãn cơ của bradykinin nhờ ức chế enzym chuyển angiotensin [52]. Như vậy, theo nghiên cứu này, bá bệnh có thể tăng hiệu quả giãn cơ trơn thể hang theo cơ chế không phụ thuộc con đường NO/cGMP. Đối với thỏ ty tử, Sun K và cộng sự (2015) nhận thấy tác dụng làm giãn cơ trơn thể hang thỏ cô lập của dược liệu này là tác dụng phụ thuộc liều, và tác dụng này không bị ức chế hoàn toàn khi cơ trơn thể hang được ủ trước với chất ức chế NOS (N $\omega$  nitro-L-arginine-methyl ester, L-NAME), chất ức chế guanylyl cyclase (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, ODQ), hoặc một chất ức chế protein kinase A (KT 5720). Kết quả nghiên cứu này đã gợi ý rằng, ngoài tác động trên con đường NO-cGMP, thỏ ty tử có thể ảnh hưởng đến khả năng giãn cơ trơn thể hang thông qua những cơ chế khác [160].

Khi kích thích điện vào dây thần kinh, ICP ở tất cả các lô nghiên cứu đều tăng cao hơn rõ rệt so với thời điểm trước khi kích thích (biểu đồ 3.2). Cơ chế gây tăng áp lực thể hang của kích thích điện được giải thích như sau: quá trình tổng hợp và giải phóng NO, các tác dụng sinh học được tạo ra khi NO gắn với guanylyl cyclase được cho là có vai trò chủ yếu trong quá trình cương dương. NO được tổng hợp từ tiền chất là L-arginin dưới sự xúc tác của các isoform của enzym NO synthase (NOS). Tại dương vật, NO được tạo ra từ hai nguồn chính: trực tiếp được giải phóng từ sợi hậu hạch phó giao cảm non-adrenergic non-cholinergic (NANC) với vai trò của nNOS, và gián tiếp được tạo ra từ lớp tế bào nội mô mạch máu và cơ trơn thể hang với vai trò của eNOS để đáp ứng với kích thích cholinergic [24]. Kích thích điện vào dây thần kinh hang gây khử cực thần kinh sẽ khởi động quá trình cương bằng cách hoạt hóa nNOS và một đợt giải phóng ngắn NO từ đầu tận cùng thần kinh dẫn đến giãn các động mạch và xoang hang, tăng lưu lượng dòng máu trong thể hang. Hoạt hóa PI3-kinase/Akt bởi các shear stress sẽ hoạt hóa eNOS trong các tế bào nội mô giúp duy trì sự gia tăng NO để tạo ra sự cương cứng tối đa mà không cần sự khử cực thần kinh liên tục [24]. NO được tạo ra sẽ hoạt hóa guanylate cyclase, enzym xúc tác cho quá trình chuyển GTP thành chất truyền tin thứ 2 là cGMP (cyclic guanosine-3',5'-monophosphat). cGMP hoạt hóa các protein kinase phụ thuộc cGMP, từ đó phosphoryl hóa một số protein và kênh ion dẫn tới làm giảm nồng độ ion calci nội bào. Nồng độ ion calci nội bào là tín hiệu hoạt hóa myosin light-chain kinase (MLCK), do đó giảm nồng độ ion calci nội bào sẽ ức chế quá trình chuyển MLCK thành dạng có hoạt tính (MLCK\*), chuỗi nhẹ myosin không được phosphoryl hóa, giảm sự tương tác giữa myosin và actin, và từ đó làm giãn cơ trơn thể hang, dương vật sẽ trở nên cương cứng (hình 4.3). Sau giai đoạn cương dương, đạt cực khoái và xuất tinh, cGMP bị thủy phân bởi PDE5, dương vật trở lại trạng thái ban đầu [24].

Sildenafil với cơ chế ức chế PDE5 làm tăng lượng cGMP trong cơ trơn thể hang nên giá trị ICP đỉnh sau kích thích điện ở lô chuột uống thuốc này tăng cao đáng kể là điều dễ hiểu, kèm theo đó là diện tích đường cong ICP biểu thị sự thay



đổi ICP theo thời gian cũng cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô đối chứng (biểu đồ 3.3). Hiện tượng tích lũy cGMP sau khi dùng sildenafil cũng đã giúp duy trì thời gian cương, thời gian xì dương vật đến chậm hơn, thể hiện ở chỉ số thời gian đáp ứng với kích thích ở lô chứng dương kéo dài hơn đáng kể so với lô chứng sinh học ( $p < 0,05$ ) (bảng 3.19).



**Hình 4.3.** Những con đường dẫn đến giãn cơ trơn thể hang và cương dương [161]  
*AC, adenylyl cyclase; Ach, acetylcholine; ATP, adenosine triphosphate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; cGMP, cyclic guanosine-3',5'-monophosphate; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; G, G-protein; GTP, guanosine triphosphate; IP3-R, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; PDE, phosphodiesterase; PGE1, prostaglandin E1; sGC, soluble guanylate cyclase; SR, sarcoplasmic reticulum*

Sau kích thích điện vào dây thần kinh hang, TD0014 liều 1,8 g được liệu/kg/ngày có xu hướng làm tăng trị số ICP đỉnh, diện tích dưới đường cong ICP và thời gian đáp ứng với kích thích tức thời thời gian cương dương so với lô chứng sinh học, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Sự thay đổi ICP trước và sau khi kích thích điện vào dây thần kinh hang đã gợi ý rằng, TD0014 liều tương đương lâm sàng dùng một lần trước kích thích 2 giờ có thể mang lại lợi ích

với những bệnh nhân rối loạn cương dương, giúp làm tăng rõ rệt ICP nền, từ đó tạo thuận lợi cho hoạt động cương dương tiếp theo với tăng nhẹ ICP trong thời gian cương (thể hiện ở ICP đỉnh tăng 11,97% và diện tích dưới đường cong ICP tăng 25,44%) đồng thời giúp thời gian cương kéo dài hơn. Có thể thấy, mức tăng giá trị ICP sau kích thích ở lô TD0014 trong nghiên cứu này (11,97%) là tương đương với mức tăng thêm giãn cơ của dương vật thỏ cô lập với kích thích điện (10%) với sự có mặt của bạch tật lê trong nghiên cứu của Adaikan và cộng sự (2000) [72].

Tham gia vào xu hướng cải thiện chức năng cương dương của TD0014 có thể kể đến ảnh hưởng của một số dược liệu thành phần gây giãn cơ tron thể hang chủ yếu qua con đường NO/cGMP và cũng có thể qua con đường khác. Trước hết là vai trò của bạch tật lê, cụ thể hơn là thành phần echinacosid trong bạch tật lê, đã được nhắc đến ở trên với các tác dụng tiền cương làm tăng áp lực thể hang trước kích thích thông qua cả con đường NO/cGMP [72],[158] và con đường khác liên quan đến cAMP [159], từ đó tạo nền tảng thuận lợi cho các giai đoạn tiếp theo của hoạt động cương dương. Hỗ trợ thêm vào tác dụng tiền cương của TD0014 là khả năng làm suy giảm hoạt tính gây co mạch của angiotensin II và tăng cường hoạt tính giãn mạch của bradykinin do tác dụng ức chế angiotensin II type 1 receptor và ức chế enzym chuyển angiotensin của bá bệnh [52]. Sau khi có kích thích, mức độ cương cứng của dương vật được duy trì chủ yếu nhờ hoạt động sản xuất NO dưới sự xúc tác của eNOS trong các tế bào nội mô mạch máu [24]. Leung KW và cộng sự (2006) đã báo cáo rằng, thành phần ginsenoside Rg1 trong nhân sâm có thể đóng vai trò là một chất chủ vận của glucocorticoid receptor, và hoạt hóa glucocorticoid receptor có thể cảm ứng nhanh sự sản xuất NO từ eNOS thông qua con đường PI3K/Akt không phiên mã [162]. Bên cạnh tác dụng làm tăng giải phóng NO, các tác giả còn quan sát thấy hiện tượng tích lũy cGMP trong cơ tron thể hang cô lập của thỏ được ủ với ginsenoside Rg1, và giá trị IC50 (nồng độ ức chế 50%) của Rg1 đối với PDE5 được xác định là  $12,47 \pm 2,31$  nmol/L [84]. Đương qui và xuyên khung cũng là những dược liệu giúp tăng cường hoạt động cương dương nhờ các tác động đến NO/cGMP với tác dụng làm tăng hoạt tính NOS của đương qui [30],

và tác dụng ức chế cAMP phosphodiesterase hoặc cGMP phosphodiesterase của hoạt chất chuanxiongine phân lập từ xuyên khung [102]. Ngoài ra, thỏ ty tử cũng thể hiện tác dụng làm giảm đáng kể trương lực cơ thể hang và tăng nồng độ cAMP và cGMP trong mô thể hang thỏ cô lập, điều này cho thấy cơ chế tác dụng của dược liệu này cũng có một phần liên quan đến con đường NO-cGMP [160]. Như vậy, thành phần echinacosid trong bạch tật lê, ginsenoside Rg1 trong nhân sâm, chuanxiongine trong xuyên khung, và các hoạt chất cần được xác định cụ thể trong bá bệnh, đương qui và thỏ ty tử có thể được xếp vào nhóm phytoandrogen thứ ba, các phytoandrogen tạo ra một đáp ứng sinh lý tương tự các androgen mà không cần gắn vào androgen receptor.

Như đã bàn luận trong mục 4.2.1.2, đến hiện nay, các phytoandrogen được tìm ra thuộc nhóm “bất chức” tác dụng của androgen có cơ chế tác dụng chủ yếu liên quan đến sự giải phóng NO và hoạt tính của phosphodiesterase. Vậy các androgen ảnh hưởng đến sự giải phóng NO và hoạt tính của phosphodiesterase như thế nào? Trong một số thử nghiệm lâm sàng trên các bệnh nhân rối loạn cương dương, các tác giả nhận thấy, việc bổ sung testosterone có thể cải thiện đáp ứng với chất ức chế phosphodiesterase 5, sildenafil, từ đó làm tăng rõ rệt các chỉ số về chức năng cương dương của bệnh nhân [163]. Cơ chế làm tăng đáp ứng với các chất ức chế PDE5 của testosterone vẫn chưa rõ ràng, tuy nhiên, dựa trên các dữ liệu nghiên cứu trên động vật, testosterone có thể hoạt hóa NO synthase [164],[165], từ đó làm tăng hiệu lực của NO và chất truyền tin thứ hai cGMP trong mô dương vật, hiệp đồng với các chất ức chế phosphodiesterase 5 giúp làm tăng khả năng cương dương. Điều này cho thấy, các dược liệu có tác dụng làm tăng nồng độ testosterone máu cũng có thể tham gia vào xu hướng cải thiện chức năng cương dương của TD0014, bao gồm các dược liệu có chứa phytoandrogen thật (protodioscin trong bạch tật lê) và các dược liệu có chứa phytoandrogen-ogenic có khả năng kích thích sản xuất các androgen trong cơ thể (bạch tật lê, bá bệnh, nhục thung dung, ba kích, nhân sâm, kỷ tử, thỏ ty tử, phá cố chi).

Tỷ số ICP đỉnh/MAP biểu thị mối tương quan giữa mức độ giãn cơ tron thể hang và các động mạch sâu trong dương vật, trong đó MAP đại diện cho khả năng bơm máu vào dương vật. Các thuốc làm tăng MAP sẽ làm giảm tỷ số ICP đỉnh/MAP, và ngược lại, các thuốc làm giảm MAP sẽ làm tăng tỷ số ICP đỉnh/MAP. Mức tăng tối ưu của ICP đỉnh nên được xác định bởi sự thay đổi cân bằng trong ICP đỉnh/MAP và MAP. Số liệu ở bảng 3.20 cho thấy, giá trị MAP ở lô chuột uống sildenafil giảm nhẹ khoảng 10 mmHg, cùng với sự tăng cao rõ rệt của ICP đỉnh đã làm cho tỷ số ICP đỉnh/MAP giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học. Vì vậy, trong thực hành lâm sàng, sildenafil cũng như các thuốc ức chế PDE5 khác nên được sử dụng thận trọng trên những bệnh nhân có vấn đề về tim mạch do nguy cơ gây giãn mạch của thuốc [9],[23]. Tại lô chuột uống TD0014, giá trị MAP không có sự thay đổi đáng kể và tỷ số ICP đỉnh/MAP không có sự khác biệt so với lô chứng sinh học. Nghiên cứu *in vivo* về ảnh hưởng của thành phần chuanxiongzine trong xuyên khung đến ICP cũng cho kết quả tương tự về những thay đổi trong huyết áp sau khi tiêm hoạt chất này vào thể hang của thỏ, bao gồm không thay đổi huyết áp tâm thu, huyết áp trung bình và nhịp tim [102]. Như vậy, TD0014 có xu hướng cải thiện khả năng giãn cơ tron thể hang mà không gây ảnh hưởng đến huyết áp động mạch trung bình, điều này giúp hạn chế sự xuất hiện các tác dụng phụ cần lưu ý trên huyết áp và tim mạch khi sử dụng các thuốc điều trị rối loạn cương dương có cơ chế liên quan đến cGMP hoặc cAMP.

#### **4.3. Ảnh hưởng của TD0014 trên chức năng sinh sản của chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat**

Trên thực tế, những bệnh nhân nam chỉ tìm kiếm sự trợ giúp y tế khi họ có bệnh lý suy giảm sinh sản với mong muốn nhận được sự tư vấn về các biện pháp điều trị thích hợp. Do vậy, khi đánh giá hiệu quả của một thuốc mới trong hỗ trợ điều trị suy giảm sinh sản nam cần thiết phải thực hiện nghiên cứu trên những động vật bị gây suy giảm sinh sản. Các phương pháp được sử dụng hiện nay để gây suy giảm sinh sản trên động vật thực nghiệm bao gồm: suy giảm sinh sản do tuổi, suy

giảm sinh sản do stress, suy giảm sinh sản do nhiệt độ, suy giảm sinh sản do tia xạ, suy giảm sinh sản do thuốc/hóa chất, và suy giảm sinh sản do đột biến.

Mô hình gây suy giảm sinh sản do tuổi hoặc do stress thường đòi hỏi kỹ thuật phức tạp, thời gian nghiên cứu kéo dài, động vật thí nghiệm ngoài tình trạng suy giảm sinh sản còn có nhiều bệnh lý hoặc rối loạn kèm theo. Đối với mô hình gây suy giảm sinh sản do tia xạ hoặc hóa chất, mức độ suy giảm sinh sản do các tác nhân này gây ra thường nặng và kèm theo tình trạng suy giảm miễn dịch cùng với suy chức năng của nhiều cơ quan khác, do đó tỉ lệ động vật thí nghiệm chết trong quá trình nghiên cứu thường cao. Những mô hình suy giảm sinh sản do đột biến di truyền có ưu điểm là giúp các nhà nghiên cứu có thể xác định cụ thể hơn cơ chế tác dụng của thuốc thử liên quan đến chức năng sinh sản ở nam giới, vì vậy đây là mô hình rất có giá trị để nghiên cứu về bệnh lý suy giảm sinh sản nam với độ chính xác và độ tin cậy cao. Tuy nhiên, cho đến nay, mô hình này vẫn chưa thấy được áp dụng trong điều kiện nghiên cứu ở Việt Nam.

Natri valproat (NVP) là một thuốc chống động kinh được sử dụng rộng rãi trên lâm sàng trong các trường hợp động kinh toàn thể, động kinh cục bộ hoặc các thể động kinh khác [166]. Nhiều nghiên cứu được thực hiện trên những bệnh nhân động kinh cho thấy, sử dụng NVP kéo dài có thể dẫn đến xuất hiện những ảnh hưởng xấu tới hoạt động sinh sản của nam giới như giảm nồng độ các hormon sinh dục, giảm số lượng và chất lượng tinh trùng [167]. Các nghiên cứu trên động vật thực nghiệm cũng cho thấy các tác động có hại tương tự của NVP đối với cấu trúc và chức năng của các cơ quan sinh dục đực [65],[168]. Vì vậy, nhiều nhà khoa học đã sử dụng NVP như một tác nhân gây suy giảm sinh sản trên động vật giống đực.

Một số nghiên cứu đã chỉ ra mối quan hệ giữa liều NVP và mức độ suy giảm hoạt động của trục hormon và chất lượng tinh dịch. Nishimura và cộng sự (2000) đã tiến hành đánh giá ảnh hưởng của NVP lên các cơ quan sinh dục và hoạt động sinh sản của chuột cống đực ở các mức liều 250, 500 và 1000 mg/kg/ngày trong 4, 7 và 10 tuần. Kết quả nghiên cứu cho thấy, NVP với liều 500 mg/kg uống liên tục trong 7 tuần gây nên tình trạng suy sinh dục rõ rệt nhất trên chuột cống đực trưởng thành

[65]. Một nghiên cứu khác của Bairy và cộng sự (2010) về độc tính sinh sản của NVP được tiến hành trên chuột cống đực với 2 mức liều 200 và 400 mg/kg/ngày uống liên tục trong 60 ngày. Từ các số liệu của nghiên cứu được xác định tại các thời điểm 2, 4, 5, 7, 10 và 15 tuần sau khi ngừng thuốc, các tác giả cũng đã nhận thấy mối tương quan tỷ lệ thuận giữa mức độ độc tính trên cơ quan sinh sản của NVP với liều dùng [168]. Tại Việt Nam, NVP liều 500 mg/kg/ngày uống trong thời gian 7 tuần cũng đã được một số tác giả ứng dụng thành công để gây mô hình suy giảm sinh sản trên chuột cống đực nhằm đánh giá tác dụng của một số dược liệu [31],[78],[88]. Từ các kết quả nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn mô hình gây suy giảm sinh sản trên chuột cống đực bằng cách cho động vật thực nghiệm uống NVP liều 500 mg/kg/ngày liên tục trong 7 tuần, trên cơ sở đó đánh giá tác dụng bảo vệ và phục hồi của TD0014 đối với chức năng sinh sản của chuột cống đực.

#### **4.3.1. Ảnh hưởng của natri valproat đến cơ quan sinh dục đực**

Các số liệu của các lô mô hình trong nghiên cứu của chúng tôi (nghiên cứu tác dụng bảo vệ và nghiên cứu tác dụng phục hồi) đều cho thấy độc tính rõ ràng của NVP trên cấu trúc và chức năng của các cơ quan sinh dục.

Tinh hoàn của chuột cống đực uống NVP có sự suy giảm cấu trúc trầm trọng với trọng lượng tinh hoàn giảm rõ rệt, ống sinh tinh teo nhỏ, hình ảnh mô học tinh hoàn có biểu mô tinh mỏng, không có đầy đủ các tế bào dòng tinh. Theo Bairy và cộng sự (2010), NVP có thể ảnh hưởng xấu đến cả tinh nguyên bào (spermatogonia), tiền tinh trùng (spermatid) và tinh trùng (spermatocyte), trong đó tinh nguyên bào bị ảnh hưởng nhiều nhất, từ đó làm suy giảm đáng kể số lượng tinh trùng được sản xuất ra [168]. Tương ứng với hình ảnh mô học tinh hoàn, mật độ tinh trùng của các chuột cống đực uống NVP giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học.

