

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

BÁO CÁO TÓM TẮT

ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP ĐẠI HỌC

**NGHIÊN CỨU TÍNH AN TOÀN VÀ TÁC DỤNG TĂNG CƯỜNG
KHẢ NĂNG SINH TINH CỦA CAO ĐẶC TESTIN CT3
TRÊN THỰC NGHIỆM**

Mã số: ĐH2015-TN05-01

Chủ nhiệm đề tài: Nguyễn Thị Phương Thảo

Thái Nguyên, 06/2019

**DANH SÁCH NHỮNG THÀNH VIÊN THAM GIA NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI
VÀ ĐƠN VỊ PHỐI HỢP CHÍNH**

THÀNH VIÊN THAM GIA NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI			
T T	Họ và tên	Đơn vị công tác và lĩnh vực chuyên môn	Nội dung nghiên cứu cụ thể được giao
1	Nguyễn Thị Phương Thảo	BM Dược lý- ĐHYDTN	Chủ nhiệm đề tài
2	Ts. Nguyễn Hoàng Ngân	BM Dược lý - HVQY	Nghiên cứu viên
3	Bs. Châu Văn Việt	Khoa Ngoại nhi – BV TƯ TN	Nghiên cứu viên
4	CN. Nguyễn Văn Thắng	Phòng QLKH-QHQT	Thư ký hành chính
ĐƠN VỊ PHỐI HỢP CHÍNH			
Tên đơn vị trong và ngoài nước	Nội dung phối hợp nghiên cứu		Họ và tên người đại diện đơn vị
BM Dược lý – Học viện Quân Y BM Dược học cổ truyền – Đại học Dược Hà Nội	Nghiên cứu thực nghiệm, chỉ đạo và giám sát nghiên cứu Bào chế cao đặc, chỉ đạo và giám sát nghiên cứu		PGS. TS Vũ Mạnh Hùng PGS. TS Vũ Văn Điền

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

FSH	: Follicle stimulating hormon
GnRH	: Gonadotropin releasing hormon
LH	: Luteinising hormon
NCKH	: Nghiên cứu khoa học
NST	: Nhiễm sắc thể
OECD	: Organisation for Economic Co-operation and Development (Tổ chức hợp tác và phát triển kinh tế)
SHBG	: Sex hormon binding globulin
TLCT	: Trọng lượng cơ thể
YHCT	: Y học cổ truyền
WHO	: World health organisation (Tổ chức Y tế thế giới)

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
TỔNG QUAN TÀI LIỆU	2
1.1. Cơ quan sinh dục nam và quá trình sinh tinh trùng.....	2
1.1.1. Tinh hoàn.....	2
1.1.2. Quá trình sinh tinh.....	2
1.2. Những yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sinh tinh trùng	2
1.3. Quan niệm của Y học cổ truyền về suy giảm tinh trùng	2
1.3.1. Nguyên nhân.	2
1.3.2. Điều trị	2
1.4. Xuất xứ bài thuốc và tổng quan các vị thuốc trong cao đặc Testin CT3.....	3
1.4.1. Xuất xứ bài thuốc cao đặc Testin CT3.....	3
ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	4
2.1. CHẤT LIỆU VÀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	4
2.1.1. Bài thuốc nghiên cứu Testin CT3.....	4
2.1.2. Đối tượng nghiên cứu.....	4
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	4
2.2.1. Nghiên cứu độc tính cấp.....	4
2.2.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn.....	5
2.2.3. Nghiên cứu độc tính trên chức năng sinh sản và phát triển.....	5
2.2.4. Nghiên cứu tác dụng của cao đặc Testin CT3 trên hình thái tinh hoàn chuột cống trắng.....	6
2.3. Xử lý số liệu	7
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	8
3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của cao đặc Testin CT3	8
3.2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao đặc Testin CT3.....	8
3.3. Nghiên cứu độc tính trên sinh sản và phát triển của cao đặc Testin CT3	8
3.4. Nghiên cứu tác dụng của cao đặc Testin CT3 trên hình thái tinh hoàn chuột cống trắng.....	8
3.4.1. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên hình thái tinh hoàn bình thường.....	8
3.4.2. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên hình thái tinh hoàn bị gây tổn thương bằng nhiệt	8
BÀN LUẬN	9
4.1. BÀI THUỐC NGHIÊN CỨU	9
4.2. VỀ ĐỘC TÍNH CỦA CAO ĐẶC TESTIN CT3	10
4.2.1. Độc tính cấp	10
4.2.2. Độc tính bán trường diễn.....	10

4.2.3. Độc tính bán trên chức năng sinh sản và phát triển.....	10
4.3. VỀ MÔ HÌNH GÂY TỒN THƯƠNG TINH HOÀN	10
4.4. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CỦA CAO ĐẶC TESTIN LÊN HÌNH THÁI TINH HOÀN CHUỘT CỎNG TRẮNG.....	11
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	12

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: Nghiên cứu tính an toàn và tác dụng tăng cường khả năng sinh tinh của cao đặc Testin CT3 trên thực nghiệm.
- Mã số: ĐH2015-TN05-01
- Chủ nhiệm đề tài: Nguyễn Thị Phương Thảo
- Tổ chức chủ trì: Trường Đại học Y Dược – Đại học Thái Nguyên
- Thời gian thực hiện: 24 tháng (Từ tháng 01/2015 đến tháng 12/2016)

2. Mục tiêu:

- Đánh giá tính an toàn của cao đặc Testin CT3
- Nghiên cứu sơ bộ ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên hình thái tinh hoàn trên thực nghiệm

3. Tính mới và sáng tạo:

- Đề tài tập trung vào nghiên cứu phát triển chế phẩm mới từ thảo dược, tăng cơ hội lựa chọn cho người bệnh, giảm chi phí trong điều trị, giảm các ảnh hưởng bất lợi từ những phương pháp điều trị theo y học hiện đại.

