

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

BÁO CÁO TỔNG KẾT

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: DH2015-TN05-01

Chủ nhiệm đề tài: Nguyễn Thị Phương Thảo

Thái Nguyên, 06/2019

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT
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: DH2015-TN05-01

Xác nhận của tổ chức chủ trì

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	Ths. 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	Nghiên cứu thực nghiệm, chỉ đạo và giám sát nghiên cứu		PGS. TS Vũ Mạnh Hùng
BM Dược học cổ truyền – Đại học Dược Hà Nội	Bào chế cao đặc, chỉ đạo và giám sát nghiên cứu		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	3
1.1. Cơ quan sinh dục nam và quá trình sinh tinh trùng	3
1.1.1. Tinh hoàn	4
1.1.2. Quá trình sinh tinh	7
1.2. Những yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sinh tinh trùng.....	10
1.2.1. Điều hòa nội tiết trong quá trình sinh tinh.....	11
1.2.2. Yếu tố di truyền	13
1.2.3. Nhiệt độ.....	13
1.2.4. Giãn tĩnh mạch thừng tinh	14
1.2.5. Cấu trúc và chức năng các thụ cảm thể biến đổi	14
1.2.6. Nhiễm trùng [31]	14
1.2.7. Các thuốc [31].....	15
1.2.8. Hóa chất [31]	15
1.2.9. Dinh dưỡng	16
1.2.10. Môi trường	16
1.2.11. Các bệnh toàn thân.....	17
1.2.12. Các nguyên nhân khác	17
1.3. Quan niệm của Y học cổ truyền về suy giảm tinh trùng.....	17
1.3.1. Nguyên nhân	18
1.3.2. Điều trị	21
1.4. Xuất xứ bài thuốc và tổng quan các vị thuốc trong cao đặc Testin CT3	24
1.4.1. Xuất xứ bài thuốc cao đặc Testin CT3	24
1.4.2. Thông tin về các vị thuốc của bài thuốc	24
ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
2.1. CHẤT LIỆU VÀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	30
2.1.1. Bài thuốc nghiên cứu Testin CT3	30
2.1.2. Đối tượng nghiên cứu	31
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	31
2.2.1. Nghiên cứu độc tính cấp	31

2.2.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn	32
2.2.3. Nghiên cứu độc tính trên chức năng sinh sản và phát triển.....	32
2.2.4. Nghiên cứu tác dụng của cao đặc Testin CT3 trên hình thái tinh hoàn chuột cống trắng	35
2.3. Xử lý số liệu	36
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	37
3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của cao đặc Testin CT3	37
3.2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao đặc Testin CT3	38
3.2.1. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 đến trọng lượng thỏ	38
3.2.2. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 đến một số chỉ tiêu huyết học của thỏ	39
3.2.3. Đánh giá chức năng gan, thận.....	40
3.2.4. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 đến mô bệnh học gan, thận, lách thỏ ..	41
3.3. Nghiên cứu độc tính trên sinh sản và phát triển của cao đặc Testin CT3.....	42
3.3.1. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên khả năng mang thai các thế hệ.....	42
3.3.2. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên chỉ số phôi thai qua các thế hệ.....	43
3.3.3. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 đến sự sinh con qua các thế hệ	44
3.4. Nghiên cứu tác dụng của cao đặc Testin CT3 trên hình thái tinh hoàn chuột cống trắng.....	44
3.4.1. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên hình thái tinh hoàn bình thường....	44
3.4.2. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên hình thái tinh hoàn bị gây tổn thương bằng nhiệt.....	46
BÀN LUẬN	50
4.1. BÀI THUỐC NGHIÊN CỨU	50
4.2. VỀ ĐỘC TÍNH CỦA CAO ĐẶC TESTIN CT3	51
4.2.1. Độc tính cấp	51
4.2.2. Độc tính bán trường diễn	52
4.2.3. Độc tính bán trên chức năng sinh sản và phát triển.....	56
4.3. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CỦA CAO ĐẶC TESTIN LÊN HÌNH THÁI TINH HOÀN CHUỘT CỐNG TRẮNG	56
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	59
TÀI LIỆU THAM KHẢO	60

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Kết quả đánh giá độc tính cấp của cao đặc Testin CT3	37
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của Testin CT3 đối với TLCT thỏ	38
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của Testin CT3 đến chỉ số huyết học của thỏ	39
Bảng 3.4. Ảnh hưởng Testin CT3 đến chỉ số sinh hóa trong máu thỏ	40
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của Testin CT3 khả năng mang thai qua các thế hệ	42
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của Testin CT3 lên các chỉ số phôi thai	43