Chất lượng tinh trùng ở lô mô hình cũng rất thấp với tỷ lệ sống của tinh trùng chỉ đạt < 60% (so với tỷ lệ sống của tinh trùng ở lô chứng sinh học là > 90% và 70%, tương ứng với nghiên cứu tác dụng bảo vệ và nghiên cứu tác dụng phục hồi) (bảng 3.23 và bảng 3.31), phần lớn tinh trùng không di động, tỷ lệ bất thường đầu,

cổ và đuôi của tinh trùng đều tăng cao hơn so với lô không uống NVP. NVP được biết đến là hợp chất có thể làm tổn hại chức năng của ty thể [169]. Ty thể cần thiết cho việc sản xuất năng lượng của các tế bào, và khả năng vận động của tinh trùng đòi hỏi chức năng của ty thể bình thường, do đó ảnh hưởng của NVP tới ty thể có thể là một trong những nguyên nhân làm giảm khả năng sống và vận động của tinh trùng. Protein Ki-67 là một marker tăng sinh tế bào [170]. Tại tinh hoàn, phân tử protein này có mặt trong nhân của tinh nguyên bào và tế bào Sertoli. Giảm sự biểu hiện của Ki-67 tại tinh hoàn do NVP có thể là nguyên nhân tiếp theo gây giảm sự tăng sinh của các tế bào mầm, quá trình sinh tinh bị ngừng lại cùng với các tổn thương tại tinh hoàn và ống sinh tinh [171].

Testosteron là yếu tố cần thiết cho ít nhất bốn quá trình quan trọng của quá trình sản sinh tinh trùng: duy trì hàng rào máu-tinh hoàn, quá trình phân chia tế bào giảm nhiễm (meiosis), sự bám dính Sertoli-tiền tinh trùng, và sự giải phóng tinh trùng [172], do đó thiếu hụt testosteron cũng là một nguyên nhân gây giảm số lượng và chất lượng tinh trùng. Số liệu ở bảng 3.25 và 3.34 cho thấy, nồng độ testosteron huyết thanh ở lô mô hình thấp hơn đáng kể so với lô chứng sinh học, điều này có thể do những tác động trực tiếp hoặc gián tiếp của NVP đến quá trình tổng hợp và bài tiết testosteron. Tại tinh hoàn, testosteron được tổng hợp tại các tế bào Leydig từ tiền chất là cholesterol, hợp chất này được vận chuyển qua màng ty thể nằm trong bào tương tế bào Leydig nhờ các StAR protein; testosteron sau khi được tạo ra tác động thông qua các androgen receptor (AR) có mặt ở các tế bào Sertoli, tế bào peritubular myoid, và các tế bào Leydig ở tinh hoàn cũng như các tế bào biểu mô và tế bào đệm của mào tinh sẽ cung cấp những tín hiệu quan trọng giúp duy trì hoạt động sinh tinh. Các nghiên cứu *in vitro* cho thấy, NVP làm giảm sự biểu hiện của các gen StAR, CYP11A1 và CYP17A1 [173], và các protein AR [171], do đó đây có thể là nguyên nhân trực tiếp gây giảm sản xuất testosteron và dẫn đến giảm khả năng sản sinh tinh trùng của NVP. Ảnh hưởng của NVP đến nồng độ FSH và LH có thể là nguyên nhân gián tiếp làm giảm sản xuất testosteron và tác động tiêu cực đến sản sinh tinh trùng. FSH và LH là những gonadotropin được bài tiết từ thùy trước

của tuyến yên. LH, ở nam giới còn được gọi là hormon kích thích tế bào kẽ (interstitial cell stimulating hormone – ICSH), có vai trò kích thích tế bào Leydig ở khoảng kẽ của tinh hoàn bài tiết testosterone. FSH có tác dụng kích thích sự phát triển của ống sinh tinh, kích thích tế bào Sertoli bài tiết dịch có chứa nhiều chất dinh dưỡng và một loại protein gắn với androgen (ABP) có vai trò vận chuyển testosterone và estrogen vào dịch lòng ống sinh tinh để giúp cho sự trưởng thành của tinh trùng [58]. Nghiên cứu của Al Snafi và cộng sự (2013) đã chỉ ra sự suy giảm đáng kể nồng độ testosterone cùng với FSH và LH trên chuột cống đực uống NVP liều 300 mg/kg trong 60 ngày [174]. Một vài giả thuyết đã được đưa ra để giải thích cho tác động của NVP đến nồng độ các gonadotropin. Quan sát trên những bệnh nhân động kinh sử dụng NVP, các nhà khoa học nhận thấy có sự gia tăng nồng độ estradiol và tiền chất của testosterone, androstenedion, điều này có thể tạo ra một feedback âm tính về vùng dưới đồi, dẫn đến làm giảm sản xuất các gonadotropin [167]. Tăng hoạt động của hệ GABAergic làm giảm giải phóng các gonadotropin cũng là một giả thuyết về ảnh hưởng của NVP đến nồng độ các hormon sinh dục [175].

Trọng lượng của các cơ quan sinh dục phụ là các chỉ số chịu ảnh hưởng của nồng độ testosterone trong huyết thanh liên quan đến sự thay đổi tốc độ hình thành protein trong các cơ quan đích. Số liệu trong các bảng 3.26, 3.27, 3.35 và 3.36 cho thấy trọng lượng của đầu dương vật, mào tinh, cơ nâng hậu môn-hành hang và các tuyến sinh dục phụ (túi tinh, tuyến tiền liệt, tuyến Cowper) của chuột cống đực uống NVP đều thấp hơn đáng kể so với lô chứng sinh học. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với tác dụng làm giảm sản xuất và bài tiết các hormon sinh dục của NVP đã được bàn luận ở trên.

Độc tính trên cơ quan sinh sản cùng với các tác động tiêu cực của NVP đến số lượng và chất lượng tinh trùng còn được thể hiện gián tiếp qua tỷ lệ mang thai của chuột cống cái sau thời gian 2 tuần ghép cặp. Trên mô hình nghiên cứu tác dụng bảo vệ, tỷ lệ chuột cái mang thai ở lô mô hình là 5%, và con số này là 0% trên mô hình nghiên cứu tác dụng phục hồi. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu khác cũng sử dụng NVP làm tác nhân gây suy giảm sinh sản trên chuột cống đực



[31],[78],[88]. Như vậy, có thể thấy NVP đã làm suy giảm rõ rệt khả năng sinh sản của chuột cống đực.

Bên cạnh độc tính trên cơ quan sinh sản, chúng tôi còn quan sát thấy hiện tượng giảm trọng lượng gan, thận, và tuyến thượng thận ở chuột cống đực của lô mô hình (bảng 3.28 và 3.37). Nghiên cứu của Jassim (2013) cũng chỉ ra độc tính trên gan và thận của NVP khi dùng liều 500 mg/kg trên chuột cống đực trong thời gian 7 tuần [176]. Suy giảm chức năng gan, thận cũng là những tác dụng không mong muốn thường gặp trên những bệnh nhân động kinh điều trị bằng NVP [166]. Hiện tượng giảm trọng lượng tuyến thượng thận ở lô mô hình cũng phù hợp với tình trạng giảm nồng độ testosterone huyết thanh do NVP gây ra vì tuyến thượng thận cũng là một cơ quan tham gia tổng hợp androgen trong cơ thể [58]. Như vậy, NVP không chỉ gây độc tính trên các cơ quan sinh sản, thuốc còn gây tác dụng bất lợi trên một số cơ quan khác trong cơ thể. NVP được chứng minh là có khả năng làm tăng sinh các gốc tự do gây tổn thương cấu trúc của tế bào, thúc đẩy quá trình apoptosis, do đó đây được xem là cơ chế chính dẫn đến suy giảm hoạt động của nhiều cơ quan trong cơ thể, bao gồm cả gan, thận, tuyến thượng thận và các cơ quan sinh sản, khi phơi nhiễm với NVP [177].

#### **4.3.2. Tác dụng bảo vệ của TD0014 trên chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat**

Nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ của TD0014 trên mô hình gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat được thực hiện bằng cách cho chuột cống đực uống song song NVP 500 mg/kg và thuốc thử liên tục trong thời gian 7 tuần. Sau 5 tuần nghiên cứu, tiến hành ghép chuột, 1 chuột đực được ghép ngẫu nhiên với 2 chuột cái trong thời gian 2 tuần. Kết thúc 7 tuần nghiên cứu, tiến hành xác định các chỉ số nghiên cứu trên chuột đực và chuột cái nhằm đánh giá trực tiếp và gián tiếp khả năng ức chế sự xuất hiện các dấu hiệu độc tính trên cơ quan sinh sản do NVP gây ra của TD0014.

Tác dụng bảo vệ cấu trúc tinh hoàn của TD0014 trước những ảnh hưởng xấu của NVP được thể hiện tại các biểu đồ 3.4, các bảng 3.21 và 3.22, và các hình từ 3.1

đến 3.8. TD0014 ở cả hai mức liều nghiên cứu đều có tác dụng làm tăng rõ rệt trọng lượng tinh hoàn so với lô mô hình. Hình ảnh mô học tinh hoàn của chuột cống đực uống TD0014 cũng cho thấy sự cải thiện so với lô mô hình, trong đó TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày thể hiện tác dụng tốt hơn liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày khi so sánh về mức tăng kích thước ống sinh tinh và tỷ lệ mẫu tinh hoàn có biểu mô tinh bình thường (83,3% và 50%, tương ứng).

Tinh hoàn có hai chức năng, chức năng ngoại tiết là sản sinh tinh trùng, chức năng nội tiết là bài tiết hormon sinh dục nam mà chủ yếu là testosterone [58]. Tác dụng bảo vệ chức năng tinh hoàn của TD0014 trước những tác động tiêu cực của TD0014 được thể hiện trực tiếp và gián tiếp trong các bảng từ 3.23 đến 3.27, và các biểu đồ 3.5 đến 3.7.

Chức năng sản sinh tinh trùng của tinh hoàn được đánh giá dựa vào các chỉ số về số lượng và chất lượng tinh trùng. Quá trình sản sinh tinh trùng từ tế bào mầm diễn ra trong các ống sinh tinh, tinh trùng sau đó được đưa vào mào tinh hoàn. Tinh trùng lấy từ ống sinh tinh hoặc phần đầu của mào tinh hoàn không có khả năng vận động và không thể thụ tinh với noãn. Sự thành thực của tinh trùng tiếp tục diễn ra trong thời gian tinh trùng di chuyển trong mào tinh hoàn, và đuôi mào tinh là nơi chứa các tinh trùng trưởng thành [58]. Vì vậy, cần lấy tinh trùng ở đuôi mào tinh để phân tích và xác định các chỉ số về số lượng và chất lượng tinh trùng.

Số lượng tinh trùng là một trong những xét nghiệm nhạy cảm nhất đối với sự sinh tinh trùng, vì nó cho kết quả tích lũy của tất cả các giai đoạn trong quá trình sản xuất tinh trùng, và chỉ số này có tương quan cao với khả năng sinh sản [168]. Mật độ tinh trùng là giá trị giúp đánh giá gián tiếp số lượng tinh trùng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, TD0014 uống trong 7 tuần ở cả hai mức liều nghiên cứu đều làm tăng đáng kể mật độ tinh trùng so với lô mô hình ( $p < 0,001$ ). Khi đánh giá về chất lượng tinh trùng thông qua các chỉ số về tỷ lệ sống của tinh trùng, độ di động của tinh trùng và những bất thường trong hình thái tinh trùng có thể nhận thấy, TD0014 ở mức liều cao 5,4 g dược liệu/kg/ngày mới thể hiện rõ rệt được tác dụng bảo vệ chức năng sản sinh tinh trùng của tinh hoàn, với khả năng làm tăng có ý

nghĩa thống kê tỷ lệ sống của tinh trùng, giảm tỷ lệ bất thường đầu, cổ, đuôi của tinh trùng, nhờ vậy khả năng di động của tinh trùng cũng tốt hơn với sự xuất hiện của các tinh trùng tiến tới nhanh và tiến tới chậm (so với 100% tinh trùng không di động ở lô mô hình). Tác động tích cực của TD0014 trong việc làm tăng được số lượng và chất lượng tinh trùng còn được thể hiện gián tiếp qua tỷ lệ mang thai của chuột cống cái sau thời gian ghép cặp 2 tuần. Tỷ lệ mang thai ở lô mô hình chỉ đạt 5%, trong khi đó ở lô TD0014 liều thấp là 10% và tăng cao rõ rệt hơn là ở lô TD0014 liều cao với 30% (biểu đồ 3.7).

Ảnh hưởng của TD0014 đến chức năng nội tiết của tinh hoàn được đánh giá thông qua xác định nồng độ testosterone huyết thanh. Kết quả cho thấy, cả hai mức liều nghiên cứu của TD0014 đều làm tăng có ý nghĩa thống kê nồng độ testosterone trong máu chuột cống đực, và TD0014 liều cao thể hiện tác dụng tốt hơn TD0014 liều thấp ( $p < 0,05$ ). Điều này có thể được giải thích một phần nhờ tác dụng của TD0014 trong việc duy trì tính toàn vẹn cấu trúc của tinh hoàn, đồng thời với khả năng làm tăng được trọng lượng của tuyến thượng thận so với lô mô hình (bảng 3.28). Kết quả này cũng phù hợp với hiệu quả của TD0014 giúp cải thiện chất lượng tinh dịch được nói đến ở trên. Trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ là các chỉ số chịu ảnh hưởng của nồng độ testosterone máu. TD0014 làm tăng nồng độ testosterone trong huyết thanh nên cũng có xu hướng làm tăng trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ so với lô mô hình. Có mối tương quan giữa mức tăng nồng độ testosterone huyết thanh của từng mức liều TD0014 với số lượng cơ quan sinh dục phụ có trọng lượng gia tăng đáng kể so với lô mô hình: TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày làm tăng rõ rệt trọng lượng của đầu dương vật và mào tinh; TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày, ngoài đầu dương vật và mào tinh, còn làm tăng có ý nghĩa thống kê trọng lượng túi tinh và tuyến Cowper (bảng 3.26 và bảng 3.27).

Từ các kết quả nghiên cứu ở trên có thể thấy rằng, TD0014 thể hiện được tác dụng bảo vệ trên mô hình gây suy giảm sinh sản bằng NVP, và liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày thể hiện tác dụng tốt hơn liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày.

### **4.3.3. Tác dụng phục hồi của TD0014 trên chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat**

Nghiên cứu đánh giá tác dụng phục hồi của TD0014 trên mô hình gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat được thực hiện bằng cách cho chuột cống đực uống NVP liều 500 mg/kg/ngày trong thời gian 7 tuần để gây suy giảm sinh sản. Sau 7 tuần uống NVP, chuột ở các lô được uống nước cất hoặc thuốc thử liên tục trong thời gian 10 ngày. Sau 10 ngày uống thuốc, tiến hành ghép chuột, 1 chuột đực được ghép ngẫu nhiên với 2 chuột cái trong thời gian 2 tuần. Kết thúc thời gian ghép cặp, tiến hành xác định các chỉ số nghiên cứu trên chuột đực và chuột cái nhằm đánh giá trực tiếp và gián tiếp khả năng phục hồi những tổn thương về cấu trúc và chức năng của cơ quan sinh sản do NVP gây ra của TD0014.

Quan sát số liệu ở lô chứng bệnh trong hai mô hình nghiên cứu bảo vệ và phục hồi có thể nhận thấy, một số biểu hiện độc tính trên cơ quan sinh sản của NVP ở mô hình phục hồi dường như nhẹ hơn so với mô hình bảo vệ, cụ thể: tỷ lệ mẫu tinh hoàn có cấu trúc bình thường cao hơn (50% so với 33,3%, tương ứng), tăng số lượng tinh trùng ( $60,44 \pm 16,48$  so với  $3,83 \pm 1,17$ , đơn vị  $10^6/\text{mL}$ , tương ứng), tinh trùng có hình thái bình thường nhiều hơn ( $44,14 \pm 3,67\%$  so với  $29,17 \pm 1,17\%$ , tương ứng), giảm tỷ lệ phần trăm tinh trùng không di động ( $86,67 \pm 2,96\%$  so với  $100,00 \pm 0,00\%$ , tương ứng), nồng độ testosterone huyết thanh tăng cao hơn ( $4,93 \pm 1,60$  nmol/L so với  $1,35 \pm 0,44$  nmol/L, tương ứng). Kết quả này có thể liên quan với thời gian xác định các chỉ số nghiên cứu khác nhau trong hai mô hình thử nghiệm. Các chỉ số nghiên cứu trong mô hình bảo vệ được đánh giá ngay sau khi kết thúc 7 tuần gây độc, trong khi đó, ở mô hình phục hồi, việc xác định các chỉ số nghiên cứu được tiến hành sau khi ngừng NVP gần 4 tuần. Điều này gợi ý rằng, sau khi ngừng phơi nhiễm với NVP, các cơ quan sinh sản có thể đã tự hồi phục tổn thương, thể hiện ở sự cải thiện của một vài chỉ số nghiên cứu. So sánh với lô chứng sinh học có thể thấy, sau gần 4 tuần ngừng NVP, tổn thương ở các cơ quan sinh sản mới chỉ hồi phục một phần chứ chưa hoàn toàn.

Khả năng gây độc tính sinh sản kéo dài cũng như mức độ tự hồi phục tổn thương sau khi ngừng sử dụng NVP đã được chứng minh trong một số nghiên cứu. Vijay và cộng sự (2008) đã tiến hành nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của NVP trên một số chỉ số sinh hóa về chức năng sinh sản trên chuột cống đực. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã cho chuột cống đực 12 tuần tuổi uống NVP liên tục trong thời gian 60 ngày, nồng độ testosterone trong dịch đồng thể tinh hoàn được định lượng tại các thời điểm 2, 4, 5, 7, 10 và 15 tuần sau khi ngừng thuốc. Số liệu nghiên cứu này cho thấy, nồng độ testosterone trong dịch đồng thể tinh hoàn ở các lô uống NVP giảm đáng kể so với lô chứng sinh học, tình trạng giảm này kéo dài đến tận 7 tuần sau khi ngừng thuốc; chỉ số này dần hồi phục và đạt mức tương đương với lô chứng sinh học tại thời điểm 15 tuần sau khi ngừng thuốc [178]. Một nghiên cứu khác của Bairy và cộng sự (2010) với thiết kế nghiên cứu tương tự như trên cũng đã chỉ ra sự hồi phục của một số chỉ số đánh giá chức năng sinh sản của chuột cống đực bắt đầu xuất hiện từ tuần thứ 7 sau khi ngừng thuốc, độ di động của tinh trùng có thể hồi phục hoàn toàn sau 10 tuần ngừng NVP, số lượng và hình thái tinh trùng cùng với kích thước ống sinh tinh sẽ trở về bình thường tại thời điểm 15 tuần sau khi ngừng NVP [168]. Nghiên cứu của chúng tôi được tiến hành kéo dài gần 4 tuần sau khi ngừng NVP, điều này đảm bảo mức độ suy giảm cấu trúc và chức năng của cơ quan sinh sản vẫn đủ để có thể quan sát được những tác động của thuốc thử đến sự phục hồi tổn thương của các cơ quan này.