4. Kết quả nghiên cứu:

- Cao đặc Testin CT3 an toàn ở mức liều đã khảo sát
- Cao đặc Testin CT3 đã có tác động theo hướng tích cực, cải thiện rõ hình ảnh mô học tinh hoàn.

5. Sản phẩm:

* **Sản phẩm khoa học:** 2 bài báo đăng trên các tạp chí khoa học

- Nguyễn Thị Phương Thảo, Đỗ Thị Hà, Lê Thị Loan, Vũ Thị Diệp, Vũ Văn Điền, Vũ Mạnh Hùng (2018), “Nghiên cứu tiêu chuẩn hóa bài thuốc Testin CT3 dựa trên các chỉ tiêu định tính và định lượng một số chất đặc trưng bằng phương pháp TLC và HPLC”, *Tạp chí Dược học*, số 511, tr.23-27.

- Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Hoàng Ngân, Vũ Mạnh Hùng, Vũ Văn Điền, Trần Công Trường (2017), “Evaluation of acute and subchronic toxicity of Testin CT3 in experimental animal”, *Journal of Military pharmaco-medicine*, N°7-2017, p.35-41.

* **Sản phẩm đào tạo:** Hỗ trợ luận án cho nghiên cứu sinh Nguyễn Thị Phương Thảo (đang thực hiện), với tên đề tài: “Nghiên cứu tính an toàn và tác dụng tăng cường khả năng sinh tinh của cao đặc Testin CT3 trên thực nghiệm” – tại Học Viện Quân Y.

6. Phương thức chuyển giao, địa chỉ ứng dụng, tác động và lợi ích mang lại của kết quả nghiên cứu:

- Công bố tính an toàn và ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 được bào chế từ các dược liệu, từ đó có cơ sở khoa học để phát triển sản phẩm thuốc từ dược liệu và ứng dụng trên lâm sàng trong điều trị vô sinh ở nam giới.
- Hỗ trợ số liệu cho luận án nghiên cứu sinh.

Ngày tháng năm 2019

Chủ nhiệm đề tài

Nguyễn Thị Phương Thảo

INFORMATION ON RESEARCH RESULTS

1. General information:

Project title: Research safety and effect of Testin CT3 on enhance reproductive abilities in experimental animal.

Code number: ĐH2015-TN05-01

Coordinator: Nguyen Thi Phuong Thao

Implementing institution: Thai Nguyen university of medicine and pharmacy

Duration: 24 months (from 01/2015 to 12/2016)

2. Objectives:

- Evaluation of safety of Testin CT3 in experimental animal
- Evaluate the effect of Testin CT3 on histopathological of testes tissue in experimental

3. Creativeness and innovativeness:

The research focuses on the development new preparation from herbal, increasing the choice of patients, reducing the cost of treatment, and reducing the adverse effects of modern medical treatments.

4. Research results:

- Testin CT3 was safe and good in the doses when test
- Testin CT3 has an action in the major path to improvement in the histological study of testes tissue.

5. Products:

* *Scientific products*: 2 articles published scientific journals

- Nguyen Thi Phuong Thao, Do Thi Ha, Le Thi Loan, Vu Thi Diep, Vu Van Dien, Vu Manh Hung (2018), "Research on qualitative and quantitative analysis of the extract of Testin CT3 remedy", *Pharmaceutical Journals*, N^o511, pp.23-27.

- Nguyen Thi Phuong Thao, Nguyen Hoang Ngan, Vu Manh Hung, Vu Van Dien, Tran Cong Truong (2017), "Evaluation of acute and subchronic toxicity of Testin CT3 in experimental animal", *Journal of Military pharmaco-medicine*, N^o7-2017, pp.35-41.

* *Training products*: To help for disertation of post granduate Nguyen Thi Phuong Thao (2013): "Research safety and effect of Testin CT3 on enhance reproductive abilities in experimental animal" – in Vietnam Military Medical University

6. Transfer alternatives, application institutions, impacts and benefits of research results:

- Communique safety and effect of Testin CT3 on enhance reproductive abilities, which from the database for the development for the product from the herbals, and application on the clinical to treatment male infertility.

- Support for training 01 doctoral students

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Tỷ lệ có thai tự nhiên ở các cặp vợ chồng bình thường là 20-25% mỗi tháng, 75% sau 6 tháng và 90% sau năm đầu tiên. Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO) vô sinh được định nghĩa như sau: một cặp vợ chồng mới cưới, có sức khỏe bình thường, sau 12 tháng chung sống trong sinh hoạt tình dục mà không sử dụng bất kỳ biện pháp tránh thai nào nhưng người vợ không có thai, được xếp vào nhóm bị mắc bệnh vô sinh. Mỗi ngày hai tinh hoàn sản xuất trên 100 triệu tinh trùng, mỗi lần xuất tinh có khoảng 50 triệu tinh trùng để đảm bảo cho sinh lý thụ tinh bình thường. Do đó nếu số lượng và chất lượng tinh trùng suy giảm, khả năng sinh sản tự nhiên của nam giới sẽ bị ảnh hưởng. Nhiều số liệu thống kê và báo cáo khoa học cho thấy ngoài các căn bệnh liên quan đến hệ sinh sản ở nam giới, số lượng và chất lượng tinh trùng ở nam giới ngày càng giảm. Bất thường về số lượng và chất lượng tinh trùng là nguyên nhân hiếm muộn phổ biến nhất hiện nay và chiếm trên 90% nguyên nhân vô sinh nam, nhiều nhất là thiếu năng tinh trùng. Tuy nhiên việc điều trị còn gặp nhiều khó khăn do cơ chế bệnh phức tạp, nên mặc dù hiện nay có nhiều phương pháp điều trị được đưa ra nhưng kết quả còn tản mạn theo từng nguyên nhân.