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cơ quan sinh dục nam	3
Hình 1.2. Cấu tạo tinh hoàn và mào tinh	5
Hình 1.3. Sơ đồ cấu trúc ống sinh tinh và mô kẽ	7
Hình 1.4. Quá trình hình thành tinh trùng	9
Hình 1.5. Các giai đoạn biệt hoá từ tinh tử thành tinh trùng	10
Hình 4.1. Trục dưới đồi – tuyến yên – tinh hoàn	13
Hình 2.1. Ảnh mô bệnh học gan thỏ thực nghiệm (HE x 200)	41
Hình 2.2. Ảnh mô bệnh học thận thỏ thực nghiệm (HE x 200)	41
Hình 2.3. Ảnh mô bệnh học lách thỏ thực nghiệm (HE x 200).....	41
Hình 3.1. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô chứng không nhiệt (HE x 40)	45
Hình 3.2. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô không nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)	45
Hình 3.3. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô không nhiệt thuốc liều 2 (HE x 40)	46
Hình 3.4. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô không nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)	46
Hình 3.5. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)	46
Hình 3.6. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 10)	47
Hình 3.7. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)	47
Hình 3.8. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 10)	47
Hình 3.9. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)	48
Hình 3.10. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)	48
Hình 3.11. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)	49
Hình 3.12. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)	49

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

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 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

- Đánh giá 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 của tinh hoàn.

5. Sản phẩm

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

- 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.

- 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*, 2018, tr.18-23.

*** Sản phẩm đào tạo:**

Hỗ trợ luận án cho nghiên cứu sinh Nguyễn Thị Phương Thảo (năm 2013), 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 06 năm 2019

Tổ chức chủ trì

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, 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.

- 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*, pp.23-27.

* **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:

- Communicate 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 [80]. 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 [1], [28], [44], [62]. Hiện nay vô sinh là tình trạng khá phổ biến và là một vấn đề lớn của các cặp vợ chồng trên toàn thế giới. Theo thống kê có khoảng 15% các cặp vợ chồng không thể thụ thai sau 1 năm quan hệ tình dục không sử dụng biện pháp tránh thai nào [58], [80]. Vô sinh là căn bệnh chung của cả nam và nữ, trong đó tỷ lệ vô sinh nam đang ngày càng tăng lên, xấp xỉ bằng với nguyên nhân gây vô sinh do nữ. Có khoảng 50% các trường hợp vô sinh nguyên nhân do chồng, trong số đó 20% nguyên nhân chỉ do người chồng và 30% còn lại do cả hai người [44], [58]. Sự sinh tinh trùng ở người bắt đầu từ lúc dậy thì ở nam giới. 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

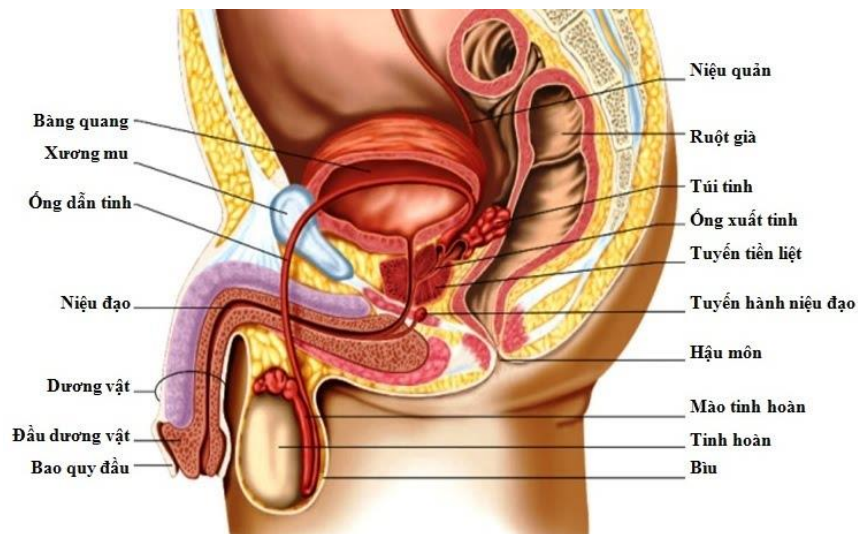
- Đánh giá tính an toàn của cao đặc Testin CT3
- Đánh giá sơ bộ ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên hình thái tinh hoàn trên thực nghiệm.