Tác dụng phục hồi tổn thương cấu trúc tinh hoàn do NVP gây ra của TD0014 được thể hiện trong biểu đồ 3.8, bảng 3.29 và 3.30, và các hình từ 3.9 đến 3.16. Quan sát biểu đồ 3.8 nhận thấy, trọng lượng tinh hoàn ở 2 lô chuột uống TD0014 có xu hướng tăng cao hơn lô mô hình, trong đó mức tăng trọng lượng ở lô uống thuốc thử liều cao là khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Kích thước ống sinh tinh ở các lô uống TD0014 cũng tăng cao rõ rệt so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ mẫu tinh hoàn có cấu trúc bình thường ở các lô uống TD0014 là 66,7%, cao hơn so với lô mô hình (50%). Có thể thấy sự cải thiện trong hình ảnh mô học tinh hoàn ở các lô uống thuốc thử trong mô hình phục hồi chưa được rõ ràng như trong mô hình bảo

vệ. Điều này có thể là do thời gian uống TD0014 trong mô hình phục hồi ngắn (10 ngày), khoảng thời gian này chưa đủ để tạo nên những thay đổi rõ rệt trong cấu trúc tinh hoàn như trong mô hình bảo vệ có thời gian uống thuốc dài (7 tuần). Cần có những nghiên cứu tiến hành trong khoảng thời gian dài hơn để đánh giá tác động lâu dài của TD0014 trên sự phục hồi tổn thương cấu trúc tinh hoàn do NVP gây ra.

Sự suy giảm chức năng của tinh hoàn sau khi uống NVP cũng đã có những sự hồi phục nhất định khi có mặt TD0014. Với chức năng sản sinh tinh trùng, TD0014 đã giúp đẩy nhanh sự hồi phục cả về số lượng và chất lượng tinh trùng. TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg và 5,4 g dược liệu/kg đều làm gia tăng đáng kể mật độ tinh trùng so với lô mô hình ( $p < 0,001$ ). Tỷ lệ sống của tinh trùng cũng tăng cao hơn ở các lô uống thuốc thử, trong đó lô dùng thuốc thử liều cao thể hiện tác dụng tốt hơn với mức tăng có ý nghĩa thống kê khi so với lô mô hình (bảng 3.31). Các chỉ số khác về chất lượng tinh trùng, bao gồm hình thái và khả năng di động của tinh trùng, đều cho thấy mức độ phục hồi rõ rệt khi sử dụng TD0014: tỷ lệ phần trăm tinh trùng có hình thái bình thường tăng, đồng nghĩa với giảm tỷ lệ tinh trùng có hình thái bất thường đầu, cổ, đuôi; tỷ lệ tinh trùng không di động hoặc di động tại chỗ giảm, tăng sự có mặt của các tinh trùng có hoạt động tiến tới (bao gồm tiến tới nhanh và tiến tới chậm) tương ứng với tốc độ di động của tinh trùng nhanh hơn. Tỷ lệ mang thai ở chuột cống cái được ghép cặp với các chuột đực uống thuốc thử cũng đã gián tiếp phản ánh các tác động tích cực của TD0014 trên số lượng và chất lượng tinh trùng: tỷ lệ mang thai lần lượt là 11,1% và 16,7% tương ứng với lô uống TD0014 liều thấp và liều cao, trong khi đó không có chuột cái nào mang thai khi ghép cặp với chuột đực ở lô mô hình (biểu đồ 3.10).

Với chức năng nội tiết của tinh hoàn, nồng độ testosterone trong huyết thanh ở các lô uống TD0014 có sự gia tăng đáng kể so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ , và tương tự như trong mô hình bảo vệ, TD0014 liều cao thể hiện tác dụng này tốt hơn liều thấp ( $p < 0,05$ ). Kết quả này phù hợp tác dụng phục hồi tổn thương cấu trúc tinh hoàn của TD0014 đã được nói đến ở trên, bên cạnh đó, xu hướng tăng trọng lượng tuyến thượng thận ở lô sử dụng chế phẩm thử

so với lô mô hình cũng đóng góp thêm cơ chế giúp tăng lượng testosterone trong máu (bảng 3.37). Tương ứng với mức tăng nồng độ testosterone là sự gia tăng trọng lượng một số cơ quan sinh dục phụ ở lô uống TD0014 so với lô mô hình. Ở lô uống TD0014 liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày, trọng lượng của túi tinh và cơ nâng hậu môn-hành hang tăng cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Với TD0014 liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày, ngoài túi tinh và cơ nâng, mức tăng có ý nghĩa thống kê còn được quan sát thấy khi xác định trọng lượng của mào tinh (bảng 3.35 và 3.36).

Từ các kết quả nghiên cứu ở trên có thể thấy rằng, TD0014 thể hiện được tác dụng phục hồi trên mô hình gây suy giảm sinh sản bằng NVP, và tương tự trong mô hình bảo vệ, liều 5,4 g dược liệu/kg/ngày thể hiện tác dụng tốt hơn liều 1,8 g dược liệu/kg/ngày.

Với các kết quả nghiên cứu đã nêu ở trên, chúng tôi đưa ra nhận định rằng, TD0014 có thể ngăn chặn các tác động có hại của NVP đến cơ quan sinh sản, đồng thời sự phục hồi các tổn thương cả về cấu trúc và chức năng của các cơ quan này sẽ được đẩy nhanh nhờ sự có mặt của TD0014. Cơ chế thực sự về tác dụng bảo vệ và phục hồi của TD0014 trước ảnh hưởng của NVP đối với cấu trúc và hoạt động của các cơ quan sinh dục chưa được xác định. Tuy nhiên, dựa trên kết quả những nghiên cứu riêng lẻ về các dược liệu thành phần trong TD0014 có thể giải thích phần nào hiệu quả của bài thuốc trên mô hình nghiên cứu này.

NVP có thể ức chế quá trình tổng hợp và bài tiết testosterone trong cơ thể thông qua các tác động trực tiếp tại tinh hoàn hoặc gián tiếp ảnh hưởng đến sự bài tiết các gonadotropin. NVP tác động trực tiếp đến sự sản sinh testosterone tại tinh hoàn bằng cách làm giảm sự biểu hiện của các gen StAR, CYP11A1 và CYP17A1 [173], và các protein AR [171]. Những giả thuyết về tác dụng làm giảm sự bài tiết các gonadotropin của NVP bao gồm tăng nồng độ estradiol và androstenedion tạo ra một feedback âm tính về vùng dưới đồi [167], và tăng hoạt động của hệ GABAergic [175]. Trong sản phẩm TD0014, các vị thuốc có tác dụng kích thích hoạt động tinh dục như bạch tật lê, bá bệnh, nhục thung dung, ba kích, kỷ tử, thỏ ty tử, nhân sâm, và phá cố chỉ đều thể hiện được tác dụng làm tăng nồng độ các hormon sinh dục

(testosteron, FSH, LH) trên nhiều nghiên cứu thực nghiệm và lâm sàng. Tác dụng này của các dược liệu có thể nhờ các hoạt chất phytoandrogen (bạch tật lê, bá bệnh, nhục thung dung, ba kích, nhân sâm) hoặc theo các cơ chế khác (kỷ tử, thỏ ty tử, phá cố chỉ) đang tiếp tục được nghiên cứu (*xem bàn luận mục 4.2.1.2*). Bên cạnh tác dụng làm tăng tổng hợp và bài tiết các hormon sinh dục, một số dược liệu như nhân sâm [153],[154], thỏ ty tử [98] còn có hiệu quả trong việc làm tăng độ nhạy cảm và khả năng đáp ứng với các hormon này tại các cơ quan đích thông qua tác dụng làm tăng sự biểu hiện của các androgen receptor, LH receptor và FSH receptor.

Một cơ chế quan trọng khác gây tổn thương các cơ quan của NVP là khả năng làm tăng sinh các gốc tự do gây độc tế bào do NVP có thể điều hòa hoạt tính của nhiều enzym liên quan đến stress oxy hóa. Trên nghiên cứu *in vitro*, NVP có thể làm giảm hoạt tính glutathione-S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), và catalase (CAT), đồng thời là sự tăng hoạt tính của xanthine oxidase và tăng nồng độ các sản phẩm peroxy hóa lipid ở vỏ não và tiểu não của chuột cống. Theo dõi trên các bệnh nhân động kinh sử dụng NVP, các nhà khoa học cũng nhận thấy hiện tượng giảm hoạt tính chống oxy hóa của SOD và CAT, cùng với đó là tăng hoạt tính của myeloperoxidase (MPO) và tăng nồng độ các sản phẩm peroxy hóa lipid trong huyết tương [177]. Với các quan sát nêu trên có thể thấy, NVP có thể làm suy yếu hoạt động của hệ thống bảo vệ chống oxy hóa tế bào (GST, GR, GPx, SOD, CAT), tăng sự hình thành các sản phẩm oxy hóa tế bào, từ đó nhiều cấu trúc của tế bào như các phân tử lipid, protein và acid nucleic bị tổn thương dẫn đến rối loạn chức năng của nhiều cơ quan trong cơ thể. Bên cạnh tác dụng kích thích hoạt động tình dục, các dược liệu như bạch tật lê, bá bệnh, nhục thung dung, ba kích, kỷ tử, thỏ ty tử, nhân sâm, phá cố chỉ, đương qui và xuyên khung có mặt trong TD0014 còn thể hiện tác dụng chống oxy hóa trong nhiều thử nghiệm. Nhiều dược liệu khác trong bài thuốc TD0014, mặc dù chưa có những nghiên cứu cho thấy hiệu quả của chúng này trong cải thiện hoạt động tình dục và chức năng sinh sản, nhưng đều đã được chứng



minh về tác dụng chống oxy hóa, do đó sẽ giúp bảo vệ các cơ quan sinh sản trước sự hình thành các gốc tự do do NVP gây ra.

Các nhà khoa học từ lâu đã nhận thấy thực vật là loài sinh vật sống sở hữu một loạt những cơ chế bảo vệ chống lại stress oxy hóa, bao gồm hệ thống chống oxy hóa enzym và không enzym (the enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems). Các enzym chống oxy hóa bao gồm superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POX), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) và glutathione reductase (GR), trong khi các chất chống oxy hóa không enzym có thể kể đến như các chất chuyển hóa tan trong nước (ascorbat, glutathion, các hợp chất phenolic) và tan trong dầu ( $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -caroten, lycopene) [179]. Các dược liệu thành phần của TD0014 có thể chống oxy hóa thông qua cả hai hệ thống này. Với hệ thống chống oxy hóa enzym, có thể kể đến vai trò của bá bệnh với thành phần SOD, enzym xúc tác cho quá trình phân hủy  $O_2\cdot$  thành  $H_2O_2$  [74]. Đối với hệ thống chống oxy hóa không enzym, với sự có mặt của nhiều loại dược liệu nên tác dụng chống oxy hóa của TD0014 có thể được xem là tác dụng hiệp đồng của nhiều thành phần, ví dụ như các hợp chất phenol (các flavonoid và các acid phenolic), các alkaloid, các polysaccharid, v.v..., trong đó nổi bật là vai trò của các flavonoid.

Flavonoid là một nhóm các hợp chất polyphenol có trọng lượng phân tử thấp được phân bố rộng rãi trong nhiều loài thực vật. Chúng có nhiều tác dụng sinh học mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe con người, trong đó khả năng chống oxy hóa là đặc tính được mô tả nhiều nhất của hợp chất này. Flavonoid có thể chống oxy hóa theo các cơ chế: (1) dọn sạch các gốc tự do bằng cách cho một nguyên tử hydro hoặc chuyển electron đơn; (2) liên kết với các ion kim loại như  $Fe^{2+}$  và  $Cu^+$ , ngăn chặn các ion này thực hiện quá trình oxy hóa; (3) ức chế hoạt động của các enzym tạo ra các gốc tự do (ví dụ: xanthine oxidase, lipoxygenase, protein kinase C, cyclooxygenase, microsomal monooxygenase, mitochondrial succinoxidase, và NADPH oxidase); và (4) cảm ứng các enzym chống oxy hóa nội bào (ví dụ: UDP-glucuronosyltransferase, sulfotransferase, N-acetyltransferase, glutathione S-transferase, methyltransferase) [180]. Do sự phân bố rộng rãi nên có thể tìm thấy

flavonoid trong nhiều dược liệu thành phần của TD0014 với tác dụng chống oxy hóa đã được chứng minh trong nhiều thử nghiệm, chủ yếu là các thử nghiệm dọn gốc tự do superoxide anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), DPPH $\cdot$ , ABTS $^{+}$ ; thử nghiệm tạo chelat với  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ; thử nghiệm TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity); v.v....

**Bảng 4.3.** Hợp chất phenol trong một số dược liệu thành phần của TD0014

<b>Dược liệu</b>	<b>Hợp chất phenol</b>
Bạch tật lê	Kaempferol, quercetin, rutin, di-p-coumaroylquinic acid [72]
Cúc hoa	Acid chlorogenic [181]
Hoa đào	Rutin, acid caffeic [182]
Đỗ đen	Các acid hydroxycinnamic (caffeic, p-coumaric, sinapic, ferulic acid), các acid hydroxybenzoic (allic, p-hydroxybenzoic, protocatechuic, vanillic, syringic acid), các flavonol (kaempferol, quercetin, myricetin và các dẫn xuất), các flavon (apigenin-7-O-glucoside, luteolin-7-O-glucoside), các flavanol (catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate), các flavanon (naringenin và hesperetin glucoside), các anthocyanin (cyanidin, delphinidin, petunidin, malvidin, pelargonidin glucoside) [183],[184]
Hoa hòe	Rutin, quercetin, isorhamnetin, isorhamnetin, genistein, kaempferol, irisolidon [185]
Hà thủ ô đỏ	Catechin, epicatechin, quercetin, hyperin, rutin, astragalín, proanthocyanidin B1, proanthocyanidin B2 [186]
Trần bì	Các flavanon glycosid (chủ yếu là hesperidin) và các polymethoxylated flavon (chủ yếu là nobiletin và tangeretin) [187]
Mộc qua	Acid cinnamic, acid chlorogenic, acid caffeic, quercetin, rutin [188]
Lạc tiên	Pachypodol, 4, 7-dimethylnaringenin, ermanin, 4, 7-O-dimetyl naringenin và 3, 5-dihydroxy-4, 7-dimethoxy flavanon [189]
Đương quy	Ferulic acid, protocatechuic acid, caffeic acid, phthalic acid [128]
Ngũ vị tử	Acid chlorogenic, isoquercetin, quercetin và các dẫn xuất (quercetin,

<b>Dược liệu</b>	<b>Hợp chất phenol</b>
	3-galactoside [hyperoside] và quercetin 3-rutinoside [rutin]), các dẫn xuất cyanidin (cyanidin-xylosylrutinosid, cyanidin-glucosylrutinosid, cyanidin-xylosylglucosid, và cyanidin-rutinosid) [190]
Kim anh tử	Quercetin, kaempferide, isorhamnetin [191]
Kỷ tử	Các flavonoid (rutin, hyperosid, quercetin, và morin), các phenolic acid (gallic, caffeic, protocatechuic acid, chlorogenic và neochlorogenic acid) [132],[192]
Cam thảo	Liquiritigenin và isoliquiritigenin [193]
Đảng sâm	Chrysoeriol, tricetin, wogonin, luteolin, kaempferol, apigenin [194]
Thỏ ty tử	Rutin, quercetin, isorhamnetin, astragalin [kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucoside] [96]
Phá cố chỉ	Bakuchiol, isobavachin, isobavachalcon [138]

Từ các kết quả nghiên cứu của các tác giả và nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, TD0014 có là một sản phẩm có tính an toàn cao, thể hiện tác dụng kiểu androgen, có xu hướng cải thiện khả năng giãn cơ trơn thể hang, và có hiệu quả trong việc ngăn chặn sự xuất hiện cũng như thúc đẩy sự phục hồi các tổn thương cấu trúc và chức năng của các cơ quan sinh sản do NVP gây ra. TD0014 thể hiện các tác dụng này có thể do liên quan đến một số cơ chế sau:

- *Hoạt tính androgen của TD0014*: vai trò của các phytoandrogen có mặt trong một số dược liệu thành phần của TD0014, bao gồm các phytoandrogen thật sự (protodioscin trong bạch tật lê) và các phytoandrogen kích thích sản sinh androgen trong cơ thể (bạch tật lê, bá bệnh, nhục thung dung, ba kích, nhân sâm).
- *Xu hướng cải thiện chức năng cương dương của TD0014*: vai trò của các hoạt chất phytoandrogen “bắt chước” tác dụng của androgen trong một số dược liệu thành phần của TD0014, bao gồm thành phần echinacosid trong bạch tật lê, ginsenoside Rg1 trong nhân sâm, chuanxiongzine trong xuyên khung, và các hoạt chất cần được xác định cụ thể trong bá bệnh, đương qui và thỏ ty tử. Bên cạnh đó, các dược liệu có tác dụng làm tăng nồng độ testosterone máu (bạch tật lê, bá

bệnh, nhục thung dung, ba kích, nhân sâm, kỷ tử, thỏ ty tử, phá cố chi) cũng có thể tham gia vào xu hướng cải thiện chức năng cương dương của TD0014

- *Tác dụng bảo vệ và phục hồi của TD0014 trên mô hình gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat:*

+ Vai trò của các phytoandrogen có mặt trong một số dược liệu thành phần của TD0014, bao gồm các phytoandrogen thật sự (protodioscin trong bạch tật lê) và các phytoandrogen kích thích sản sinh androgen trong cơ thể (bạch tật lê, bá bệnh, nhục thung dung, ba kích, nhân sâm).

+ Vai trò của hệ thống chống oxy hóa enzym (điển hình là bá bệnh với thành phần SOD) và không enzym (nổi bật là tác dụng của các thành phần flavonoid) có mặt trong nhiều loại dược liệu thành phần của TD0014

## KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu về độc tính và tác dụng điều trị suy giảm sinh dục đực của viên hoàn cứng TD0014, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

### 1. TD0014 có tính an toàn cao trên thực nghiệm

- **Độc tính cấp:** Chưa xác định được LD<sub>50</sub> của TD0014 theo đường uống bằng phương pháp Litchfield - Wilcoxon.
- **Độc tính bán trường diễn:** TD0014 liều 1,8 g đực liệu/kg/ngày và 5,4 g đực liệu/kg/ngày uống trong 90 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 hình ảnh giải phẫu bệnh gan và thận.

### 2. TD0014 thể hiện tác dụng kiểu androgen và có xu hướng cải thiện chức năng cương dương trên động vật thực nghiệm

- **Hoạt tính androgen trên chuột cống đực non và chuột cống đực cai sữa:**
  - + TD0014 liều 1,8 g đực liệu/kg/ngày và 5,4 g đực liệu/kg/ngày đều thể hiện hoạt tính androgen thông qua tác dụng làm tăng trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ và tăng nồng độ testosterone huyết thanh.
  - + TD0014 liều 5,4 g đực liệu/kg/ngày thể hiện hoạt tính androgen mạnh hơn so với liều 1,8 g đực liệu/kg/ngày trên chuột cống đực non cai sữa.
- **Chức năng cương dương trên chuột cống đực trưởng thành:** TD0014 liều 1,8 g đực liệu/kg/ngày thể hiện xu hướng cải thiện chức năng cương dương thông qua tác dụng làm tăng ICP nền ở thời điểm 2 giờ sau khi uống; có xu hướng làm tăng ICP cực đại, diện tích dưới đường cong ICP và thời gian đáp ứng sau khi kích thích điện dây thần kinh hang với ưu điểm là không ảnh hưởng đến huyết áp động mạch trung bình ở chuột.

### 3. TD0014 thể hiện tác dụng bảo vệ và phục hồi trên chuột cống trắng bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat

TD0014 liều 1,8 g/kg/ngày và 5,4 g/kg/ngày đều thể hiện tác dụng bảo vệ và phục hồi trên chuột cống trắng bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat, và TD0014 liều 5,4 g/kg/ngày thể hiện tác dụng mạnh hơn so với liều 1,8 g/kg/ngày.