Y học hiện đại đã đạt được nhiều thành tựu trong điều trị các rối loạn quá trình sinh tinh trùng, nhưng đa số thuốc sử dụng đều có những tác dụng không mong muốn do thường phải điều trị kéo dài, giá thành tương đối cao. Chính vì vậy, trong những năm gần đây nhiều nhà khoa học có xu hướng nghiên cứu thuốc y học cổ truyền (YHCT), vì thuốc YHCT chứng tỏ có hiệu quả tốt, tính an toàn cao, giá thành phù hợp, có thể uống kéo dài và ít có những ảnh hưởng bất lợi. Hiện nay xu hướng sử dụng thuốc YHCT trong điều trị thiếu năng tinh trùng ngày càng tăng.

Tại Việt Nam thuốc y học cổ truyền được sử dụng điều trị thiếu năng tinh trùng trong nhân dân có từ lâu đời, giá thành rẻ. Tuy nhiên được nghiên cứu một cách hệ thống chỉ mới có một số công trình NCKH được công bố. Đã có nhiều vị thuốc, bài thuốc đông y được dùng để điều trị các chứng thuộc dương hư (liệt dương, di tinh, mộng tinh) như: “Sinh tinh thang”, “Hồi xuân hoàn”, “Hải mã và sâm Việt Nam”...

Cao đặc Testin CT3 là bài thuốc được xây dựng từ 8 vị dược liệu có tác dụng bổ khí huyết, bổ can thận, tăng cường lưu thông máu và có tác dụng dược lý hướng sinh dục, tăng tác dụng bổ dương. Để có cơ sở đưa cao đặc Testin CT3 áp dụng trong lâm sàng điều trị, làm tăng số lượng tinh trùng, chúng tôi tiến hành đề tài: **“Nghiên cứu tính an toàn và tác dụng tăng cường khả năng sinh tinh của cao đặc Testin CT3 trên thực nghiệm”**

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Đánh giá tính an toàn của cao đặc Testin CT3
- Nghiên cứu sơ bộ ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên hình thái tinh hoàn trên thực nghiệm.

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Cơ quan sinh dục nam và quá trình sinh tinh trùng

Hệ sinh sản (hay sinh dục) có chức năng tạo ra tế bào sinh sản hay còn gọi là tế bào sinh dục (tinh trùng, trứng) và hormon sinh sản. Hai chức phận này có quan hệ mật thiết với nhau để thực hiện chức năng sinh sản và duy trì nòi giống.

Hệ sinh sản – sinh dục nam gồm có tinh hoàn, mào tinh, ống dẫn tinh, ống phóng tinh, túi tinh, thừng tinh, tuyến tiền liệt, và các bộ phận sinh dục ngoài (bìu, dương vật, niệu đạo nam. Chức năng sinh sản của nam giới có thể được chia thành 3 phân khu chính: (1) sinh tinh, hay sự hình thành của tinh trùng; (2) thực hiện các hành vi tình dục nam; và (3) điều chỉnh chức năng sinh sản nam bằng các hormon khác nhau. Sự kết hợp các chức năng sinh sản nam là những tác động của hormon sinh dục nam trên những cơ quan sinh dục phụ, sự trao đổi chất của tế bào, tăng trưởng và những chức năng khác của cơ thể.

Tinh trùng hình thành từ các ống sinh tinh trong tinh hoàn, di chuyển qua lưới tinh và các ống xuất để đến mào tinh. Tại đây tinh trùng trải qua quá trình trưởng thành và được tích trữ tại đuôi mào tinh trước khi xuất tinh. Khi không có hiện tượng phóng tinh, tinh trùng sẽ chết, thoái hóa và bị hấp thu bởi biểu mô của mào tinh. Khi xuất tinh, tinh trùng di chuyển từ đuôi mào tinh, ống dẫn tinh, bóng tinh, ống phóng tinh đến niệu đạo sau, trộn chung với tinh dịch được tiết ra từ hai túi tinh và tuyến tiền liệt, rồi được phóng ra ngoài theo đường niệu đạo. Toàn bộ hệ sinh sản – sinh dục nam phụ thuộc vào testosterone do tinh hoàn tiết ra, và được điều hòa bởi tuyến yên và vùng hạ đồi.

1.1.1. Tinh hoàn

1.1.1.1. Phôi thai học của tinh hoàn

1.1.1.2. Cấu trúc chung của tinh hoàn

1.1.2. Quá trình sinh tinh

* **Các bước của quá trình sinh tinh:** Từ các tế bào mầm ban đầu phải trải qua rất nhiều giai đoạn trong quá trình biệt hóa để trở thành tinh trùng. Hiện tượng này gọi là quá trình sinh tinh, quá trình sinh tinh trải qua 3 giai đoạn: Sinh tinh bào, giảm phân, tạo tinh trùng.

1.2. Những yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sinh tinh trùng

Yếu tố di truyền, nhiệt độ, giãn tĩnh mạch thừng tinh, cấu trúc và chức năng các thụ cảm thể biến đổi, nhiễm trùng, các thuốc, hóa chất, dinh dưỡng, môi trường, bệnh toàn thân, nguyên nhân khác.