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 [1]. 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 [60].



Hình 1.1. Cơ quan sinh dục nam

* Nguồn: Frank H. Netter – 2004 [14]

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 [26], [31].

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

**** Sự phát triển của tinh hoàn***

Bắt đầu từ tuần thứ 7 của quá trình phát triển phôi, ở phôi có giới tính di truyền nam, tuyến sinh dục trung tính bắt đầu biệt hóa thành tinh hoàn. Nhờ tác động của một protein do tế bào mầm tiết ra dưới sự điều hòa của gen TDF – gen biệt hóa tinh hoàn nằm trên nhiễm sắc thể Y, những dây sinh dục nguyên phát (dây sinh dục nguyên thủy) tiến sâu vào trung tâm của tuyến sinh dục, dài ra và cong queo. Những dây ấy, lúc bấy giờ gọi là dây tinh hoàn, tách rời khỏi biểu mô khoang cơ thể phủ tuyến sinh dục. Ngay dưới biểu mô này, trung mô tạo ra một màng liên kết gọi là màng trắng ngăn cách biểu mô phủ tuyến sinh dục với các dây tinh hoàn. Sau đó biểu mô khoang cơ thể phủ tuyến sinh dục mỏng đi rồi biến mất. Màng trắng bọc hầu như toàn bộ tuyến sinh dục. Từ màng trắng phát sinh những vách xơ tiến vào trung mô bên dưới để giới hạn những tiểu thùy (khoảng 150 tiểu thùy). Vào khoảng tháng thứ 4 trong bụng mẹ, tinh hoàn không dài như trong giai đoạn phát triển trước, nó trở thành hình thoi và sau đó trở thành hình trứng, đặc và chắc [21], [63].

**** Sự phát triển của ống sinh tinh***

Trong thời kỳ bào thai, mỗi dây tinh hoàn phân thành 3 - 4 dây nhỏ hơn nằm trong một tiểu thùy. Những dây ấy vẫn đặc đến tháng thứ 6 trong bụng mẹ. Lúc bấy giờ mỗi dây nhỏ sẽ tạo thành một ống sinh tinh. Trong ống sinh tinh, một số tế bào sinh dục nguyên thủy thoái hóa rồi biến mất, không tham gia vào quá trình tạo tinh trùng. Những tế bào sinh dục nguyên thủy còn lại, do gián phân và biệt hóa, sẽ tạo ra những tinh nguyên bào. Những tế bào biểu mô nằm trong ống sinh tinh có nguồn gốc trung mô, vây quanh các tinh nguyên bào sẽ biệt hóa thành tế bào Sertoli. Đến tuổi

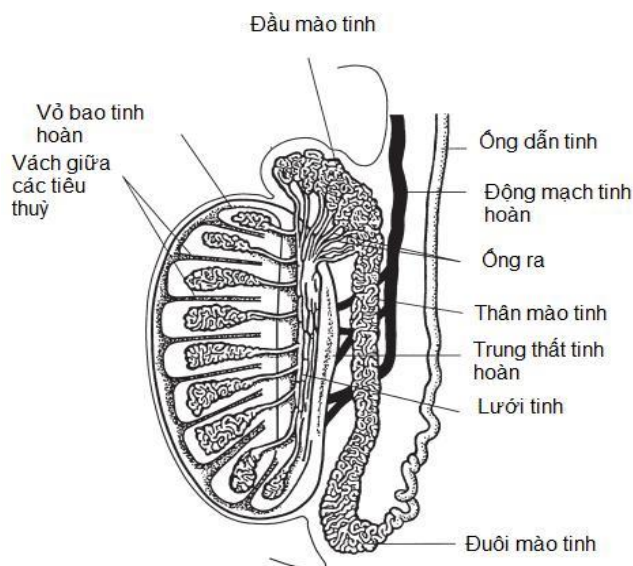
dậy thì lòng ống sinh tinh mới xuất hiện và mới có sự biệt hóa, tiến triển của các tế bào dòng tinh để tạo ra tinh trùng [21].

*** Sự phát triển của tuyến kẽ**

Từ trung mô của tinh hoàn thai, ở những nơi xen vào giữa những ống sinh tinh, phát sinh những tế bào kẽ. Những tế bào này phát triển mạnh từ tháng thứ 3 đến tháng thứ 5, sau đó số lượng giảm dần đi. Về sau tái xuất hiện cùng với mạch máu nằm trong mô liên kết xen giữa các ống sinh tinh tạo ra tuyến kẽ của tinh hoàn [21].