- **Tác dụng bảo vệ:**

- + TD0014 ở cả hai mức liều nghiên cứu làm tăng trọng lượng tinh hoàn, kích thước ống sinh tinh, cải thiện hình ảnh mô học tinh hoàn, tăng mật độ tinh trùng, nồng độ testosterone trong huyết thanh, trọng lượng của một số cơ quan sinh dục phụ, trọng lượng tuyến thượng thận, và tăng tỷ lệ mang thai của chuột cống cái ghép với các chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản
- + TD0014 liều 5,4 g/kg/ngày, ngoài các tác dụng trên, còn làm tăng tỷ lệ sống của tinh trùng, khả năng di động của tinh trùng (tăng tỷ lệ tinh trùng có tiến tới, giảm tỷ lệ tinh trùng di động tại chỗ hoặc không di động), giảm tỷ lệ tinh trùng có hình thái bất thường, và làm tăng trọng lượng của nhiều cơ quan sinh dục phụ hơn so với liều 1,8 g/kg/ngày.

- **Tác dụng phục hồi**

- + TD0014 ở cả hai mức liều nghiên cứu làm tăng kích thước ống sinh tinh, mật độ tinh trùng, cải thiện hình ảnh mô học tinh hoàn, khả năng di động và tốc độ di động của tinh trùng, giảm tỷ lệ tinh trùng có hình thái bất thường, tăng nồng độ testosterone trong huyết thanh và trọng lượng của một số cơ quan sinh dục phụ, và tăng tỷ lệ mang thai của chuột cống cái ghép với chuột cống đực bị gây suy giảm sinh sản.
- + TD0014 liều 5,4 g/kg/ngày, ngoài các tác dụng trên, còn làm tăng tỷ lệ sống của tinh trùng, làm tăng trọng lượng của tinh hoàn và trọng lượng của nhiều cơ quan sinh dục phụ hơn so với liều 1,8 g/kg/ngày.

## **KIẾN NGHỊ**

Từ các kết quả nghiên cứu về tính an toàn và tác dụng điều trị suy giảm chức năng sinh dục nam của viên hoàn cứng TD0014 trên đây, chúng tôi đưa ra một số kiến nghị như sau:

1. Cần xác định độc tính trên sinh sản và di truyền của TD0014.
2. Nghiên cứu ảnh hưởng của TD0014 đến áp lực thể hang khi sử dụng thuốc thử kéo dài.
3. Tiến hành đánh giá tác dụng của TD0014 trên người tình nguyện, để từng bước đưa TD0014 vào ứng dụng điều trị bệnh lý suy sinh dục ở nam giới.
4. Do khả năng làm tăng nồng độ testosterone trong huyết thanh của TD0014 nên cần đưa ra cảnh báo thận trọng khi sử dụng sản phẩm trên các bệnh nhân nam giới lớn tuổi, bệnh nhân phì đại lành tính hoặc ung thư tiền liệt tuyến.

## CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Mai Phuong Thanh, Pham Thi Van Anh, Nguyen Trong Thong, Nguyen Thi Huong Lien (2018). Effect of TD0014 on intracavernous pressure elicited with electrical stimulation of the cavernous nerve in male rats. *Journal of Medical Research*, **111E2(2)**, 36-43
2. Mai Phương Thanh, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Trọng Thông (2018). Đánh giá tính an toàn của TD0014 trên thực nghiệm. *Tạp chí Nghiên cứu Y dược học Cổ truyền Việt Nam*, **Số 57**, 92-102
3. Mai Phương Thanh, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Trọng Thông, Nguyễn Thị Hương Liên (2020). Tác dụng phục hồi của TD0014 trên chuột cống trắng bị gây suy giảm sinh sản bằng natri valproat. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **126(2)**, 20-30



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, et al (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*, **9(12)**, e1001356.
2. Smith JF, Eisenberg ML, Millstein SG, et al (2010). Infertility Outcomes Program Project Group. The use of complementary and alternative fertility treatment in couples seeking fertility care: data from a prospective cohort in the United States. *Fertil Steril*, **93**, 2169-2174
3. McCabe MP, Sharlip ID, Atalla E, et al (2016). Definitions of Sexual Dysfunctions in Women and Men: A Consensus Statement From the Fourth International Consultation on Sexual Medicine 2015. *The Journal of Sexual Medicine*, **Volume 13, Issue 2**, 135–143
4. Ramlachan P, Campbell MM (2014). Male sexual dysfunction. *S Afr Med J*, **104(6)**, 447.
5. Vo TV, Hoang HD, Thanh Nguyen NP (2017). Prevalence and Associated Factors of Erectile Dysfunction among Married Men in Vietnam. *Front Public Health*, **5**, 94
6. Rosen RC, Seidman SN, Menza MA, et al (2004). Quality of life, mood, and sexual function: a path analytic model of treatment effects in men with erectile dysfunction and depressive symptoms. *Int J Impot Res*, **16**, 334–340
7. Kandeel FR, Koussa VK, Swerdloff RS (2001). Male sexual function and its disorders: physiology, pathophysiology, clinical investigation, and treatment. *Endocr Rev*, **22(3)**, 342–388
8. Dohle GR, Arver S, Bettocchi C, et al (2016). *Guidelines on Male Hypogonadism*. European Association of Urology.
9. Hatzimouratidis K, Giuliano F, Moncada I, et al (2016). *EAU Guidelines on Erectile Dysfunction, Premature Ejaculation, Penile Curvature and Priapism*. European Association of Urology.

10. Khoa Y học Cổ truyền, Trường Đại học Y Hà Nội (2005). *Bài giảng Y học cổ truyền*, Tập 1. Nhà xuất bản Y học, 251-273
11. Derbyshire KL, Grant JE (2015). Compulsive Sexual Behavior: A Review of the Literature. *J Behav Addict*, **4(2)**, 37–43
12. Serefoglu EC, McMahon CG, Waldinger MD, et al (2014). An evidence-based unified definition of lifelong and acquired premature ejaculation: report of the second international society for sexual medicine ad hoc committee for the definition of premature ejaculation. *Sex Med*, **2**, 41–59
13. Abdel-Hamid IA, Ali OI (2018). Delayed Ejaculation: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *World J Mens Health*, **36(1)**, 22–40.
14. Jenkins LC, Mulhall JP (2015). Delayed orgasm and anorgasmia. *Fertility and Sterility*, **Vol 104, No 5**, 1082–1088
15. Shigehara K, Namiki M (2016). Clinical Management of Priapism: A Review. *World J Mens Health*, **34(1)**, 1–8
16. McEwan IJ, Brinkmann AO (2016). *Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders*. Endotext [Internet].
17. Wynia B, Kaminetsky JC (2015). Current and emerging testosterone therapies for male hypogonadism. *Research and Reports in Endocrine Disorders*, **5**, 59–69
18. Shoskes JJ, Wilson MK, Spinner ML (2016). Pharmacology of testosterone replacement therapy preparations. *Transl Androl Urol*, **5(6)**, 834–843
19. Bhasin S, Brito JP, Hayes FJ, et al (2018). Testosterone Therapy in Men With Hypogonadism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **Volume 103, Issue 5**, 1715–1744
20. Osterberg EC, Bernie AM, Ramasamy R (2014). Risks of testosterone replacement therapy in men. *Indian J Urol*, **30(1)**, 2–7
21. Morgentaler A, Traish AM (2009). Shifting the paradigm of testosterone and prostate cancer: The saturation model and the limits of androgen-dependent growth. *Eur Urol*, **55**, 310–320
22. Sarbu MI, Tampa M, Mitran MI, et al (2016). The current treatment of erectile dysfunction. *J Mind Med Sci*, **3(2)**, 118–130

23. Huang SA, Lie JD (2013). Phosphodiesterase-5 (PDE5) Inhibitors In the Management of Erectile Dysfunction. *Pharmacy and Therapeutics*, **38(7)**, 414–419.
24. Andersson KE (2011). Mechanisms of Penile Erection and Basis for Pharmacological Treatment of Erectile Dysfunction. *Pharmacol Rev*, **63(4)**, 811–859
25. Hội Tiết niệu – Thận học Việt Nam (2016). *Phác đồ hướng dẫn chẩn đoán và điều trị xuất tinh sớm*. Nhà xuất bản Y học.
26. Hsu YC, Huang HC, Huang ST (2013). Treatment of premature ejaculation. *Urological Science*, **24**, 2–6.
27. Buvat J, Tesfaye F, Rothman M, et al (2009). Dapoxetine for the treatment of premature ejaculation: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial in 22 countries. *Eur Urol*, **55**, 957–967
28. Bộ Y tế (2007). *Bệnh học và điều trị nội khoa (Kết hợp Đông-Tây y)*. Nhà xuất bản Y học, 252-270
29. da Cruz AC, Guerra NG, de Souza KEBP, et al (2017). The action of herbal medicine on the libido: aspects of nutritional intervention in increasing sexual desire. *Nutrire*, **42**, 29
30. Li H, Jiang H, Liu J (2017). Traditional Chinese medical therapy for erectile dysfunction. *Transl Androl Urol*, **6(2)**, 192-198
31. Đậu Thùy Dương (2018). *Nghiên cứu độc tính và tác dụng trên chức năng sinh sản của OS35 trên thực nghiệm*. Luận án Tiến sỹ Y học. Đại học Y Hà Nội.
32. Temkitthawon P, Hinds TR, Beavo JA, et al (2011). *Kaempferia parviflora*, a plant used in traditional medicine to enhance sexual performance contains large amounts of low affinity PDE5 inhibitors. *J Ethnopharmacol*, **137**, 1437–1441
33. Lin F, Gou X (2013). *Panax notoginseng* saponins improve the erectile dysfunction in diabetic rats by protecting the endothelial function of the penile corpus cavernosum. *Int J Impot Res*, **25**, 206–211.
34. Tan Y, Tang Q, Hu BR, et al (2007). Antioxidant properties of berberine on cultured rabbit corpus cavernosum smooth muscle cells injured by hydrogen peroxide. *Acta Pharmacol Sin*, **28**, 1914–1918

35. Đậu Xuân Cảnh (2007). *Nghiên cứu tác dụng của Hải mã và Sâm Việt Nam lên hình thái – chức năng của tinh hoàn chuột cống trắng trưởng thành*. Luận án Tiến sĩ Y học. Đại học Y Hà Nội.
36. Đoàn Minh Thụy, Quản Hoàng Lâm, Trương Việt Bình, và cộng sự (2010). Tác dụng của viên nang Hồi xuân hoàn trên chức năng tinh hoàn của chuột cống trắng. *Tạp chí Dược học*, **408**, 10–13
37. Nguyễn Thanh Hương (2017). *Nghiên cứu tính an toàn và tác dụng của dịch chiết nước Tỏa dương (Balanophora laxiflora) lên một số chỉ tiêu sinh sản ở chuột đực*. Luận án Tiến sĩ Y học. Viện Y học Cổ truyền Quân đội.
38. Phan Anh Tuấn, Trần Thị Thơm, Trịnh Hoài Nam (2007). Nghiên cứu tác dụng của Đông trùng hạ thảo nam lên một số chỉ số chức năng sinh sản ở chuột đực. *Tạp chí Y học Việt Nam*, **339**, 32-39.
39. Hock FJ (2016). Chapter N: Endocrinology – (N.4) Testicular Steroid Hormones. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*, 4<sup>th</sup> edition, Springer International Publishing, 1772-1784
40. OECD (2009). *Test No. 441: Hershberger Bioassay in Rats: A Short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264076334-en>.
41. OECD (2018). Hershberger Bioassay in Rats (H assay) (OECD TG 441) (including OECD GD 115 on the Weanling Hershberger Bioassay). In: *Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264304741-21-en>.
42. Tirado LCE, Ferrer JE, Herrera AM (2016). Aging and Erectile Dysfunction. *Sex Med Rev*, **4**, 63-73
43. Hock FJ (2016). Chapter A: Cardiovascular Activity – (A.1.3.35) Penile Erections in Rabbits. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*, 4<sup>th</sup> edition, Springer International Publishing, 237-238

44. Bischoff E, Schneider K (2001). A conscious-rabbit model to study vardenafil hydrochloride and other agents that influence penile erection. *Int J Impot Res*, **13(4)**, 230-235
45. Gajbhiye SV, Jadhav KS, Marathe PA, Pawar DB (2015). Animal models of erectile dysfunction. *Indian J Urol*, **31(1)**, 15–21
46. McMurray G, Casey JH, Naylor AM (2006). Animal models in urological disease and sexual dysfunction. *Br J Pharmacol*, **147(Suppl 2)**, S62–S79.
47. Singh R, Ali A, Jeyabalan G, et al (2013). An overview of the current methodologies used for evaluation of aphrodisiac agents. *Journal of Acute Disease*, **Volume 2, Issue 2**, 85-91
48. Grotthus B, Piasecki T, Pieśniewska M, et al (2007). The influence of prolonged  $\beta$ -blockers treatment on male rabbit's sexual behavior and penile microcirculation. *International Journal of Impotence Research*, **19**, 49-54
49. Palese MA, Crone JK, Burnett AL (2003). A castrated mouse model of erectile dysfunction. *J Androl*, **24(5)**, 699-703.
50. Hotta Y, Ieda N, Fukamoto A, et al (2016). Light-controlled relaxation of the rat penile corpus cavernosum using NOBL-1, a novel nitric oxide releaser. *Investig Clin Urol*, **57(3)**, 215–220
51. Furukawa K, Nagao K, Ishii N, Uchiyama T (2003). Responses to serotonin (5HT) in isolated corpus cavernosum penis of rabbit. *Int J Impot Res*, **15(4)**, 267-271.
52. Tee BH, Hoe SZ, Cheah SH, Lam SK (2017). Effects of Root Extracts of *Eurycoma longifolia* Jack on Corpus Cavernosum of Rat. *Med Princ Pract*, **26(3)**, 258–265
53. Hock FJ (2016). Chapter E: Psychotropic and Neurotropic Activity – (E.6.3.12) Sexual Behavior in Male Rats. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*, 4<sup>th</sup> edition, Springer International Publishing, 815-817
54. Singh S, Nair V, Gupta YK (2012). Evaluation of the aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in sexually sluggish male albino rats. *J Pharmacol Pharmacother*, **3(1)**, 43–47

55. Retana-Márquez S, Juárez-Rojas L, Casillas F (2015). Interaction of Adrenal and Gonadal Axes during Stress in Males. *Research & Reviews: Journal of Zoological Sciences*, **4(1)**, 13-22
56. Prabsattroo T, Wattanathorn J, Iamsaard S, et al (2015). *Moringa oleifera* extract enhances sexual performance in stressed rats. *J Zhejiang Univ Sci B*, **16(3)**, 179-190
57. McKittrick CR, Blanchard DC, Hardy MP, Blanchard RJ (2009). Social Stress Effects on Hormones, Brain, and Behavior. *Hormones, brain and behavior*, San Diego, CA, US: Elsevier Academic Press, 333-365
58. Shier D, Butler J, Lewis R (2012). Chapter 19: Reproductive Systems. *Hole's Essentials of Human Anatomy & Physiology*, 11th edition, McGraw-Hill, New York, 505-535.
59. Mohajeri D, Kaffashi Elahi R (2015). Effects of *Nigella sativa* on heat-induced testis damage in mouse. *Bratisl Lek Listy*, **116(4)**, 264-269
60. Yadav G, Awasthi JR, Pandey N, et al (2017). Effect of vitamin E against heat stress induced testicular damage in Wistar Albino rats. *International Journal of Anatomy and Research*, **Vol 5(2.2)**, 3800-3804
61. Bianchi E, Boekelheide K, Sigman M, et al (2017). Ghrelin modulates testicular damage in a cryptorchid mouse model. *PLoS One*, **12(5)**, e0177995.
62. Sharma G, Sisodia R, Meghnani E (2015). Radiation induced testicular injury and its amelioration by *Prunus domestica* in Swiss albino mice. *International Journal of Radiation Research*, **Volume 13, No 1**, 45-54
63. Besong EB, Ateufack G, Babiaka SB, Kamanyi A (2018). Leaf-Methanolic Extract of *Pseudopanax arboreus* (Araliaceae) (L. F. Phillipson) Reverses Amitriptyline-Induced Sexual Dysfunction in Male Rats. *Biochemistry Research International*, **Volume 2018**, Article ID 2869727, 14 pages
64. Malviya N, Jain S, Gupta VB, Vyas S (2013). Management of drug induced sexual dysfunction in male rats by ethyl acetate fraction of onion. *Acta Pol Pharm*, **70(2)**, 317-322.

65. Nishimura T, Sakai M, Yonezawa H (2000). Effects of valproic acid on fertility and reproductive organs in male rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, **25(2)**, 85-93
66. Harikrishnan R, Abhilash PA, Syam Das S, et al (2013). Protective effect of ascorbic acid against ethanol-induced reproductive toxicity in male guinea pigs. *British Journal of Nutrition*, **Volume 110, Issue 4**, 689-698
67. Magalhães Zanchi M, Manfredini V, dos Santos Brum D, et al (2015). Green tea infusion improves cyclophosphamide-induced damage on male mice reproductive system. *Toxicology Reports*, **Volume 2**, 252-260
68. Afsan M, Ahmed AHH, Khaleque MA, Nessa J (2011). Testicular Recovery Effects of Folinic Acid on Cyclophosphamide Induced Damage in Rat. *J Shaheed Suhrawardy Med Coll*, **3(2)**, 31-34.
69. Ebling FJ, Brooks AN, Cronin AS, et al (2000). Estrogenic Induction of Spermatogenesis in the Hypogonadal Mouse. *Endocrinology*, **141(8)**, 2861-2869
70. Yeh S, Tsai MY, Xu Q, et al (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An *in vivo* model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99(21)**, 13498–13503.
71. Jamsai D, O'Bryan MK (2011). Mouse models in male fertility research. *Asian J Androl*, **13(1)**, 139-151
72. Chhatre S, Nesari T, Somani G (2014). Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*. *Pharmacogn Rev*, **8(15)**, 45–51
73. Rajendar B, Bharavi K, Rao GS et al (2011). Protective effect of an aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* Linn on cadmium-induced testicular damage. *Indian J Pharmacol*, **43(5)**, 568–573
74. Rehman SU, Choe K and Yoo HH (2016). Review on a Traditional Herbal Medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its Traditional Uses, Chemistry, Evidence-Based Pharmacology and Toxicology. *Molecules* 2016, **21**, 331; doi:10.3390/molecules21030331.