1.3. Quan niệm của Y học cổ truyền về suy giảm tinh trùng

1.3.1. Nguyên nhân: Thận tinh suy tổn, thận dương hư, tỳ hư tinh tổn, can khí uất kết, khí trệ huyết ứ (can khí hoành nghịch), thấp nhiệt hạ tiêu, do chế độ ăn uống, sinh hoạt.

1.3.2. Điều trị

1.3.2.1. Thận âm hư: Bổ ích tinh tủy, tư bổ thận âm.

1.3.2.2. Thận dương hư: ôn thận tráng dương, cố tinh ích khí.

1.3.2.3. Tỳ hư tinh tổn: ích khí, kiện tỳ, dưỡng huyết sinh tinh.

1.3.2.4. Can khí uất kết, khí trệ huyết ứ: sơ can, giải uất, kiện tỳ hòa doanh, hoạt huyết hóa ứ thông tinh.

1.3.2.5. Thấp nhiệt hạ tiêu: thanh nhiệt, lợi thấp, giải độc.

1.3.2.6. Chế độ ăn uống luyện tập

1.4. Xuất xứ bài thuốc và tổng quan các vị thuốc trong cao đặc Testin CT3

1.4.1. Xuất xứ bài thuốc cao đặc Testin CT3

Cấu tạo bài thuốc Testin CT3 gồm các vị thuốc sau:

+ Bá bệnh (<i>Radix Eurycomae longifoliae</i>)	10g
+ Xà sàng tử (<i>Fructus Cnidii</i>)	12g
+ Dâm dương hoắc (<i>Herba Epimedii</i>)	10g
+ Đương quy (<i>Radix Angelicae sinensis</i>)	14g
+ Bạch tật lê (<i>Fructus Tribuli terrestris</i>)	12g
+ Hoàng kỳ (<i>Radix Astragali membranacei</i>)	14g
+ Câu kỷ tử (<i>Fructus Lycii</i>)	16g
+ Ba kích (<i>Radix Morindae officinalis</i>)	10g
Tổng:	98g

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. CHẤT LIỆU VÀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Bài thuốc nghiên cứu Testin CT3

- Cơ sở thiết kế bài thuốc:

+ Dựa vào lý luận của Y học cổ truyền về các bệnh do thận hư gây ra, trong đó đi sâu vào các chứng liên quan đến suy giảm sinh sản, sinh dục nam.

+ Dựa vào tính năng của các vị thuốc để chọn vị thuốc kê đơn cho phù hợp với điều trị bệnh suy giảm chức năng sinh sản nam.

+ Dựa vào tác dụng dược lý và thành phần hóa học của các vị thuốc đã được chứng minh có tác dụng điều trị bệnh suy giảm chức năng sinh dục sinh sản.

- Trong bài thuốc có 5 vị thuốc là Bá bệnh, Bạch tật lê, Xà sàng tử, Dâm dương hoắc và Ba kích đã chứng minh có tác dụng cải thiện chức năng sinh sản, sinh dục nam, phối hợp thêm Hoàng kỳ, Đương quy và Câu kỷ tử để bổ khí huyết, bổ can thận. Khi kết hợp thuốc cải thiện chức năng sinh dục và thuốc bồi bổ cơ thể thì tác dụng cải thiện sự suy giảm chức năng sinh sản, sinh dục sẽ tốt hơn. Tất cả các dược liệu trên đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam IV, được đưa vào bào chế và chiết xuất dưới dạng cao đặc với tỷ lệ 4,5:1.

2.1.2. Đối tượng nghiên cứu

❖ **Độc tính cấp:** Chuột nhắt trắng chủng Swiss

❖ **Độc tính bán trường diễn:** Thỏ nhà, cả hai giống đực và cái khỏe mạnh

❖ **Độc tính trên sinh sản:** Chuột nhắt trắng chủng Swiss.

❖ **Nghiên cứu tác dụng của Testin CT3 lên hình thái tinh hoàn:** Chuột cống trắng đực.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nghiên cứu độc tính cấp

Dựa theo theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon và hướng dẫn của WHO về xác định độ an toàn cho các chế phẩm có nguồn gốc thiên nhiên. Cho chuột ở các lô uống cao đặc Testin CT3 với mức liều tăng dần để xác định liều thấp nhất gây chết 100% (LD_{100}) số chuột, liều cao nhất chưa gây chết chuột nào (LD_0) và các mức liều trung gian. Theo dõi tình trạng chung (ăn uống, hoạt động, bài tiết...) và số chuột chết liên tục sau uống liều cuối trong vòng 72 giờ và trong 7 ngày. Ghi lại số chuột chết trong 72 giờ và trong 7 ngày sau khi uống thuốc. Sử dụng phương pháp dùng Excel máy tính, tính liều LD_{50} , sau đó kiểm tra lại bằng phương pháp Litchfield - Wilcoxon.

2.2.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Dựa theo quy định của Bộ Y tế Việt Nam, hướng dẫn của OECD và WHO về đánh giá hiệu lực và tính an toàn của thuốc từ dược liệu. Thí nghiệm tiến hành trên thỏ, liều 5,88 g/kg/24 giờ (liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người, tính theo hệ số 3), liều 17,64 g/kg/24 giờ (gấp 3 lần lô trị 1). Thỏ được uống liên tục trong 42 ngày, mỗi ngày 1 lần vào các buổi sáng. Thời gian theo dõi trong 6 tuần. Theo dõi tình trạng chung, huyết học, sinh hóa. Ở mỗi lô chọn ngẫu nhiên 50% thỏ lấy gan, lách, thận làm tiêu bản đánh giá tổn thương ở mức độ vi thể.

2.2.3. Nghiên cứu độc tính trên chức năng sinh sản và phát triển

Dựa theo quy định hướng dẫn của OECD và WHO về nghiên cứu độc tính trên sinh sản và phát triển.