1.1.1.2. Cấu trúc chung của tinh hoàn

Tinh hoàn (TH) là một tuyến vừa ngoại tiết (tạo ra tinh trùng), vừa nội tiết (sản xuất testosterone) [26]. Mỗi tinh hoàn của người trưởng thành là một cơ quan có hình trứng nằm trong bìu, mặt trắng nhẵn. Có hai tinh hoàn, tinh hoàn trái thường nằm thấp hơn tinh hoàn phải khoảng 1cm. Cực trên của tinh hoàn được phủ bởi một phần của mào tinh, đoạn này lan xuống phía dưới theo bờ sau bên của tinh hoàn để tạo ra thân và đuôi của mào tinh hoàn, mào tinh hoàn tiếp nối với ống dẫn tinh. Cực dưới có dây kéo tinh hoàn cột tinh hoàn vào mô bìu [29].



Hình 1.2. Cấu tạo tinh hoàn và mào tinh [45]

Kích thước TH trung bình ở người Việt Nam trưởng thành là: dài 4cm; rộng 2,5cm; dày 2cm; nặng khoảng 20 - 30g. Thể tích trung bình 12 - 30ml [13], [26], [28].

Mỗi tinh hoàn được bọc bởi lớp liên kết màu trắng gọi là màng trắng. Màng trắng có cấu trúc như một cân. Mặt ngoài màng trắng được bao phủ bởi lá tạng của tinh mạc, mặt trong dày lên ở phía sau trên, tạo thành một vách liên kết dày gọi là thể Highmore. Các ống dẫn tinh, mạch máu và dây thần kinh đi vào hoặc đi ra khỏi tinh hoàn đều đi qua vách này. Từ thể Highmore phát triển ra những vách liên kết mỏng mang những mạch máu nhỏ và dây thần kinh tỏa vào trong, chia nhu mô tinh hoàn ra khoảng 100 - 250 tiểu thùy. Trong mỗi tiểu thùy có 1 đến 3 ống nhỏ sinh ra tinh trùng gọi là ống sinh tinh. Các ống sinh tinh ngoằn ngoèo nằm cuộn khúc chặt trong các thùy. Ở phần đỉnh thùy, sát thể Highmore, các ống sinh tinh thẳng lại để trở thành đoạn đầu tiên của đường dẫn tinh gọi là ống thẳng. Các ống sinh tinh ở cùng một tiểu thùy mở chung vào một ống thẳng. Các ống thẳng đi vào thể Highmore rồi phân chia thành một hệ thống ống dẫn nối với nhau trong thể Highmore gọi là ống lưới hay ống Haller [31].

Trong các tinh hoàn, xen kẽ với các ống sinh tinh là mô liên kết thừa, có tác dụng đệm đỡ nuôi dưỡng chúng. Ở đây có những tế bào liên kết, những sợi liên kết, những mạch máu nhỏ, những dây thần kinh vận mạch và cảm giác. Ngoài ra còn có những tế bào làm nhiệm vụ tiết hormone sinh dục nam gọi là tế bào kẽ hay tế bào Leydig. Những tế bào này nằm rải rác từng đám quanh các mao mạch tạo nên một tuyến nội tiết kiểu tản mác gọi là tuyến kẽ [31].

* Ống sinh tinh

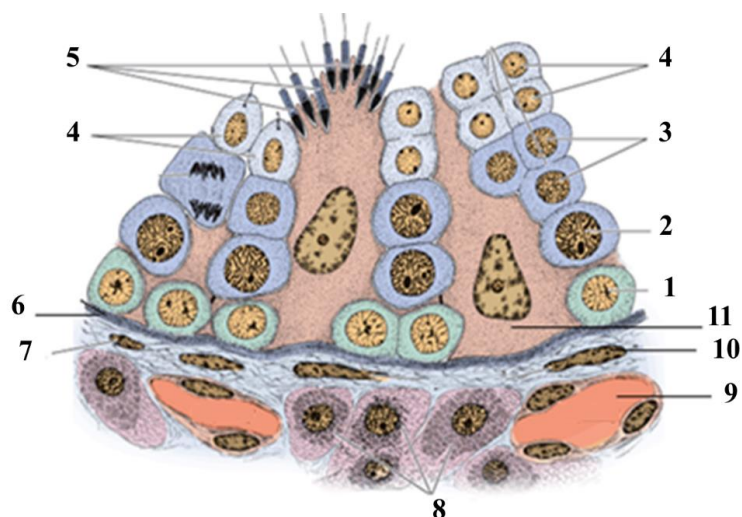
Ống sinh tinh là cấu trúc giải phẫu quan trọng, nơi diễn ra quá trình hình thành tinh trùng [15]. Ống sinh tinh là loại ống hình quai xoắn không chia nhánh, hai đầu mở vào lưới tinh. Mỗi ống sinh tinh có đường kính khoảng 150 - 250 μ m tùy theo các tác giả khác nhau và dài từ 30 - 70cm [1], [8], [67].