75. Pramoto H (2017). *Eurycoma longifolia* extract increases intracellular production activity of luteinizing hormone (LH) in pituitary. *International Symposium on Current Progress in Mathematics and Sciences 2016 (ISCPMS 2016)*, AIP Conference Proceedings, **1862(1)**, 030112-1–030112-6
76. Low BS, Choi SB, Wahab HA et al (2013). Eurycomanone, the major quassinoid in *Eurycoma longifolia* root extract increases spermatogenesis by inhibiting the activity of phosphodiesterase and aromatase in steroidogenesis. *J Ethnopharmacol*, **149**, 201–207
77. Ismail SB, Wan Mohammad WMZ, George A et al (2012). Randomized Clinical Trial on the Use of PHYSTA Freeze-Dried Water Extract of *Eurycoma longifolia* for the Improvement of Quality of Life and Sexual Well-Being in Men. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **Volume 2012**, Article ID 429268, 10 pages.
78. Dương Thị Ly Hương (2012). *Nghiên cứu tác dụng lên chức năng sinh sản và độc tính của rễ bá bệnh (Eurycoma longifolia J.) thu hái tại Việt Nam trên động vật thực nghiệm*. Luận án Tiến sĩ Y học. Đại học Y Hà Nội.
79. Trần Mỹ Tiên, Nguyễn Thanh Hồng Vân, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương (2012). Khảo sát tác dụng hướng sinh dục nam từ dịch chiết cồn của rễ bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) trên chuột nhắt trắng (*Mus musculus*). *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, **Tập 16, Phụ bản của Số 1**, 186-191
80. Song B, Wang F, Wang W (2015). Effect of Aqueous Extract from *Morinda officinalis* F. C. How on Microwave-Induced Hypothalamic-Pituitary-Testis Axis Impairment in Male Sprague-Dawley Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **Volume 2015**, Article ID 360730, 10 pages.
81. Zhu Z, Huang F, Wang F, et al (2017). *Morinda Officinalis* Polysaccharides Stimulate Hypothalamic GnRH Secretion in Varicocele Progression. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **Volume 2017**, Article ID 9057959, 12 pages.



82. Trần Mỹ Tiên, Nguyễn Mai Thanh Tâm, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương (2012). Nghiên cứu tác dụng hướng sinh dục nam của Ba kích (*Morinda officinalis* How.). *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, **Tập 16, Phụ bản của Số 1**, 192-198.
83. Nguyễn Mạnh Quân, Nguyễn Trần Thị Giáng Hương (2008). Nghiên cứu tác dụng của Ba kích (*Morinda Officinalis* How) lên sự phát triển của cơ quan sinh dục chuột cống đực. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **Số 1**, 77-84.
84. Leung KW, ST Wong A (2013). Ginseng and male reproductive function. *Spermatogenesis*, **3(3)**, e26391
85. Gray SL, Lackey BR, Boone WR (2015). Effects of *Panax ginseng*, zearalenol, and estradiol on sperm function. *Journal of Ginseng Research*, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgr.2015.08.004>
86. Đỗ Tất Lợi (2015). Nhục thung dung. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, 933-934.
87. Li Z, Lin H, Gu L, et al (2016). Herba *Cistanche* (Rou Cong-Rong): One of the Best Pharmaceutical Gifts of Traditional Chinese Medicine. *Front Pharmacol*, **7**, Article 41. doi: 10.3389/fphar.2016.00041
88. Trần Thanh Tùng (2009). *Nghiên cứu độc tính và tác dụng của cao lỏng Thung dung (Cistanche Deserticola Y.G.Ma) lên cấu trúc chức năng cơ quan sinh sản động vật thực nghiệm*. Luận văn Thạc sĩ Y học, Đại học Y Hà Nội
89. Gu L, Xiong WT, Wang C, et al (2013). *Cistanche deserticola* decoction alleviates the testicular toxicity induced by hydroxyurea in male mice. *Asian J Androl*, **15(6)**, 838-840
90. Li J, Huang D, He L (2014). Effect of roucong rong (*Herba Cistanches Deserticolae*) on reproductive toxicity in mice induced by glycoside of Leigongteng (*Radix et Rhizoma Tripterygii*). *J Tradit Chin Med*, **34(3)**, 324-328
91. Wang T, Chen C, Yang M et al (2016). *Cistanche tubulosa* ethanol extract mediates rat sex hormone levels by induction of testicular steroidogenic enzymes. *Pharm Biol*, **54(3)**, 481-487

92. Chang RCC, So KF (2008). Use of Anti-aging Herbal Medicine, *Lycium barbarum*, Against Aging-associated Diseases. What Do We Know So Far?. *Cell Mol Neurobiol*, **28**, 643–652
93. Li XM, Ma YL, Liu XJ (2007). Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides on age-related oxidative stress in aged mice. *J Ethnopharmacol*, **111(3)**, 504-511
94. Luo Q, Cui X, Yan J et al (2006). *Lycium barbarum* polysaccharides: Protective effects against heat-induced damage of rat testes and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in mouse testicular cells and beneficial effect on sexual behavior and reproductive function of hemicastrated rats. *Life Sci*, **79(7)**, 613-621
95. Yang F, Wei Y, Liao B, et al (2018). *Lycium barbarum* polysaccharide prevents cisplatin-induced MLTC-1 cell apoptosis and autophagy via regulating endoplasmic reticulum stress pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, **Volume 12**, 3211-3219
96. Wen-lan L, Yan Z, Jing B, et al (2013). Identification of chemical constituents in *cuscuta chinensis* using HPLC-ESI/Q-TOF MS/MS. *BTAIJ*, **8(4)**, 563-567
97. Qin DN, She BR, She YC, Wang JH (2000). Effects of flavonoids from *Semen Cuscutae* on the reproductive system in male rats. *Asian J Androl*, **2(2)**, 99-102
98. Gao F, Zhou C, Qiu W (2018). Total flavonoids from Semen Cuscutae target MMP9 and promote invasion of EVT cells via Notch/AKT/MAPK signaling pathways. *Scientific Reports*, **8**, 17342
99. Dương Thị Ly Hương, Nguyễn Trần Thị Giáng Hương, Trần Thị Thanh Huế (2007). Nghiên cứu tác dụng của Thỏ ty tử (*Semen Cuscutal Chinensis*) trên chức năng sinh sản của chuột cống đực non thí nghiệm. *Tạp chí Dược học*, **Số 379**, 6-9.
100. Đỗ Tất Lợi (2015). Phá cô chỉ. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, 856-857.
101. Dabhadkar D, Zade V (2013). Evaluation of the Potential Aphrodisiac Activity of *Psoralea corylifolia* in Male Albino Rats. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, **3(22)**, 18-27

102. Xiao HJ, Wang T, Chen J, et al (2010). Chuanxiongzine relaxes isolated corpus cavernosum strips and raises intracavernous pressure in rabbits. *Int J Impot Res*, **22**, 120–126
103. Goswami SK, Inamdar MN, Jamwal R, Deth S (2013). Efficacy of *Cinnamomum cassia* Blume. in age induced sexual dysfunction of rats. *J Young Pharm*, **5(4)**, 148-153.
104. Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
105. Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo - Bộ Y tế (2015). *Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu*. Ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27 tháng 10 năm 2015 của Cục trưởng Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo.
106. World Health Organisation (2000). *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*. Geneva, Switzerland, 35
107. UNECE (United Nations Economic Commission for Europe) (2013). *Globally Harmonized System for the Classification and Labeling of Chemicals (GHS)*. Part 3. Health Hazards. Geneva: United Nations.
108. OECD 420 (2001). *OECD guideline for testing of chemicals: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure*
109. Ogonnia SO (2014). Acute and Subchronic Evaluation of Aqueous Extracts of *Newbouldia laevis* (Bignoniaceae) and *Nauclea latifolia* (Rubiaceae) Roots used Singly or in Combination in Nigerian Traditional Medicines. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, **5(1)**, 55-62.
110. Ogonnia S, Olayemi S, Mbaka G, et al (2014). Evaluation of Microbial Purity and Toxicity Profile of Two Polyherbal Formulations Used in Nigerian Herbal Medicine. *Pharmacologia*, **5**, 357-368.
111. Nguyễn Thế Khánh, Phạm Tử Dương (2005). *Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
112. Vũ Đình Vinh (2001). *Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hoá*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 115-287.

113. Tortora GJ, Derrickson B (2009). Chapter 24: The Digestive System. *Principles of Anatomy and Physiology*, 12<sup>th</sup> edition. John Wiley & Sons, Inc., 921-976
114. Nguyễn Đạt Anh, Nguyễn Thị Hương (2013). *Các xét nghiệm thường quy áp dụng trong thực hành lâm sàng*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
115. Hemalatha S (2016). *A study on the effect of saponin-rich fractions of Tribulus terrestris fruits in rats induced with oligospermia*. A thesis submitted in partial fulfillment for the award of the degree of Doctor of Philosophy, Educational and Research Institute University, Maduravoyal, Chennai, India.
116. Hwang ES, Kim GH (2013). Safety Evaluation of *Chrysanthemum indicum* L. Flower Oil by Assessing Acute Oral Toxicity, Micronucleus Abnormalities, and Mutagenicity. *Prev Nutr Food Sci*, **18(2)**, 111–116.
117. Shen HJ, Guo QS, Fang HL (2011). Toxicological evaluation of carotenoid-type extracts from *Flos Chrysanthemi Indici*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **Vol 5(23)**, 5507-5512
118. Li CH, Liao JW, Liao PL, et al (2013). Evaluation of Acute 13-Week Subchronic Toxicity and Genotoxicity of the Powdered Root of Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **Volume 2013**, Article ID 102987, 11 pages
119. Liu Y, Wang Z, Zhang J (2015). *Dietary Chinese Herbs – Chemistry, Pharmacology and Clinical Evidence*. Springer-Verlag Wien, 703-710
120. Li Y, Xu L, Liu R, et al (2011). Acute Toxicity of *Polygonum Multiflorum* Thunb and Refined in Mice. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, **2011-05**
121. Passos FF, Lopes EM, de Araújo JM, et al (2015). Involvement of Cholinergic and Opioid System in  $\gamma$ -Terpinene-Mediated Antinociception. *Evid Based Complement Alternat Med*, **Volume 2015**, Article ID 829414, 9 pages
122. Varadharajan R, Rajalingam D (2011). Diuretic Activity of *Polyscias fruticosa* (L.) Harms. *International Journal of Innovative Drug Discovery*, **Vol 1, Issue 1**, 15-18

123. Sandhyarani G, Praveen Kumar K (2014). Evaluation of Analgesic Activity of Ethanolic Extract of *Tinospora Sinensis* Leaves in Rats. *International Journal of Preclinical & Pharmaceutical Research*, **5(1)**, 34-37
124. Chivapat S, Bunjob M, Shuaoprom A, et al (2011). Chronic toxicity of *Passiflora foetida* L. extract. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, **Vol 4(2)**, 24-31
125. Michel BG, Koffi K, Stanislas ZO, et al (2012). Oral acute toxicity and estrogenic effects of the extracts of *Passiflora foetida* Linn. (Passifloraceae) leaves in female Wistar albino rats. *Annals of Biological Research*, **3(9)**, 4609-4616
126. Naik SR, Bhagat S, Shah PD, et al (2013). Evaluation of anti-allergic and anti-anaphylactic activity of ethanolic extract of *Zizyphus jujuba* fruits in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **Volume 23, Issue 5**, 811-818
127. Lim DW, Kim YT (2014). Anti-Osteoporotic Effects of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels Extract on Ovariectomized Rats and Its Oral Toxicity in Rats. *Nutrients*, **6(10)**, 4362-4372
128. Chen XP, Li W, Xiao XF, et al (2013). Phytochemical and pharmacological studies on Radix *Angelica sinensis*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **11(6)**, 0577-0587
129. Liang J, Liang J, Hao H, et al (2017). The Extracts of *Morinda officinalis* and Its Hairy Roots Attenuate Dextran Sodium Sulfate-Induced Chronic Ulcerative Colitis in Mice by Regulating Inflammation and Lymphocyte Apoptosis. *Front Immunol*, **8**, 905.
130. Zhang S, Zheng L, Xu L, et al (2012). Subchronic toxicity study of the total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **Volume 62, Issue 2**, 221-230
131. Lawal B, Shittu OK, Oibiokpa FI, et al (2016). Antimicrobial evaluation, acute and sub-acute toxicity studies of *Allium sativum*. *Journal of Acute Disease*, **Volume 5, Issue 4**, 296-301

132. Potterat O (2010). Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, Pharmacology and Safety in the Perspective of Traditional Uses and Recent Popularity. *Planta Med*, **76**, 7–19
133. Isbrucker RA, Burdock GA (2006). Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **46**, 167–192
134. European Medicines Agency (2014). *Assessment report on Panax ginseng C.A. Meyer, radix*.
135. Gao Y, Qin G, Wen P, et al (2017). Safety assessment of powdered *Cistanche deserticola* Y. C. Ma by a 90-day feeding test in Sprague-Dawley rats. *Drug Chem Toxicol*, **40(4)**, 383-389
136. Zhang A, Yang X, Li Q, et al (2018). Immunostimulatory activity of water-extractable polysaccharides from *Cistanche deserticola* as a plant adjuvant in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, **13(1)**, e0191356
137. Jeong SY, Kang S, Kim DS, Park S (2017). *Codonopsis lanceolata* Water Extract Increases Hepatic Insulin Sensitivity in Rats with Experimentally-Induced Type 2 Diabetes. *Nutrients*, **9**, 1200.
138. Khushboo PS, Jadhav VM, Kadam VJ, and Sathe NS (2010). *Psoralea corylifolia* Linn.—“Kushtanashini”. *Pharmacogn Rev*, **4(7)**, 69–76
139. New Zealand Deer Products. *DeerVelvet*. Technical manual, Version 6.3. Deer Industry New Zealand 2001-2009
140. Wolfensohn S, Lloyd M (2013). Chapter 11: Small Laboratory Animals. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*, 4<sup>th</sup> edition, Blackwell Publishing Ltd, 209-246
141. Turcu AF, Auchus RJ (2015). Adrenal Steroidogenesis and Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*, **44(2)**, 275-296.
142. Edouard MJ, Lin M, Guan-Wei F, et al (2014). Yang-tonifying traditional Chinese medicinal plants and their potential phytoandrogenic activity. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **12(5)**, 0321–0334

143. Oyama M, Tokiwano T, Kawaii S, et al (2017). Protodioscin, Isolated from the Rhizome of *Dioscorea tokoro* Collected in Northern Japan is the Major Antiproliferative Compound to HL-60 Leukemic Cells. *Curr Bioact Compd*, **13(2)**, 170-174
144. Moghaddam MHG, Khalili M, Maleki M, Abadi MEA (2013). The Effect of Oral Feeding of *Tribulus terrestris* L. on Sex Hormone and Gonadotropin Levels in Addicted Male Rats. *Int J Fertil Steril*, **7(1)**, 57-62
145. Esfandiari A, Dehghan A, Sharifi S, et al (2011). Effect of *tribulus terrestris* extract on ovarian activity in immature Wistar rat: a histological evaluation. *J Anim Vet Adv*, **10(7)**, 883-886
146. Pavin NF, Izaguirry AP, Soares MB, et al (2018). *Tribulus terrestris* Protects against Male Reproductive Damage Induced by Cyclophosphamide in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **Volume 2018**, Article ID 5758191, 9 pages
147. Mohamed AN, Vejayan J, Yusoff MM (2015). Review on *Eurycoma longifolia* Pharmacological and Phytochemical Properties. *J Applied Sci*, **15(6)**, 831-844
148. Talbott SM, Talbott JA, George A, Pugh M (2013). Effect of Tongkat Ali on stress hormones and psychological mood state in moderately stressed subjects. *J Int Soc Sports Nutr*, **10**, 28.
149. Kong ZL, Johnson A, Ko FC, et al (2018). Effect of *Cistanche Tubulosa* Extracts on Male Reproductive Function in Streptozotocin–Nicotinamide-Induced Diabetic Rats. *Nutrients*, **10(10)**, 1562.
150. Jiang Z, Zhou B, Li X, et al (2018). Echinacoside Increases Sperm Quantity in Rats by Targeting the Hypothalamic Androgen Receptor. *Sci Rep*, **8**, 3839.
151. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, et al (2012). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological Reviews*, **Vol 92, No 3**, 1235-1316

152. Tsai SC, Chiao YC, Lu CC, Wang PS (2003). Stimulation of the Secretion of Luteinizing Hormone by Ginsenoside-Rb1 in Male Rats. *Chinese Journal of Physiology*, **46(1)**, 1-7
153. Park J, Song H, Kim SK, et al (2017). Effects of ginseng on two main sex steroid hormone receptors: estrogen and androgen receptors. *J Ginseng Res*, **41(2)**, 215-221
154. Kopalli SR, Cha KM, Hwang SY, et al (2019). Korean Red Ginseng (*Panax ginseng* Meyer) with enriched Rg3 ameliorates chronic intermittent heat stress-induced testicular damage in rats via multifunctional approach. *J Ginseng Res*, **43(1)**, 135-142
155. McAuley IW, Kim NN, Min K, et al (2001). Intracavernosal sildenafil facilitates penile erection independent of the nitric oxide pathways. *J Androl*, **22**, 623-628.
156. Choi S, O'Connell L, Min K, et al (2002). Efficacy of Vardenafil and Sildenafil in Facilitating Penile Erection in an Animal Model. *Journal of Andrology*, **Vol 23, No 3**, 332-337
157. Reffelmann T, Kloner RA (2003). Therapeutic Potential of Phosphodiesterase 5 Inhibition for Cardiovascular Disease. *Circulation*, **108(2)**, 239-244.
158. Gai XY, Wei YH, Zhang W, et al (2015). Echinacoside induces rat pulmonary artery vasorelaxation by opening the NO-cGMP-PKG-BK<sub>Ca</sub> channels and reducing intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. *Acta Pharmacologica Sinica*, **36**, 587-596
159. Do J, Choi S, Choi J, Hyun JS (2013). Effects and Mechanism of Action of a *Tribulus terrestris* Extract on Penile Erection. *Korean J Urol*, **54(3)**, 183-188
160. Sun K, Zhao C, Chen XF, et al (2013). *Ex vivo* relaxation effect of *Cuscuta chinensis* extract on rabbit corpus cavernosum. *Asian J Androl*, **15(1)**, 134-137
161. Albersen M, Orabi H, F Lue T (2011). Evaluation and Treatment of Erectile Dysfunction in the Aging Male: A Mini-Review. *Gerontology*, **58**, 3-14
162. Leung KW, Cheng YK, Mak NK, et al (2006). Signaling pathway of ginsenoside-Rg1 leading to nitric oxide production in endothelial cells. *FEBS Lett*, **580(13)**, 3211-3216.