Giai đoạn trước khi ghép cặp thế hệ P:

180 chuột nhắt trắng thế hệ P, gồm 60 chuột đực và 120 chuột cái được chia ngẫu nhiên vào 3 nhóm. Liều dùng thuốc: liều 23,05 g dược liệu khô/kg/24 giờ (liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người, tính theo hệ số 12). Liều 69,15 g dược liệu khô/kg/24 giờ (gấp 3 lần lô trị 1). Chuột nhắt đực uống thuốc ít nhất 28 ngày trước khi ghép cặp. Khi chuột uống thuốc đủ thời gian, tiến hành ghép cặp, chia làm 3 lô nghiên cứu sau: 20 chuột đực uống thuốc + 40 chuột cái không uống thuốc. Ghép chuột: mỗi chuồng 1 chuột đực, 2 chuột cái, ghép trong vòng 2 tuần. Sau khi ghép cặp ở lô 1 và lô 2 vẫn tiếp tục cho chuột uống thuốc đến khi nhận định chuột cái đã có thai. Nhận định chuột cái có thai bằng các dấu hiệu: bụng to, bè ngang, lưng võng, dáng đi chậm, trọng lượng tăng nhanh. Khi đã xác định chuột cái đã có thai, hạn chế cân chuột.

➤ Giai đoạn sau ghép cặp

15 ngày sau khi ghép cặp, tách riêng đực, cái. Chia ngẫu nhiên chuột cái ở các chuồng thành 2 nhóm:

- **Nhóm 1:** gồm 50% số chuột cái, được mổ để quan sát, đánh giá các chỉ số phôi thai và tình trạng buồng trứng của chuột.

Để chuẩn bị cho việc mổ, chuột mẹ được gây bất động bằng kéo giãn đốt sống cổ. Mổ bụng, bộc lộ ổ bụng, phẫu thuật bóc tách hai sừng tử cung và hai buồng trứng. Quan sát các chỉ tiêu lượng giá bằng mắt thường và dưới kính lúp. Ghi nhận các chỉ tiêu lượng giá như sau:

+ Số hoàng thể: hoàng thể là những chấm màu đỏ thẫm hoặc đỏ hồng, nổi gồ lên khỏi bề mặt buồng trứng, trên đỉnh của chấm hơi lõm xuống.

+ Số thai sống: màu hồng, các khối thai căng tương đối đều nhau, có thể thấy các phần của thai cử động dưới lớp màng bọc khi thai lớn.

+ Số thai chết sớm (tương ứng với xảy thai ở người): là thai không còn nhìn rõ hình thái, bị thoái hóa nhiều hay ít, để lại trên tử cung một mô thoái hóa màu nâu giống như vết máu thâm. Nếu thai chết ở giai đoạn rất sớm, vết tích còn lại cũng ít hơn.

+ Số thai chết muộn (tương ứng với thai chết lưu ở người): là thai còn nhìn thấy rõ hình thái, bắt đầu bị thoái hóa hay chỉ là thai có màu nhợt nhạt.

+ Số mẫu mất trứng: khi có hoàng thể nhưng không có thai tương ứng.

- **Nhóm 2:** số chuột cái còn lại được nuôi đến khi đẻ để quan sát đánh giá thể hệ con F1.

Chuột có thai được nuôi riêng, hạn chế cân chuột. Những ngày trước đẻ, chuột được nuôi chuồng riêng.

Phân tích các chỉ số: đếm số con sinh ra, số con chết, dị tật bẩm sinh.

Thế hệ F1

Số chuột con F1 do P đẻ ra được nuôi lớn trong điều kiện của phòng thí nghiệm. Khi chuột nhất trắng con có cân nặng đạt 12g (khoảng 3 tuần sau khi sinh), tách riêng đực, cái. Tiếp tục nuôi lớn (không chuột nào được uống Testin) khi cân nặng đạt từ 28 gram trở lên (khoảng 10 tuần tuổi), tiến hành ghép cặp một đực với hai cái để đánh giá tình trạng phôi thai của F1 và tình trạng con non của F1 (F2) theo quy trình như trên.

2.2.4. Nghiên cứu tác dụng của cao đặc Testin CT3 trên hình thái tinh hoàn chuột cống trắng

* Liều và cách dùng: Sử dụng 2 mức liều:

+ Lô 1 (chứng – không dùng thuốc): uống nước muối sinh lý

+ Lô 2 (lô trị 1): uống cao đặc Testin CT3 liều 12,68 g/kg/24 giờ (liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người, tính theo hệ số 7).

+ Lô 3 (lô trị 2): uống cao đặc Testin CT3 liều 38,04 g/kg/24 giờ (gấp 3 lần lô trị 1).

* 70 chuột cống trắng đực có trọng lượng khoảng 160 ± 20 g, được chia ngẫu nhiên vào 2 nhóm lớn: nhóm không gây tổn thương tinh hoàn (30 chuột) và nhóm gây tổn thương tinh hoàn (40 chuột).

- Nhóm không gây tổn thương tinh hoàn: chia chuột thành 3 lô, mỗi lô 10 con. Lô 1 cho uống nước cất, lô 2 uống cao đặc testin liều 1, lô 3 uống cao đặc testin liều 2. Thời gian uống thuốc là 30 ngày. Sau đó vào thời điểm ngày thứ 35, ngày thứ 70 giết 5 chuột ở mỗi lô để đánh giá hình thái tinh hoàn.