163. Alhathal N, Elshal AM, Carrier S (2012). Synergetic effect of testosterone and phosphodiesterase-5 inhibitors in hypogonadal men with erectile dysfunction: A systematic review. *Can Urol Assoc J*, **6(4)**, 269–274.
164. Chamness SL, Ricker DD, Crone JK, et al (1995). The effect of androgen on nitric oxide synthase in the male reproductive tract of the rat. *Fertil Steril*, **63**, 1101–1107.
165. Kim P, Paick K (1999). Effects of androgens on the expression of nitric oxide synthase mRNAs in rat corpus cavernosum. *BJU International*, **83**, 327-333
166. Bộ Y tế (2018). *Dược thư Quốc gia Việt Nam*. Lần xuất bản thứ hai. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 140-143
167. Aldemir E, Akdeniz F (2009). Effects of Valproate on Male Reproductive Functions. *Turkish Journal of Psychiatry*, **20(4)**, 376-384
168. Bairy L, Paul V, Rao Y (2010). Reproductive toxicity of sodium valproate in male rats. *Indian Journal of Pharmacology*, **42(2)**, 90-94.
169. Berger I, Segal I, Shmueli D, Saada A (2010). The effect of antiepileptic drugs on mitochondrial activity: a pilot study. *J Child Neurol*, **25(5)**, 541-545
170. Sun X, Kaufman PD (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, **127(2)**, 175-186
171. Iamsaard S, Sukhorum W, Sampanang A, Sripanidkulchai B (2017). Protective Effect of *Momordica cochinchinensis* (L.) Spreng Aril Extract on Essential Testicular Markers in Rats Induced with Valproic Acid. *Int J Morphol*, **35(3)**, 992-999
172. Smith LB, Walker WH (2014). The Regulation of Spermatogenesis by Androgens. *Semin Cell Dev Biol*, **0**, 2–13.
173. Glister C, Satchell L, Michael AE, et al (2012). The Anti-Epileptic Drug Valproic Acid (VPA) Inhibits Steroidogenesis in Bovine Theca and Granulosa Cells *In Vitro*. *PLoS One*, **7(11)**, e49553
174. Al Snafi AE, Al Salih RMH, Abbas AM (2013). Endocrine Reproductive Effects of Antiepileptic Drugs in Male Rats. *Global Journal of Pharmacology*, **7(1)**, 95-98

175. Isojärvi JIT (2008). Disorders of reproduction in patients with epilepsy: Antiepileptic drug related mechanisms. *Seizure*, **17**, 111–119
176. Jassim AM (2013). Protective effect of *Petroselinum crispum* (parsley) extract on histopathological changes in liver, kidney and pancreas induced by sodium valproate in male rats. *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*, **Vol 4, No 1**, 20–27.
177. Cárdenas-Rodríguez N, Coballase-Urrutia E, Rivera-Espinosa L, et al (2013). Modulation of Antioxidant Enzymatic Activities by Certain Antiepileptic Drugs (Valproic Acid, Oxcarbazepine, and Topiramate): Evidence in Humans and Experimental Models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **Volume 2013**, Article ID 598493, 8 pages.
178. Vijay P, Yeshwanth R, Bairy KL (2008). The effect of sodium valproate on the biochemical parameters of reproductive function in male albino Wistar rats. *Indian J Pharmacol*, **Vol 40, Issue 6**, 248-250
179. Caverzan A, Casassola A, Brammer SP (2015). Chapter 20: Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes Involved in Plant Tolerance to Stress. *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*, IntechOpen, 463-480
180. Banjarnahor SDS, Artanti N (2014). Antioxidant properties of flavonoids. *Med J Indones*, **Vol 23, No 4**, 239-244
181. He J, Wu X, Kuang Y et al (2010). Quality assessment of *Chrysanthemum indicum* Flower by simultaneous quantification of six major ingredients using a single reference standard combined with HPLC fingerprint analysis. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **11(2)**, 265–272
182. Hovaneț MV, Oprea E, Ancuceanu RV, et al (2018). Contributions to the pharmacognostical and phytobiological study of *Prunus persica* (L.) Batsch flowers. *Farmacia*, **Vol 66, 1**, 78-82
183. Reynoso-Camacho R , Ramos-Gomez M, Loarca-Pina G (2006). Bioactive components in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, Research Signpost, 217- 236

184. Ganesan K, Xu B (2017). Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits. *Int J Mol Sci*, **18(11)**, 2331
185. Chen HN, Hsieh CL (2010). Effects of *Sophora japonica* flowers (Huaihua) on cerebral infarction. *Chinese Medicine*, **5**, 34.
186. Liu Y, Wang Q, Yang J, et al (2018). *Polygonum multiflorum* Thunb.: A Review on Chemical Analysis, Processing Mechanism, Quality Evaluation, and Hepatotoxicity. *Front Pharmacol*, **9**, 364
187. Dosoky NS, Setzer WN (2018). Biological Activities and Safety of *Citrus spp.* Essential Oils. *Int J Mol Sci*, **19(7)**, 1966
188. Zhang SY, Han LY, Zhang H, Xin HL (2014). *Chaenomeles speciosa*: A review of chemistry and pharmacology. *Biomed Rep*, **2(1)**, 12-18
189. Ingale AG, Hivrale AU (2010). Pharmacological studies of *Passiflora sp.* and their bioactive compounds. *African Journal of Plant Science*, **Vol 4(10)**, 417-426
190. Nowak A, Zakłós-Szyda M, Błasiak J et al (2019). Potential of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. In Human Health and Nutrition: A Review of Current Knowledge and Therapeutic Perspectives. *Nutrients*, **11(2)**, 333
191. Zhao L, Xu L, Tao X, et al (2016). Protective Effect of the Total Flavonoids from *Rosa laevigata* Michx Fruit on Renal Ischemia-Reperfusion Injury through Suppression of Oxidative Stress and Inflammation. *Molecules*, **21(7)**, 952
192. Kocyigit E, Sanlier N (2017). A Review of Composition and Health Effects of *Lycium barbarum*. *International Journal of Chinese Medicine*, **1(1)**, 7-19
193. WHO (2010). Radix Glycyrrhizae. *WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS)*, 161–173
194. He JY, Ma N, Zhu S, et al (2015). The genus *Codonopsis* (Campanulaceae): a review of phytochemistry, bioactivity and quality control. *J Nat Med*, **69**, 1–21

PHỤ LỤC 1

**TỔNG QUAN VỀ CÁC DƯỢC LIỆU THÀNH PHẦN TRONG SẢN PHẨM TD0014**

<b>Dược liệu</b>	<b>Bộ phận sử dụng</b>	<b>Thành phần hóa học chính</b>	<b>Tác dụng dược lý</b>
Bạch tật lê ( <i>Tribulus terrestris</i> )	Quả chín phơi hoặc sấy khô	Các steroid saponin (gitonin, protodioscin, tribulosaponins A and B, tribulosin và terrestrosins A–K), các alkaloid, tribulusamid A and B, các flavonol (kaempferol, quercetin, rutin)	Lợi tiểu, kích thích tình dục, điều hòa miễn dịch, hạ đường huyết, giảm lipid máu, hạ huyết áp, bảo vệ gan, chống viêm, giảm đau, kháng khuẩn, chống ung thư
Cúc hoa ( <i>Chrysanthemum sinense</i> )	Hoa phơi khô	Các flavon (quercitrin, myricetin và luteolin-7-glucosid), acid chlorogenic, và một số hợp chất dầu dễ bay hơi (borneol, bornyl acetat, chrysanthemon, và long não)	Giải cảm, hạ sốt, làm sáng mắt, tăng thị lực, giải độc, hạ huyết áp
Hoa đào ( <i>Prunus persica</i> )	Hoa tươi hoặc phơi khô	Các flavon, acid polyphenolcarboxylic, kaempferol glycosid	Lợi tiểu, an thần, nhuận tràng, chống tia UV khi bôi ngoài da
Đỗ đen ( <i>Vigna cylindrica</i> )	Hạt	Các polyphenol (flavonol glycosid, anthocyanin, proanthocyanidin), lectin, các chất ức chế trypsin, các carbohydrat	Hỗ trợ tiêu hóa, lợi tiểu, chống oxy hóa, chống viêm, hạ glucose máu, chống béo phì, chống ung thư,...
Bá bệnh ( <i>Eurycoma longifolia</i> )	Vỏ thân hoặc vỏ rễ phơi hay sấy khô	Các quassinoid, $\beta$ -carboline alkaloid, canthin-6-one alkaloid, dẫn xuất squalene, và eurycolactone, eurycomalactone, laurycolactone, biphenyl neolignan và	Kích thích hoạt động tình dục, chống sốt rét, kháng ký sinh trùng, kháng khuẩn, kháng nấm,

<b>Dược liệu</b>	<b>Bộ phận sử dụng</b>	<b>Thành phần hóa học chính</b>	<b>Tác dụng dược lý</b>
		các steroid	chống ung thư
Hoa hòe ( <i>Sophora japonica</i> )	Hoa chưa nở phơi hay sấy khô	Các flavon (rutin, quercetin, isorhamnetin, isorhamnetin, genistein và kaempferol), tetraglycosid, isoflavon, isoflavon tetraglycosid, triterpen glycoside, alkaloid, amino acid và polysaccharid	Chống viêm, kháng khuẩn, kháng virus, chống oxy hóa, hạ đường huyết, giảm lipid máu, chống ung thư, cầm máu
Hoài sơn ( <i>Dioscorea persimilis</i> )	Thân rễ cây củ mài cạo vỏ, sấy khô	Glucid, protid, lipid, dioscin, saptotoxin, allantoin, dioscorin, acid amin	Có tính chất bổ, hạ đường huyết, phối hợp với các dược liệu khác trong điều trị hen phế quản
Tỳ giải ( <i>Dioscorea tokoro</i> )	Thân rễ phơi hay sấy khô	Tokorogenin, diosgenin, yonogenin, $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol, cholesterol, protodioscin	Lợi tiểu, trị mụn nhọt
Hà thủ ô đỏ ( <i>Polygonum multiflorum</i> )	Rễ củ phơi khô	Các stilben, quinon, flavonoid, phospholipid, và một số hợp chất khác	Chống lão hóa, điều hòa miễn dịch, hạ lipid máu, chống oxy hóa, chống ung thư, chống viêm
Trần bì ( <i>Citrus deliciosa</i> )	Vỏ quýt phơi khô	Các flavonoid, acid phenolic, và limonoid	Chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm
Đinh lăng ( <i>Polyscias fruticosa</i> )	Rễ hay vỏ rễ phơi hoặc sấy khô	Các amino acid (lysin, cystein, methionin), polysaccharid, steroid, sesquiterpenoid, triterpenoid saponin, và polyacetylen	Bổ khí, lợi tiểu, hạ sốt, chữa kiết lỵ, điều trị đau thần kinh và đau khớp

<b>Dược liệu</b>	<b>Bộ phận sử dụng</b>	<b>Thành phần hóa học chính</b>	<b>Tác dụng dược lý</b>
Dây đau xương ( <i>Tinospora sinensis</i> )	Thân đã thái phiến phơi hay sấy khô	Tinosin, tinocordifolioside, tinosporaside, 1-deacetyltinosporaside, 4-hydroxyl-heptadec-6-enoic acid, cordicoside, synergin, palmatine, diosgenin, daucasterol, columbin, $\beta$ -setosterol, 20b-hydroxyecdysone, berbarine	Chống oxy hóa, chống ung thư, chống viêm, hạ đường huyết
Mộc qua ( <i>Chaenomeles lagenaria</i> )	Quả chín phơi hay sấy khô	Các acid hữu cơ (các triterpenoid acid, phenolic acid, phenylpropionic acid, các acid hữu cơ khác), flavonoid (quercetin, rutin), tinh dầu và các hợp chất khác	Chống viêm, giảm đau, kháng khuẩn, chống oxy hóa, điều hòa miễn dịch, bảo vệ gan, ức chế co thắt đường tiêu hóa,...
Lạc tiên ( <i>Passiflora foetida</i> )	Phần trên mặt đất đã phơi hoặc sấy khô	5 loại flavonoid, pachypodol, 4, 7-dimethylnaringenin, ermanin, 4, 7-O-dimetyl naringenin và 3, 5-dihydroxy-4, 7-dimethoxy flavanon, đã được phân lập từ lá. Mười loại flavonoid (apigenin), bao gồm cả ermanin, đã được phân lập từ nhựa có trong thân cây. Các thành phần hóa học khác như các indol alkaloid (Harman 70 $\mu$ g/100g), hydrogen cyanid và cyanogenic glycosid	Kháng khuẩn, chống oxy hóa, giảm đau, chống viêm
Đại táo ( <i>Ziziphus jujube</i> )	Quả chín phơi hay sấy khô của cây Táo tàu	Vitamin C, các triterpen và triterpen saponin (alphitolic acid, betulinic acid, maslinic acid, zizyphus saponins I, II, III, jujuboside B, spinosin, swertisin, ...), các triterpene oligoglycosid (jujuboside A1 và C, và acetyljujuboside	Chống dị ứng, chống viêm, giảm đau, ức chế thần kinh trung ương, điều hòa miễn dịch, hạ đường huyết (hạt)

Dược liệu	Bộ phận sử dụng	Thành phần hóa học chính	Tác dụng dược lý
		B), cAMP, cGMP, polysaccharid (ziziphus-arabinan)	
Thục địa ( <i>Rehmannia glutinosa</i> )	Thân rễ phơi hay sấy khô của cây Địa hoàng hay cây Sinh địa	Các iridoid, monoteren và glycosid (catalpol, dihydrocatalpol, danmelittosid, acetylcatalpol, aucubin, rehmanniosid A, B, C, D, ajugol, acteosid, isoacteosid, ...), monosaccharid (glucose, galactose và fructose), oligosaccharid (mannitol và sucrose, raffinose, mannotriose, stachyose và verbascose), <i>Rehmannia glutinosa</i> polysaccharid a, b, các acid amin và vi khoáng (arginin, alanin, sắt, kẽm,...)	Cầm máu, kích thích tạo máu, chống ung thư, điều hòa miễn dịch, hạ đường huyết, chống loét dạ dày, bảo vệ gan, bảo vệ thận,...
Đương quy ( <i>Angelica sinensis</i> )	Rễ phơi hay sấy khô	Các acid hữu cơ (ferulic acid, protocatechuic acid, caffeic acid, phthalic acid,...), các phthalid (ligustulide <i>E</i> và <i>Z</i> , butylidenephthalide <i>E</i> và <i>Z</i> ), butylphthalide, senkyunolid A, senkyunolide I, senkyunolide H, senkyunolide P, levistolide A, riligustilide, tokinolide B, neocnidilide), các polysaccharid (fucose, galactose, glucose, arabinose, rhamnose, arabinose, mannose, xylose)	Chống ung thư, cải thiện trí nhớ, điều hòa miễn dịch, chống oxy hóa, kích thích tạo máu
Trạch tả ( <i>Alisma plantago-aquatica</i> L.)	Thân củ chế biến, phơi hay sấy khô	Các guaiane-type sesquiterpen, protostane-type triterpen, guaiane-type và kaurane-type diterpen; một lượng nhỏ các flavonoid, alkaloid, asparagin, phytosterol, acid béo, và resin	Chống oxy hóa, chống viêm, hạ lipid máu, chống béo phì, hạ đường huyết

<b>Dược liệu</b>	<b>Bộ phận sử dụng</b>	<b>Thành phần hóa học chính</b>	<b>Tác dụng dược lý</b>
Ngưu tất ( <i>Achyranthes bidentata</i> )	Rễ phơi hay sấy khô	Các triterpenoid saponin (achyranthosid, chikuserusaponin, chikusetsusaponin, oleanolic acid, bidentatosid,...), phytoecdysone (ecdysteron, podedcdyson, achyranthesteron, niuxixinsteron,...), các polysaccharid và một số hợp chất khác	Điều hòa miễn dịch, giảm đau, chống viêm, kháng khuẩn, hạ lipid máu, chống xơ vữa, bảo vệ tế bào thần kinh, chống loãng xương,...
Ngũ vị tử ( <i>Schizandra sinensis</i> )	Quả chín phơi hay sấy khô của cây bắc ngũ vị tử	Các dẫn xuất lignan (schizandrin, deoxyschizandrin, schizandrol, schizanderer,...), acid hữu cơ (citric, malic, fumaric và tartaric acid), đường, vitamin C, vitamin E, phenolic acid, tannin, phytosterol và tinh dầu	Kháng khuẩn, chống ung thư, chống đái tháo đường, chống béo phì, chống lão hóa
Ba kích ( <i>Morinda officinalis</i> )	Rễ phơi hay sấy khô	Các iridoid glycoside (monotropein, asperuloside, morofficinaloside, ...), đường và các polysaccharid, các anthraquinon (rubiadin, 1-hydroxyanthraquinone, physcion, ...), các triterpene (stigmasterol, daucosterol, scopoletin, ...), một số loại acid hữu cơ và tinh dầu	Chống viêm, chống oxy hóa, chống trầm cảm, cải thiện chức năng sinh sản, tác dụng bảo vệ thận, bảo vệ tim mạch
Kim anh tử ( <i>Rosa laevigata</i> )	Quả giả hay đế hoa chín phơi hay sấy khô	Polysaccharose, flavonoid (quercetin, kaempferide, isorhamnetin), saponin (ursolic acid, oleanolic acid, $\beta$ -sitosterol, daucosterol, hederagenin và 2a,3b,19a-trihydroxyolean-12-en-28-oic acid), và triterpen	Kháng khuẩn, điều trị tiêu chảy, đái dầm, chống oxy hóa, chống viêm, hạ lipid máu, bảo vệ gan
Tỏi khô	Dò của cây tỏi	Allicin (allyl-2-propene thiosulfinate), alliin, ajoene,	Kháng vi sinh vật (vi khuẩn,



<b>Dược liệu</b>	<b>Bộ phận sử dụng</b>	<b>Thành phần hóa học chính</b>	<b>Tác dụng dược lý</b>
<i>Allium sativum</i>		diallylsulphid, dithin, sallylcystein, allixin, vitamin B, protein, chất khoáng, saponin và flavonoid,...	nấm, ký sinh trùng, virus), hạ huyết áp, chống xơ vữa, chống huyết khối, chống viêm, điều hòa miễn dịch,...
Kỷ tử <i>Lycium sinense</i>	Quả chín phơi hay sấy khô của cây khởi tử	Polysaccharid, carotenoid (zeaxanthin, zeaxanthin dipalmitat, $\beta$ -caroten), flavonoid (rutin, hyperosid, quercetin, và morin), phenolic acid (gallic, caffeic, protocatechuic acid, chlorogenic và neochlorogenic acid), các sterol (cycloartenol, cycloartanol, gramisterol, ...),...	Chống oxy hóa, điều hòa miễn dịch và chống ung thư, hạ đường huyết, hạ lipid máu, tác dụng bảo vệ tế bào võng mạc
Cam thảo <i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Rễ và thân rễ phơi hay sấy khô	Các triterpene saponin, trong đó chủ yếu là glycyrrhizin (glycyrrhizic acid, glycyrrhizinic acid); các flavonoid (liquiritigenin và isoliquiritigenin)	Chống loét dạ dày, kháng virus, điều hòa miễn dịch, bảo vệ gan, chống ung thư
Nhân sâm <i>Panax ginseng</i>	Rễ chế biến rồi phơi hay sấy khô	Hơn 30 typ ginsenoside chia làm 2 nhóm, 20 (S)-protopanaxadiol và 20 (S)-protopanaxatriol, chủ yếu gồm Rg <sub>1</sub> (ginsenoside chủ yếu thuộc nhóm 20 (S)-protopanaxatriol), Rc, Rd, Re, Rb <sub>1</sub> (ginsenoside chủ yếu thuộc nhóm 20 (S)-protopanaxadiol), Rb <sub>2</sub> , và Rb <sub>0</sub>	Chống ung thư, bảo vệ thần kinh, bảo vệ gan, bảo vệ tim mạch, kích thích miễn dịch, hạ đường huyết, hạ lipid máu, chống oxy hóa, tăng khả năng hoạt động tinh dục
Xuyên khung <i>Ligusticum wallichii</i>	Thân rễ phơi hay sấy khô	Tinh dầu, các alkaloid (chuanxiongzone, trimethylamine, scopoletin,...), các phenolic acid, phthalide lacton, và các	Chống oxy hóa, bảo vệ tim mạch, bảo vệ thần kinh, giảm đau,