- Nhóm gây tổn thương tinh hoàn: Tất cả chuột cống được gây tổn thương tinh hoàn theo mô hình của Galil và Setchell (Thụy Điển) bằng cách: ngâm tinh hoàn chuột trong nước 43°C (dùng thiết bị điều nhiệt – thermostat) trong 30 phút để làm tổn thương tinh hoàn chuột. Sau đó chia 40 chuột ra 4 lô làm thí nghiệm. Lô 1 cho uống nước cất, lô 2 cho uống cao đặc testin liều 1, lô 3 cho uống cao đặc testin liều 2, lô 4 cho uống provironum. Thời gian uống là 30 ngày. Sau đó, tại thời điểm ngày thứ 21, ngày thứ 35, ngày thứ 70 giết chuột ở mỗi lô để đánh giá hình thái tinh hoàn

- Đánh giá hình thái tinh hoàn: Lấy mẫu mô tinh hoàn ở vị trí ngẫu nhiên, cố định trong dung dịch Bouin. Làm tiêu bản vi thể, nhuộm màu Hematoxylin – Eosin.

2.3. Xử lý số liệu

Các số liệu thu được xử lý theo phần mềm Microsoft Excel 2007, SPSS 22.0, sử dụng thuật toán thống kê Independent-Sample T-Test và Paired-Sample T-Test. Số liệu được trình bày dưới dạng Mean \pm SE. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của cao đặc Testin CT3

$LD_{50} = 250,13 \text{ g/kg}$ (210,2 g/kg – 297,45 g/kg).

3.2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao đặc Testin CT3

Thỏ uống cao đặc Testin CT3 liên tục trong thời gian 42 ngày ở cả 2 mức liều không ảnh hưởng tới chỉ số huyết học, sinh hóa máu và mô bệnh học gan, lách thận của thỏ

3.3. Nghiên cứu độc tính trên sinh sản và phát triển của cao đặc Testin CT3

3.4. Nghiên cứu tác dụng của cao đặc Testin CT3 trên hình thái tinh hoàn chuột cống trắng

3.4.1. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên hình thái tinh hoàn bình thường

❖ **Lô chứng:** Lòng ống sinh tinh có đầy đủ các tế bào tăng sinh, cấu trúc biểu mô tinh không bị đảo lộn, các tế bào dòng tinh có đầy đủ các giai đoạn.

❖ **Lô trị 1:** Ống sinh tinh có hình thái bình thường, lòng ống sinh tinh có cấu trúc bình thường, chứa đầy đủ các tế bào dòng tinh.

❖ **Lô trị 2:** Ống sinh tinh có hình thái bình thường, lòng ống sinh tinh có cấu trúc bình thường, chứa đầy đủ các tế bào dòng tinh.

3.4.2. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên hình thái tinh hoàn bị gây tổn thương bằng nhiệt

❖ **Lô chứng:** Nhiều ống sinh tinh có rối loạn quá trình sinh tinh.

❖ **Lô trị 1:**

- **Ngày thứ 21:** Lòng ống sinh tinh bị tổn thương giãn rộng, trong lòng ống sinh tinh còn rất ít tế bào dòng tinh, cấu trúc tế bào dòng tinh bị đảo lộn, trong mô kẽ có chứa tế bào tuyến kẽ.

- **Ngày thứ 35:** Có nhiều ống sinh tinh thành lòng lẻo bị tổn thương có rất ít tế bào dòng tinh, chủ yếu chỉ thấy tinh bào 1 và tinh bào 2. Tuy nhiên xen kẽ vẫn có những ống sinh tinh với hình thái cấu trúc tương đối bình thường, chứng tỏ có những ống sinh tinh đang dần hồi phục.

- **Ngày thứ 70:** Các ống sinh tinh hồi phục tương đối tốt, có nhiều ống sinh tinh xuất hiện nhiều tế bào dòng tinh, trong mô kẽ có tuyến kẽ. Có 1 vài ống sinh tinh bị tổn thương teo nhỏ.

- Trong lòng ống sinh tinh các tế bào dòng tinh hồi phục tốt, các tinh nguyên bào, tinh bào 1, tinh bào 2 tăng sinh nhiều, có tiền tinh trùng và tinh trùng.

❖ **Lô trị 2:**

- **Ngày thứ 21:** Lòng ống sinh tinh bị tổn thương, còn rất ít tế bào dòng tinh, một số màng đáy bị tổn thương, mô kẽ giãn rộng, không thấy rõ tế bào kẽ

- **Ngày thứ 35:** Lòng ống sinh tinh đang dần hồi phục, xuất hiện nhiều tế bào dòng tinh, màng đáy dần phục hồi.

- **Ngày thứ 70:** Lòng ống sinh tinh hồi phục tốt, chứa đầy đủ các tế bào dòng tinh. Màng đáy không bị tổn thương. Trong mô kẽ có tế bào kẽ.

BÀN LUẬN

4.1. BÀI THUỐC NGHIÊN CỨU

Việc nghiên cứu các thuốc có tác dụng chữa hoặc hỗ trợ trong điều trị các trường hợp vô sinh nam hiện đang được các nhà khoa học trên thế giới cũng như trong nước rất quan tâm. Trong những năm gần đây xu hướng trên thế giới cũng như ở Việt Nam đang tìm kiếm các thuốc có nguồn gốc thảo dược để chữa và hỗ trợ điều trị vô sinh nam. Bước đầu cho thấy các kết quả nghiên cứu thuốc y học cổ truyền rất khả quan và ngày càng được phổ biến rộng rãi hơn trong điều trị. Hơn nữa, thuốc y học cổ truyền thường ít tác dụng phụ, có thể điều trị kéo dài, chi phí cho việc điều trị lại thấp hơn nhiều so với các phương pháp y học hiện đại. Theo kinh nghiệm trong dân gian có khá nhiều bài thuốc, vị thuốc được sử dụng trong điều trị hoặc hỗ trợ điều trị những trường hợp vô sinh nam do suy giảm tinh trùng như: Cá ngựa, Đỗ trọng, Nhục thung dung, Ba kích, Tỏa dương, Thỏ ty tử, Bá bệnh... Một số dược liệu đã được chứng minh trên thực nghiệm có tác dụng tăng cường chức năng sinh sản nam như: Bá bệnh, Xà sàng tử, Ba kích, Bạch tật lê...

Từ kinh nghiệm lâu năm trong ngành, PGS. TS Vũ Văn Điền – Trường Đại học Dược Hà Nội đã thiết kế bài thuốc Testin CT3. Thành phần của bài thuốc gồm các vị thuốc sau: Bá bệnh 10g; Xà sàng tử 12g; Dâm dương hoắc 10g; Đương quy 14g; Bạch tật lê 12g; Hoàng kỳ 14g; Câu kỷ tử 16g; Ba kích 10g.

Theo lý luận của Y học cổ truyền, trong bài thuốc có 5 vị thuốc: Bá bệnh, Xà sàng tử, Ba kích, Bạch tật lê và Dâm dương hoắc có tác dụng bổ dương, đã được sử dụng trong thực tế để tăng cường chức năng sinh dục nam. Một số nghiên cứu trên thực nghiệm cũng cho thấy các dược liệu này có tác dụng cải thiện sự suy giảm tinh trùng. Đồng thời phối hợp thêm Hoàng kỳ, Đương quy và Câu kỷ tử để bổ khí huyết, bổ can thận. Khi kết hợp thuốc cải thiện chức năng sinh dục và thuốc bồi bổ cơ thể thì tác dụng cải thiện sự suy giảm chức năng sinh sản, sinh dục sẽ tốt hơn.

Xuất phát từ những yêu cầu trên, tác giả đã chọn bài thuốc Testin CT3 làm chất liệu nghiên cứu để xác định tính an toàn của Testin CT3, tác dụng của Testin CT3 trên chức năng sinh sản giống đực trên thực nghiệm, để có cơ sở khoa học chứng minh bài thuốc có hay không tác dụng tăng cường chức năng sinh sản nam, và từ đó ứng dụng bài thuốc này trên lâm sàng trong điều trị.

Liều sử dụng trong nghiên cứu được ngoại suy từ liều dùng trong thực tế. Bài thuốc có tổng 98 g dược liệu, được sắc để uống cho 1 người 50 kg trong 1 ngày. Vậy thì liều dùng trên người là 1,96 g/kg; từ đó ngoại suy ra liều dùng trên chuột nhất là 23,05 g/kg (tính theo hệ số 12) và liều dùng trên chuột cống là 12,68 g/kg (tính theo hệ số 7)

4.2. VỀ ĐỘC TÍNH CỦA CAO ĐẶC TESTIN CT3

4.2.1. Độc tính cấp

Đã xác định được LD₅₀ của cao đặc Testin CT3 bằng đường uống trên thực nghiệm là 250,13 g/kg (210,2 g/kg – 297,45 g/kg). Nếu so với liều dùng trên người là 98 g dược liệu/ngày thì LD₅₀ gấp 10,85 lần (tính theo hệ số ngoại suy trên chuột nhất trắng là 12). Theo hướng dẫn của WHO và hướng dẫn nghiên cứu thuốc mới, sử dụng Testin CT3 là tương đối an toàn. Theo kết luận của Diezi được đề cập trong tài liệu, thuốc thử nghiệm được xem là có độc tính cao khi LD₅₀ < 5 mg/kg, và có độc tính thấp khi LD₅₀ > 5 g/kg. Do đó có thể coi cao đặc Testin CT3 có độc tính thấp. Tuy nhiên khi so sánh với các bài thuốc khác có nguồn gốc dược liệu thì Testin CT3 thuộc loại có độc, bởi đa số các bài thuốc khác khi nghiên cứu độc tính cấp đều không xác định được LD₅₀.

4.2.2. Độc tính bán trường diễn

Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn đã cho thấy: Thỏ uống cao đặc Testin CT3 liên tục trong 6 tuần với các liều là 5,88 g/kg trọng lượng (tương ứng với liều sử dụng trên người) và 17,64 g/kg trọng lượng (tương ứng với liều gấp 3 lần liều dùng trên người) không gây thay đổi có ý nghĩa về tình trạng chung, các chức phận tạo máu, xét nghiệm sinh hóa máu cũng như hình ảnh mô bệnh học gan thận.

4.2.3. Độc tính bán trên chức năng sinh sản và phát triển

Trong đề tài này độc tính trên chức năng sinh sản và phát triển được nghiên cứu qua 3 thế hệ: thế hệ P, thế hệ F1 và thế hệ F2. Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.5 cho thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ mang thai giữa lô chứng và các lô điều trị qua các thế hệ ($p > 0,05$). Các chỉ số phôi thai (số hoàng thể trung bình/mẹ tỷ lệ phần trăm thai sống, thai chết sớm, thai chết muộn) và tình trạng sinh con giữa các thế hệ (số con trung bình/số mẹ, số con chết, số con dị tật) cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các lô qua các thế hệ. Như vậy có thể bước đầu rút ra kết luận: cao đặc Testin không gây ra các đột biến di truyền có thể ảnh hưởng đến thế hệ F1 và F2. Tuy nhiên để có thể khẳng định chính xác hơn độc tính di truyền qua các thế hệ cần làm những nghiên cứu sâu hơn để khẳng định.