<b>Dược liệu</b>	<b>Bộ phận sử dụng</b>	<b>Thành phần hóa học chính</b>	<b>Tác dụng dược lý</b>
		thành phần khác.	chống viêm, kháng khuẩn, ...
Nhục thung dung ( <i>Herba Cistanches</i> )	Thân có chất thịt, có vảy đã phơi khô	Hợp chất dễ bay hơi (palmitic acid, linoleic acid, 14-methylpentadecanoat,...), hợp chất không bay hơi gồm các phenylethanoid glycosid (echinacosid, acteosid, các cistanosid, các tubulosid,...), iridoid, lignan, alditol, oligosaccharid, và polysaccharid	Cải thiện chức năng não, tăng cường hoạt động tinh dục, tăng cường miễn dịch, chống oxy hóa
Bạch truật ( <i>Atractylodes macrocephala</i> )	Thân rễ phơi hay sấy khô	Atractylol, atractylon, atractylenolid I-III, endesmol, atractylmacrol A-E,...	Kháng u, chống viêm, chống oxy hóa, chống loãng xương, bảo vệ thần kinh, điều hòa miễn dịch, ...
Đảng sâm ( <i>Codonopsis spp.</i> )	Rễ phơi khô của nhiều loài <i>Codonopsis</i>	Các alkaloid, phenylpropanoid, triterpen, polyacetylen, flavon, acid hữu cơ, polysaccharid, tinh dầu và các hợp chất khác	Chống oxy hóa, bảo vệ gan, chống viêm, chống ung thư, ...
Thỏ ty tử ( <i>Cuscuta sinensis</i> )	Hạt phơi hay sấy khô của cây Tơ hồng	Flavonoid (rutin, quercetin, isorhamnetin, astragalin [kaempferol-3-O-β-D-glucoside]), lignan, dẫn xuất acid quinic, polysaccharid	Bảo vệ gan, chống loãng xương, chống oxy hóa, chống lão hóa, chống trầm cảm, cải thiện chức năng tinh dục,...
Phá cố chi ( <i>Psoralea corylifolia</i> )	Hạt phơi khô	Isopsoralen, psoralen, dẫn xuất benzofuran (corylifonol, isocorylifonol), các flavonoid (corylifolean, corylifolin, corylifolinin, bakuchicin, psoralidin, bakuchalcone,	Hạ sốt, giảm đau, chống viêm, kháng khuẩn, kháng nấm, chống ung thư, bảo vệ gan, chống oxy

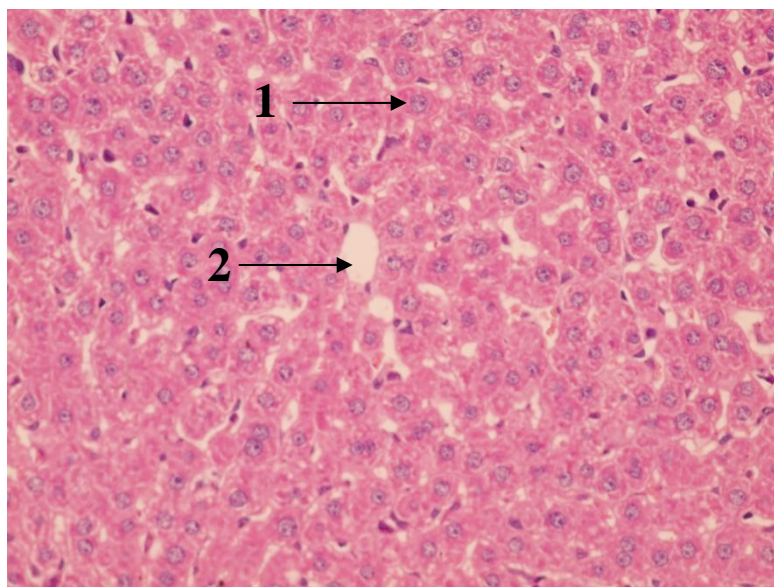
<b>Dược liệu</b>	<b>Bộ phận sử dụng</b>	<b>Thành phần hóa học chính</b>	<b>Tác dụng dược lý</b>
		psoralone, psoralenol,...),...	hóa, kích thích miễn dịch,...
Nhung hươu ( <i>Cornu Cervi parvum</i> )	Sừng non của con hươu (lộc) hoặc con nai (mê) đực	Lipid và các khoáng chất, protein (collagen và các acid amin), hormon tăng trưởng và yếu tố tăng trưởng (IGF-1, EGF), các glycosaminoglycan (chondroitin sulphat, glucosamin sulphat erythropoietin, các glycosphingolipid, hyaluronic acid, các prostaglandin, phospholipid), các chất ức chế monoamine oxidase	Chống thiếu máu, chống lão hóa, chống ung thư, chống viêm, kiểm soát huyết áp, tăng cường chức năng xương khớp, kích thích miễn dịch

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Đỗ Tất Lợi (2015). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học.
2. WHO (2010). WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS)
3. WHO (1999). WHO monographs on selected medicinal plants – Vol. 1
4. WHO (2004). WHO monographs on selected medicinal plants – Vol. 2
5. WHO (2007). WHO monographs on selected medicinal plants – Vol. 3
6. WHO (2009). WHO monographs on selected medicinal plants – Vol. 4

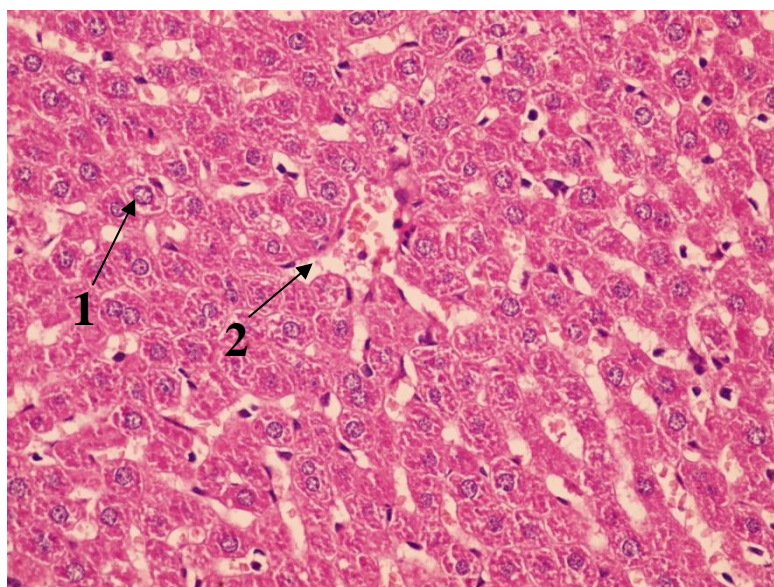
PHỤ LỤC 2

**HÌNH ẢNH VI THỂ GAN, THẬN CHUỘT CÔNG TRONG NGHIÊN CỨU  
ĐỘC TÍNH BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA VIÊN HOÀN CỨNG TD0014**



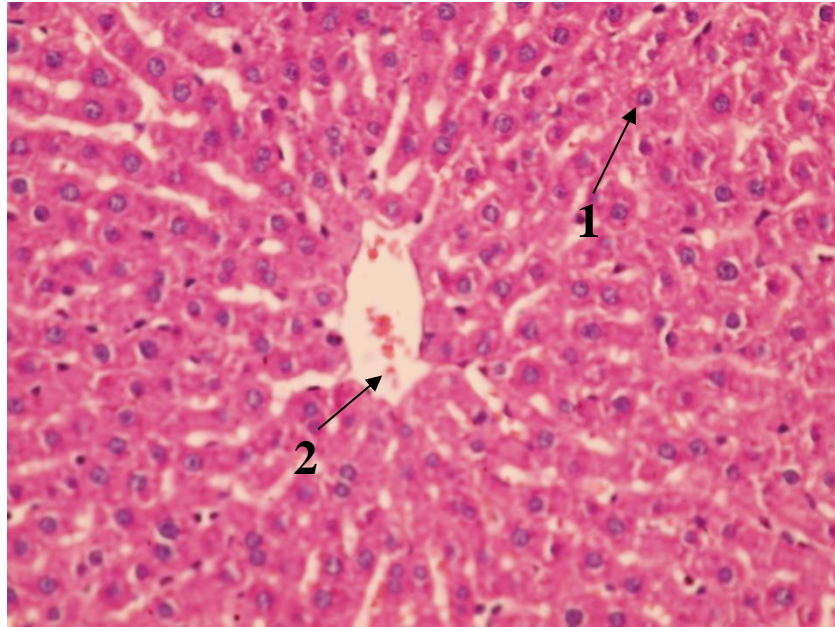
**Hình 1.** Hình thái vi thể gan chuột lô chứng (chuột số 3) (HE x 400)

1 – Tế bào gan thoái hóa nhẹ      2 – Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy  
(HE x 400: Nhuộm Hematoxylin - Eosin, độ phóng đại 400 lần)

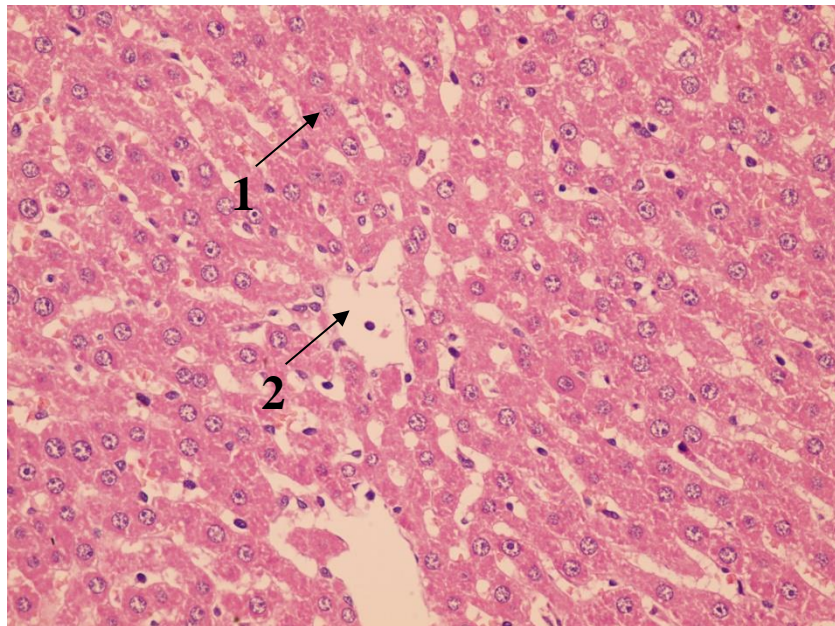


**Hình 2.** Hình thái vi thể gan chuột lô trị 1 (chuột số 98) (HE x 400)

1 – Tế bào gan thoái hóa nhẹ      2 – Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy

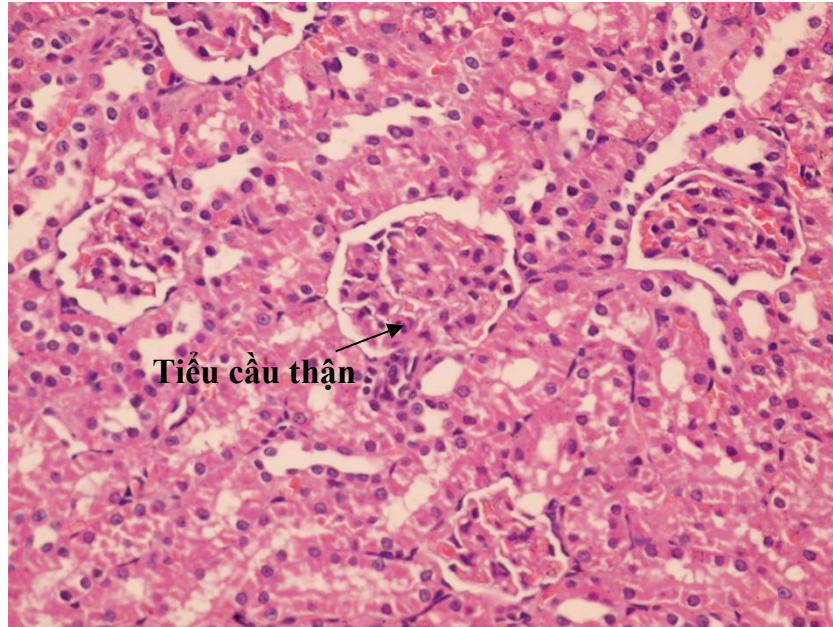


**Hình 3.** Hình thái vi thể gan chuột lô trị 1 (chuột số 100) (HE x 400)  
1 – Tế bào gan bình thường      2 – Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy

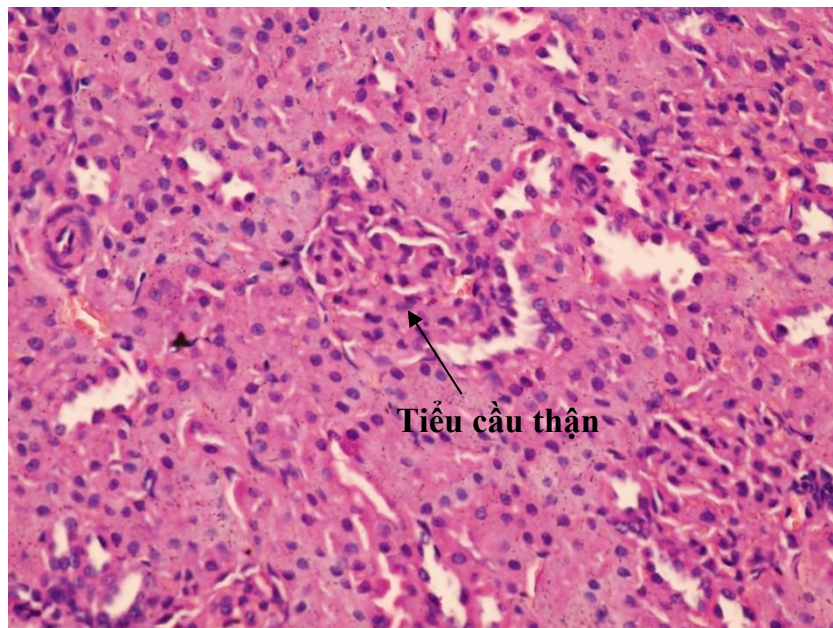


**Hình 4.** Hình thái vi thể gan chuột lô trị 2 (chuột số 81) (HE x 400)  
1 – Tế bào gan bình thường      2 – Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy

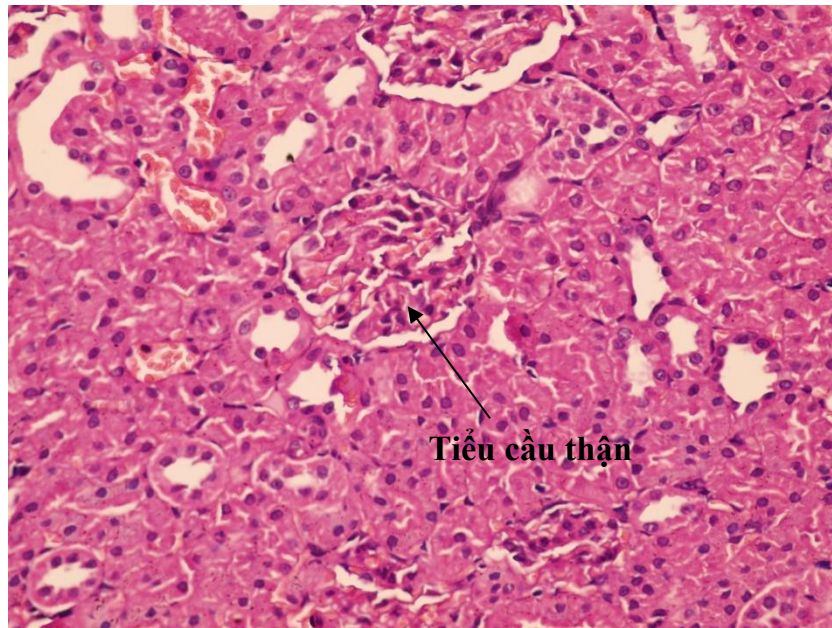




**Hình 5.** Hình thái vi thể thận chuột lô chứng (chuột số 3) (HE x 400)  
Thận có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần



**Hình 6.** Hình thái vi thể thận chuột lô chứng (chuột số 8) (HE x 400)  
Thận bình thường



**Hình 7.** Hình thái vi thể thận chuột lô trị 1 (chuột số 98) (HE x 400)  
Thận bình thường



**Hình 8.** Hình thái vi thể thận chuột lô trị 2 (chuột số 81) (HE x 400)  
Thận bình thường

## PHỤ LỤC 3

### TÓM TẮT QUY TRÌNH SẢN XUẤT SẢN PHẨM TD0014

#### **1. CHUẨN BỊ NGUYÊN LIỆU**

##### **1.1. Chuẩn bị bột hỗn hợp dược liệu**

Bột hỗn hợp dược liệu được chuẩn bị từ các dược liệu: Cúc hoa; Hoa đào; Hoa hòe; Hoài sơn; Hà thủ ô đỏ; Trần bì; Đương quy; Trạch tả; Ngưu tất; Ba kích; Tỏi khô; Nhân sâm; Xuyên khung; Nhục thung dung; Bạch truật; Đảng sâm. Các nguyên liệu được chuẩn bị như sau:

– ***Sơ chế Cúc hoa, Hoa đào, Hoa hòe, Trần bì:***

Dược liệu đạt tiêu chuẩn được rửa sạch, để ráo nước sau đó chuyển sang sấy khô ở nhiệt độ dưới 70<sup>0</sup>C, sau đó chuyển dược liệu sang sao qua rồi dùng để xay bột dược liệu.

– ***Sơ chế Hoài sơn, Trạch tả:***

Dược liệu đạt tiêu chuẩn được rửa đến khi sạch, sau đó ủ mềm trong khoảng 30 phút tiến hành phun nước thấm ẩm bề mặt dược liệu 1 lần, thời gian ủ qua đêm cho dược liệu mềm thì tiến hành thái. Dùng máy thái, thái lát dược liệu đã ủ thành những lát mỏng dày 1-5 mm, chuyển sang sấy khô bằng tủ sấy tĩnh điện hoặc máy sấy băng tải vi sóng ở nhiệt độ dưới 90<sup>0</sup>C đến khô. Dược liệu sau sấy chuyển sang sao vàng và sử dụng để xay bột.

– ***Sơ chế Hà thủ ô đỏ:***

Hà thủ ô đỏ được cho vào các thùng nhựa, cho nước sinh hoạt vào đầy các thùng, ngâm qua đêm (10-14 giờ), sau đó cho Hà thủ ô đỏ vào máy rửa để rửa đến sạch và được chế với Đỗ đen (đã vò rửa bằng rổ tre đến sạch đất cát). Chuyển toàn bộ dược liệu vào nồi nấu. Rải dược liệu xen kẽ, cụ thể rải đều một lượt mỏng Hà thủ ô sau đó rải đều một lượt mỏng đỗ đen lên trên. Tiến hành rải đều nhiều lần Hà Thủ ô và Đỗ đen cho đến hết. Cho nước sinh hoạt vào ngập bề mặt dược liệu và cách mặt 30 cm. Duy trì thời gian sôi lăn tăn trong thời gian 18 giờ, bổ sung nước nếu dịch cạn xuống mặt dược liệu. Dịch sau khi đủ thời gian hầm tiến hành rút dịch chiết, thu hồi Hà thủ ô và loại bỏ đỗ đen. Tiến hành lọc dịch chiết Hà thủ ô qua rây



0,3 mm, loại bỏ đỗ đen, thu hồi dịch Hà thủ ô chuyển sang công đoạn tiếp theo. Chuyển dịch sau lọc vào nồi cô hồ, bổ sung 350 g sodium benzoat, tiến hành cô cạn dịch đến thể chất sánh thì ngừng lại, chuyển dịch chiết sang công đoạn tẩm dược liệu và sấy đến khô. Dược liệu sau chế dùng để xay bột.