4.3. VỀ MÔ HÌNH GÂY TỔN THƯƠNG TINH HOÀN

Nhằm đánh giá tác dụng của cao đặc Testin CT3 một cách đầy đủ tác giả muốn vừa đánh giá tác dụng trên chuột có chức năng tinh hoàn bình thường vừa đánh giá trên chuột có tổn thương tinh hoàn do nhiệt để tìm hiểu tác dụng và cơ chế tác dụng của thuốc thử trên chức năng tinh hoàn nhất là khi chức năng bị suy giảm do tổn thương tinh hoàn.

Có nhiều cách gây tổn thương chức năng tinh hoàn đã được nhiều tác giả áp dụng như chiếu xạ, chiếu đèn với công suất cao, dùng thuốc hóa chất như natri valproat, depakin. Tuy nhiên

những phương pháp này đều phức tạp và khó đảm bảo tính đồng nhất. Do vậy, tác giả dùng nước nhiệt độ cao để gây thương tổn tinh hoàn vì nhiệt độ cao là một trong các yếu tố làm giảm hoặc ngừng sản sinh tinh trùng.

4.4. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CỦA CAO ĐẶC TESTIN LÊN HÌNH THÁI TINH HOÀN CHUỘT CÔNG TRẮNG

Tinh hoàn chuột được nhúng vào nước 43°C một lần duy nhất kéo dài trong 30 phút. Kết quả quan sát cho thấy sau 24 giờ đã có hiện tượng biểu mô tinh xung huyết, thoái hóa; tuyến kẽ tổn thương với hình ảnh xung huyết, giãn mạch. Đến ngày thứ 21 thì ống sinh tinh bị tổn thương nặng nề, tuyến kẽ xung huyết và tan rã. Nhưng đến ngày thứ 35 cấu trúc tinh hoàn đã bắt đầu có biểu hiện hồi phục và đến ngày thứ 70 biểu mô tinh đã hồi phục cơ bản nhưng còn mỏng, mô kẽ có hiện tượng tăng sợi liên kết. Kết quả này tương tự kết quả của Setchell B.P.

Trên cơ sở kết quả thu được, tác giả chọn mô hình gây tổn thương tinh hoàn bằng nước nóng 43°C để nghiên cứu tác dụng của cao đặc Testin CT3 lên hình thái - chức năng tinh hoàn chuột bị tổn thương sau khi đã nghiên cứu trên chuột bình thường. Tác giả cho rằng mô hình này gần giống với thực tế lâm sàng của những bệnh nhân vô sinh do giảm số lượng và chất lượng tinh trùng.

Đối với lô không gây tổn thương tinh hoàn: Ở hai lô dùng thuốc, quan sát thấy ống sinh tinh có hình thái bình thường, lòng ống sinh tinh cấu trúc bình thường, có đầy đủ và cân đối các giai đoạn của tế bào dòng tinh giống nhóm chứng. Điều này chứng tỏ khi ta dùng cao đặc Testin CT3 ở cả hai mức liều đều không có những ảnh hưởng bất lợi đến tinh hoàn chuột.

Đối với lô gây tổn thương tinh hoàn: lô chứng nhiều ống sinh tinh có rối loạn quá trình sinh tinh, các tế bào có sự thay đổi rõ rệt, sự hồi phục tinh hoàn đến ngày thứ 70 là có nhưng chưa hồi phục hoàn toàn. Đối với các lô dùng cao đặc Testin CT3 có thấy sự hồi phục dần về mặt hình thái, xuất hiện các ống sinh tinh với hình thái cấu trúc tương đối bình thường vào ngày thứ 35 và 70, chứng tỏ ống sinh tinh dần hồi phục.

Như vậy có thể thấy cao đặc Testin CT3 đã có tác động theo hướng tích cực đến sự trưởng thành và biệt hóa các tế bào dòng tinh nói riêng cũng như cấu trúc ống sinh tinh nói chung.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Trên cơ sở những kết quả thu được, tác giả có một số kết luận sau đây về tác dụng của cao đặc Testin lên hình thái tinh hoàn trên thực nghiệm như sau:

* Về tính an toàn của cao đặc Testin CT3

Từ kết quả thu được trên thực nghiệm, tác giả kết luận:

- Độc tính cấp của cao đặc Testin CT3 dùng theo đường uống $LD_{50} = 250,13$ g/kg.
- Độc tính bán trường diễn: sử dụng liều 5,88 g/kg và liều 17,64 g/kg liên tục trong 42 ngày, mỗi ngày một lần:

- + Không ảnh hưởng đến trọng lượng cơ thể thỏ
- + Không ảnh hưởng đến chỉ số huyết học của thỏ
- + Không ảnh hưởng đến chỉ số sinh hóa trong máu thỏ
- + Không gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận của thỏ

- Độc tính trên sinh sản và phát triển: cao đặc Testin CT3 không ảnh hưởng đến các chỉ số phôi thai và đặc điểm thể hệ con sinh ra qua các thế hệ.

* Tác dụng của cao đặc Testin lên hình thái tinh hoàn

Cao đặc Testin CT3 đã có tác động theo hướng tích cực đến sự trưởng thành và biệt hóa các tế bào dòng tinh nói riêng cũng như cấu trúc ống sinh tinh nói chung.

2. Kiến nghị

Trên cơ sở những kết quả nghiên cứu đã đạt được, để tiếp tục phát triển các kết quả nghiên cứu sâu hơn, chúng tôi đề xuất một số kiến nghị sau:

- Tiếp tục nghiên cứu đánh giá tính an toàn bằng nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 trên độc tính nhiễm sắc thể di truyền.

- Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng cao đặc Testin CT3 trên chức năng tinh hoàn.