– **Sơ chế Đương quy, Xuyên khung, Bạch truật, Nhục thung dung:**

Dược liệu đạt tiêu chuẩn được rửa sạch đến khi sạch, sau đó ủ mềm trong khoảng 30 phút tiến hành phun nước thấm ẩm bề mặt dược liệu 1 lần, thời gian ủ qua đêm cho dược liệu mềm thì tiến hành thái. Dùng máy thái, thái lát dược liệu đã ủ thành những lát mỏng dày 1-5 mm, chuyển sang sấy khô bằng tủ sấy tĩnh điện hoặc máy sấy băng tải vi sóng ở nhiệt độ dưới 70<sup>0</sup>C đến khô. Dược liệu sau sấy chuyển sang sao qua và sử dụng để xay bột

– **Sơ chế Đảng sâm:**

Dược liệu đạt tiêu chuẩn được rửa sạch đến khi sạch, sau cắt thành từng đoạn 3-5 cm và chuyển sang sấy khô bằng tủ sấy tĩnh điện hoặc máy sấy băng tải vi sóng ở nhiệt độ dưới 90<sup>0</sup>C đến khô. Dược liệu sau sấy chuyển sang sao vàng và sử dụng để xay bột.

– **Sơ chế Ngưu tất:**

Dược liệu đạt tiêu chuẩn được rửa sạch đến khi sạch, sau cắt thành từng đoạn 3-5 cm và chuyển sang sấy khô bằng tủ sấy tĩnh điện hoặc máy sấy băng tải vi sóng ở nhiệt độ dưới 90<sup>0</sup>C đến khô. Dược liệu sau sấy chuyển sang sao qua và sử dụng để xay bột.

– **Sơ chế Nhung hươu:** Nhung hươu được cạo sạch lông, thái lát và phơi khô.

Các nguyên liệu sau sơ chế được cân theo tỷ lệ công thức, trộn đều rồi chuyển sang xay mịn bằng máy xay búa, rây bột qua rây inox kích thước 0,2-0,3 mm. Bột mịn được đóng trong 2 lần túi PE kín và thùng carton, có nhãn đầy đủ, đúng qui chế. Bột mịn thu được dùng để pha chế viên hoàn cứng.

## **1.2. Chuẩn bị hỗn hợp cao dược liệu**

Hỗn hợp cao dược liệu được chiết xuất từ các dược liệu: Bạch tật lê; Đỗ đen; Bá bệnh; Tỳ giải; Rễ đinh lăng; Dây đau xương; Mộc qua; Lạc tiên; Đại táo; Thục địa; Ngũ vị tử; Kim anh tử; Kỳ tử; Cam thảo; Nhục thung dung; Thỏ ty tử; Phá cố chi.

- *Thỏ ty tử và Phá cố chỉ*: Rửa sạch dược liệu bằng rá vo gạo. Đóng dược liệu vào 2 lần bao tải đũa, buộc chặt từng lần túi. Mỗi bao không quá 1/3 thể tích của bao.
- *Thực địa*: Để nguyên, không tiến hành rửa
- *Nhục thung dung, cam thảo*: Thái dược liệu dài 3-5 cm bằng máy thái dược liệu.
- *Các dược liệu còn lại*: Cho toàn bộ dược liệu còn lại vào bể, xả ngập nước. Dùng rổ mắt dày vớt và xóc dược liệu cho đến sạch (nhìn thấy nước bẩn thì thay bằng nước khác).

Chuyển toàn bộ dược liệu đã sơ chế vào nồi chiết dịch có dung tích phù hợp. Mỗi nồi chiết xuất 3 nước, nồi cuối chiết xuất 2 nước. Chỉ chuyển cô dịch chiết nước 1 của các nồi chiết và dịch chiết nước 2 của nồi cuối cùng. Các dịch chiết nước 2 (trừ nước 2 nồi cuối) và nước 3 sử dụng làm dung môi chiết xuất cho các nồi tiếp theo.

Dịch chiết được cô sơ bộ tại hệ thống cô kép được chuyển sang nồi cô chân không, cho natri benzoat vào nồi cô đã có sẵn dịch cô, đóng chặt nắp nồi, bật cánh khuấy, tiến hành cô đặc cho đến khi hết dịch cô và cao đạt hàm ẩm thì dừng lại. Lấy mẫu bán thành phẩm, nếu đạt độ ẩm yêu cầu 20-30% thì tiến hành ra cao. Đóng cao vào 2 lần túi PE, đựng trong thùng nhựa đã được vệ sinh sạch, dùng để pha chế viên hoàn cứng.

### **1.3. Chuẩn bị tá dược dính**

- Nấu hồ Amidon 16% theo tỷ lệ công thức.
- Cân các nguyên liệu gồm cao hỗn hợp dược liệu, nước tinh khiết, natri benzoat cho vào nồi nấu, cấp nhiệt và bật khuấy để cao tan hoàn toàn và thành hỗn hợp đồng nhất. Thêm tiếp hồ Amidon 16% đã chuẩn bị và khuấy đồng nhất sẽ thu được tá dược dính dùng để pha chế.

### **1.4. Chuẩn bị dịch bao màu Black 952**

Cho lần lượt vào thùng inox theo công thức: nước RO đun sôi để nguội, đường kính trắng khuấy tan, thêm cồn cao độ, natri benzoat, màu Black 952 khuấy đồng nhất thu được hỗn hợp dịch bao màu.

### **1.5. Pha dịch bao bóng HPMC**

Cho lần lượt vào thùng nhựa theo công thức: cồn cao độ, nước RO đun sôi để nguội, khuấy đều. Thêm HPMC, bóp kỹ rây lại qua rây inox 2,0 mm, thêm natri benzoat và khuấy cho tan hết thu được dịch bao bóng viên hoàn.

## **2. PHA CHẾ**

- Cân hỗn hợp bột mịn thảo mộc vừa chuẩn bị ở mục 1.1 và Avicel 101 theo tỷ lệ công thức trong máy nhào trộn 2 cánh, bật máy.
- Thêm hỗn hợp tá dược dính từ từ, vừa thêm vừa nhào trộn khoảng 20 phút thành hỗn hợp dẻo dính và đồng nhất.
- Chuyển khối dính đồng nhất đã chuẩn bị sang hệ thống tạo viên hoàn tự động, viên ướt thu được được chuyển sấy khô bằng máy sấy khô vi sóng ở nhiệt độ 80°C đến khô.
- Viên khô thu được được sàng phân loại viên bằng máy sàng, viên đạt kích thước chuyển sang công đoạn bao màu bằng hỗn hợp dịch màu thực phẩm đã chuẩn bị ở mục 1.4 và đánh bóng bằng hỗn hợp HPMC vừa đủ đã chuẩn bị ở mục 1.5.
- Lấy mẫu kiểm tra chất lượng, nếu đạt chuyển sang công đoạn đóng gói.

## **3. ĐÓNG GÓI CẤP 1**

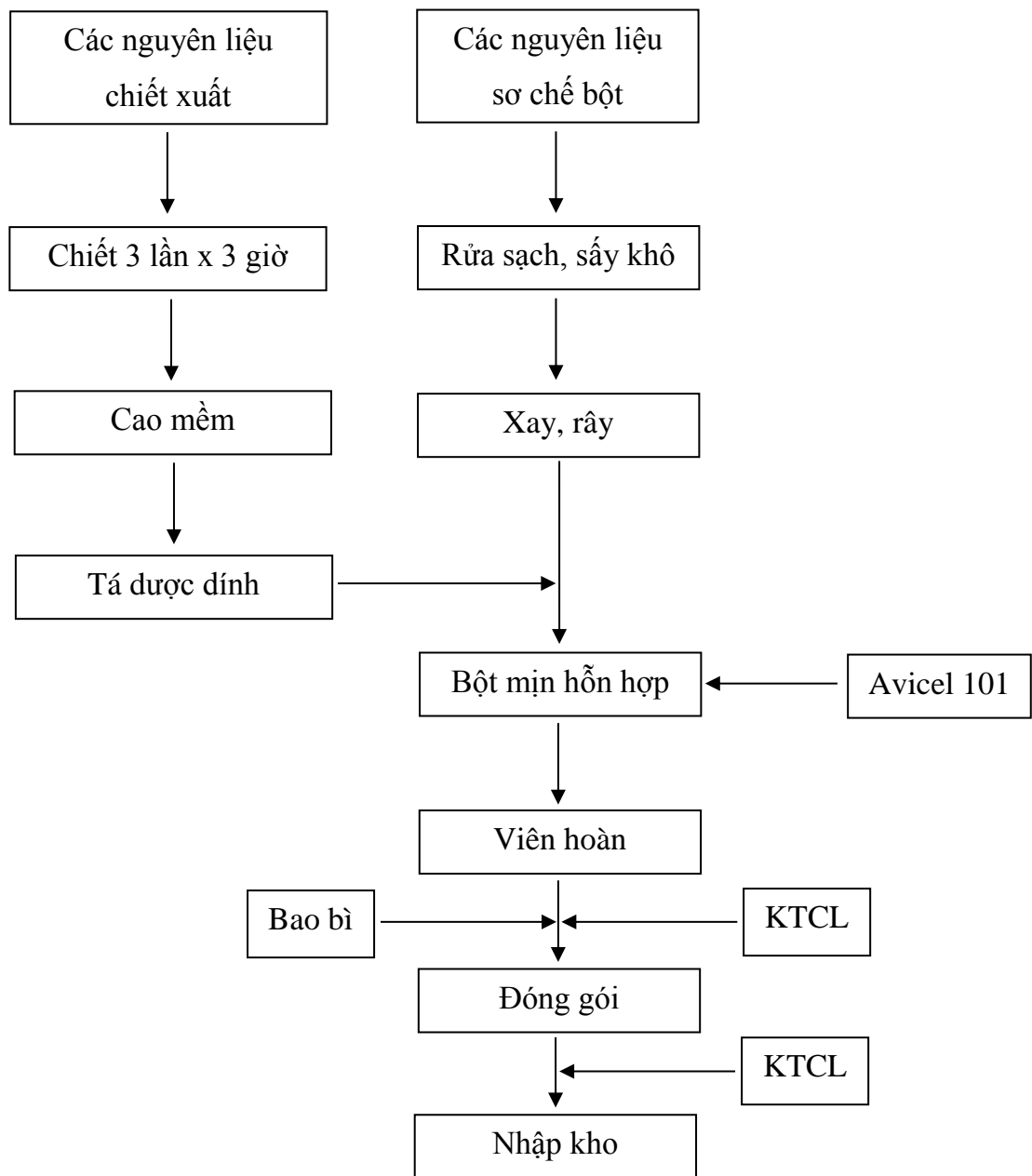
- Viên hoàn cứng đạt tiêu chuẩn được chuyển sang đóng túi bằng máy đóng gói bán tự động với khối lượng gói không kể vỏ từ 7,125-7,875 gam
- Lấy mẫu kiểm tra BTP, nếu đạt chuyển sang đóng gói cấp 2.

## **4. ĐÓNG GÓI CẤP 2**

- Hộp 10 gói/20 gói/30 gói
- Đóng các hộp trong thùng carton, ghi đầy đủ các nội dung theo qui định.
- Lấy mẫu kiểm tra chất lượng thành phẩm, nếu đạt chuyển công đoạn nhập kho bảo quản.

## **5. NHẬP KHO, BẢO QUẢN**

- Lấy mẫu kiểm tra chất lượng thành phẩm.
- Nếu đạt chất lượng thì chuyển sang nhập kho bảo quản.



**Sơ đồ các giai đoạn sản xuất sản phẩm TD0014**

## PHỤ LỤC 4

### **TIÊU CHUẨN CƠ SỞ**

#### **Áp dụng cho sản phẩm Thực phẩm chức năng Viên uống TD0014**

#### **1. YÊU CẦU KỸ THUẬT**

**1.1. Cảm quan:** Viên hoàn cứng hình cầu, màu nâu đen đến đen, mùi thơm đặc trưng của dược liệu.

**1.2. Độ ẩm:**  $\leq 12\%$ .

**1.3. Đồng đều khối lượng:** 6,7 gam – 8,3 gam

**1.4. Định tính:** Chế phẩm phải thể hiện phép thử định tính của kỳ tử, đỏ đen.

**1.5. Hàm lượng kim loại gây độc:**

- Chì: Không quá 3,0 ppm
- Thủy ngân: Không quá 0,1 ppm
- Cadimi: Không quá 1,0 ppm

**1.6. Độ nhiễm khuẩn:**

- Tổng VKHK: không quá 10.000 CFU/g
- Tổng số bào tử nấm mốc, nấm men: Không lớn hơn 100CFU/1g
- *Coliforms*: Không quá 10 CFU/g
- *E. coli*: Không được có trong 1 g sản phẩm
- *Staphylococcus aureus*: Không lớn hơn 3 CFU/g
- *Cl. perfringens*: Không lớn hơn 10 CFU/g
- *Salmonella*: Không được có trong 25g sản phẩm.
- *B. cereus*: Không lớn hơn 10 CFU/g

**1.7. Các chất không mong muốn:**

- Aflatoxin B1: Không quá 5 ppm
- Aflatoxin B1, B2, G1, G2: Không quá 15 ppm
- Dư lượng chất bảo vệ thực vật: Phù hợp với quyết định số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19/12/2007 của Bộ Y tế.

#### **2. PHƯƠNG PHÁP THỬ**

**3.1. Cảm quan:** Kiểm tra bằng cảm quan chế phẩm phải đạt yêu cầu đã nêu.

**3.2. Độ ẩm:** (1g; 105<sup>0</sup>C)

**3.3. Độ đồng đều khối lượng:** Thử theo ĐĐVN IV

**3.4. Định tính:**

**2.4.1. Kỹ tử**

- Dụng cụ, thuốc thử:

- + Bản mỏng silicagel G chấm sắc ký của Merk được hoạt hóa 110<sup>0</sup>C trong 30 phút
- + Dung môi triển khai sắc ký: chloroform – ethyl acetat – acid formic (2:3:1)
- + Thuốc thử hiện màu: soi đèn tử ngoại bước sóng 365 nm

- Cách thử:

- + Dung dịch thử: Lấy 5 gam chế phẩm, nghiền mịn, thêm nước, đun sôi nhẹ 60 phút. Để nguội, lọc. Lấy dịch lọc thêm 20 mL ethyl acetat, lắc, gạn lớp ethyl. Cô cách thủy đến cạn được cặn. Hòa tan cặn với 1 mL ethanol được dung dịch chấm sắc ký.
- + Dung dịch chuẩn: lấy 2 g dược liệu chuẩn, cắt nhỏ, làm tương tự dung dịch thử được dung dịch chuẩn.
- + Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10  $\mu$ L dung dịch chuẩn và dung dịch thử . Triển khai sắc ký cho đến khi dung môi được khoảng 12 – 13 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, soi đèn tử ngoại bước sóng 365 nm.

- **Yêu cầu:** trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết cùng màu, cùng Rf với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn

**2.4.2. Đồ đen**

- Dụng cụ, thuốc thử:

- + Bản mỏng silicagel G chấm sắc ký của Merk được hoạt hóa 110<sup>0</sup>C trong 30 phút
- + Dung môi triển khai sắc ký: 1-propanol – ethanol – acid acetic – nước (4:4:4:2)
- + Thuốc thử hiện màu: dung dịch Ninhydrin 0,5% trong ethanol 96%.

- Cách thử:

- + Dung dịch thử: Lấy 5 gam chế phẩm nghiền mịn, thêm 30 mL ethanol 70%, lắc siêu âm 10 phút, lọc được dung dịch chám sắc ký.
- + Dung dịch đối chiếu: lấy 1 gam đỗ đen xay nhỏ, thêm 30 mL ethanol 70%, lắc siêu âm trong 10 phút, lọc được dung dịch chám sắc ký.
- + Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10  $\mu$ L dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Triển khai sắc ký cho đến khi dung môi được khoảng 12 – 13 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Phun thuốc thử hiện màu và sấy bản mỏng ở 105<sup>0</sup>C đến khi hiện vết.
- **Yêu cầu:** trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết cùng màu, cùng Rf với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn

### **3.5. Hàm lượng các kim loại gây độc:**

#### ***Chì (Pb)***

- Thuốc thử: Theo DĐVNIV
  - + Dung dịch chì chuẩn: 3 $\mu$ g/mL
  - + Dung dịch đệm acetat (pH = 3,5):
  - + Dung dịch thioacetamid 4% (khối lượng/thể tích)
  - + Amoniac đậm đặc (TT)
  - + Acid acetic băng (TT)
  - + Dung dịch phenolphtalein (CT)
  - + Thuốc thử thioacetamid: hòa tan hỗn hợp gồm 3 mL dung dịch natri hydroxyd 1M, 1 mL nước cất và 4 mL glycerin (85%) và 1,6 mL dung dịch thioacetamid 4%, dùng ngay sau khi pha.
- Thiết bị: Chén sứ, ống Nesler 50 mL
- Tiến hành:

*Mẫu thử:* Cân chính xác khoảng 1 g mẫu thử vào chén sứ, đun trên bếp đến khô, tiếp tục đun nóng trên bếp đến khi hết khói, chuyển chén sứ vào lò nung và nung ở nhiệt độ 400<sup>0</sup>C cho đến khi thu được cặn màu trắng hoặc nhạt màu. Lấy mẫu thử ra khỏi lò nung, để nguội rồi hòa cặn với 8ml dung dịch acid hydrocloric 2M (TT), đem lọc.

*Mẫu chuẩn:* Hút chính xác 1 mL dung dịch chì chuẩn và làm song song với mẫu thử.

*Mẫu chuẩn không vô cơ hóa:* Hút chính xác 1ml dung dịch chì chuẩn thêm 8ml dung dịch acid hydrocloric 2M (TT).

Thêm vào mỗi mẫu 0,1 mL dung dịch phenolphtalein (CT) rồi thêm từng giọt dung dịch amoniac đậm đặc đến khi có màu hồng. Sau đó thêm acid acetic băng đến khi mất màu dung dịch, thêm dư 0,5ml nữa và 2ml đệm acetat pH 3,5. Thêm 1,2 mL thuốc thử thioacetamid mới pha.

So sánh mẫu thử với mẫu chuẩn: Màu thu được của dung dịch thử không được đậm hơn màu của dung dịch chuẩn

### ***Thuỷ ngân, cadimi***

Sử dụng phương pháp AAS.

### **3.6. Độ nhiễm khuẩn:**

Cân chính xác khoảng 10 g chế phẩm vào bình nón nút mài dung tích 200 mL đã được tiệt trùng và đã cân bì. Thêm vào đó một lượng dung dịch natri clorid 0,9% vô trùng vừa đủ để pha loãng chế phẩm thành các nồng độ đem thử nghiệm thích hợp như:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ... hoặc 1/2, 1/5, 1/20, 1/40... sao cho khi đếm khuẩn lạc trên đĩa Petri có đường kính 90 – 100 mm số lượng khuẩn lạc không vượt quá 300 trong một đĩa. Tiến hành thử theo DDVN IV.

## **4. ĐÓNG GÓI - GHI NHÃN - BẢO QUẢN:**

**4.1. Đóng gói:** Viên hoàn cứng được đóng trong gói màng nhôm, 1 hộp x 10 gói hoặc 1 hộp x 30 gói.

**4.2. Ghi nhãn:** Đúng qui chế

**4.3. Bảo quản:** Nơi khô, tránh ánh sáng trực tiếp.