Ống sinh tinh gồm các thành phần sau:

- Bọc ngoài là màng đáy, ngoài màng này có bao xơ chun chính là lớp áo xơ bao phủ ống sinh tinh gồm vài lớp nguyên bào sợi, lớp ngoài cùng thể hiện đặc tính của cơ trơn. Màng đáy bao gồm mô xơ và một ít tế bào cơ, vì vậy ống sinh tinh ít có tính đàn hồi [7], [15], [31].

- Thành ống tạo nên bởi 2 loại tế bào: tế bào Sertoli và các tế bào dòng tinh, các tế bào dòng tinh xếp thành 4 - 8 lớp kể từ màng đáy cho đến lòng ống sinh tinh. Các tế bào này sẽ biệt hóa qua các giai đoạn để tạo thành tinh trùng [31].

Ở đỉnh của mỗi tiểu thùy tinh hoàn, các ống sinh tinh trở nên thẳng và hội tụ về trung thất để tạo thành một mạng lưới các ống thông nối nhau, lót bằng biểu mô dẹt. Hệ thống lưới này gọi là lưới tinh, tạo thành 12 - 20 ống xuất và chúng chui vào phần đầu mào tinh. Tại đây các ống xuất giãn rộng, uốn lượn và tạo thành những tiểu thùy dạng nón. Mỗi tiểu thùy có một ống đổ vào một ống mào tinh duy nhất, ống này dài khoảng 6m, nằm trong bao xơ của mào tinh để tạo thành phần thân và đuôi mào tinh. Khi tiến gần tới đuôi mào tinh, ống mào tinh trở nên dày và thẳng ra để tạo thành ống dẫn tinh [26].



Hình 1.3. Sơ đồ cấu trúc ống sinh tinh và mô kẽ [70]

1. Tinh nguyên bào; 2. Tinh bào 1; 3. Tinh bào 2; 4. Tiên tinh trùng
5. Tinh trùng; 6. Màng đáy; 7. Tế bào sợi; 8. Tế bào Leydig
9. Mao mạch; 10. Tế bào cơ; 11. Tế bào Sertoli

1.1.2. Quá trình sinh tinh

Quá trình sinh tinh xảy ra ở các ống sinh tinh trong suốt cuộc đời hoạt động sinh dục của người đàn ông do sự kích thích của hormon hướng sinh dục của thùy trước tuyến yên. Quá trình này bắt đầu từ lúc dậy thì và kéo dài liên tục trong quãng

đời còn lại, nhưng giảm rõ rệt trong tuổi già [60]. Mỗi ngày có thể có đến vài trăm triệu tinh tinh trùng được sinh ra [31].

Trong suốt quá trình hình thành phôi, các tế bào mầm nguyên thủy di cư vào tinh hoàn và trở thành các tế bào chưa trưởng thành, còn được gọi là tinh nguyên bào nằm thành 2-3 lớp của mặt trong ống sinh tinh. Đến tuổi dậy thì, các tinh nguyên bào bắt đầu gián phân, tăng sinh và biệt hóa liên tục để hình thành tinh trùng [33].

* **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 [1], [31]:

- Sinh tinh bào: là quá trình tinh nguyên bào phân chia, sản xuất liên tiếp các thế hệ tế bào và đến cuối cùng tạo thành tinh bào.

- Giảm phân: là quá trình tinh bào chia đôi qua 2 lần liên tục, quá trình này giảm một nửa nhiễm sắc thể và DNA trong mỗi tế bào, cuối cùng sản xuất ra tế bào tiền tinh trùng.

- Tạo tinh trùng: trong quá trình này có sự biệt hóa của tiền tinh trùng thành tinh trùng.

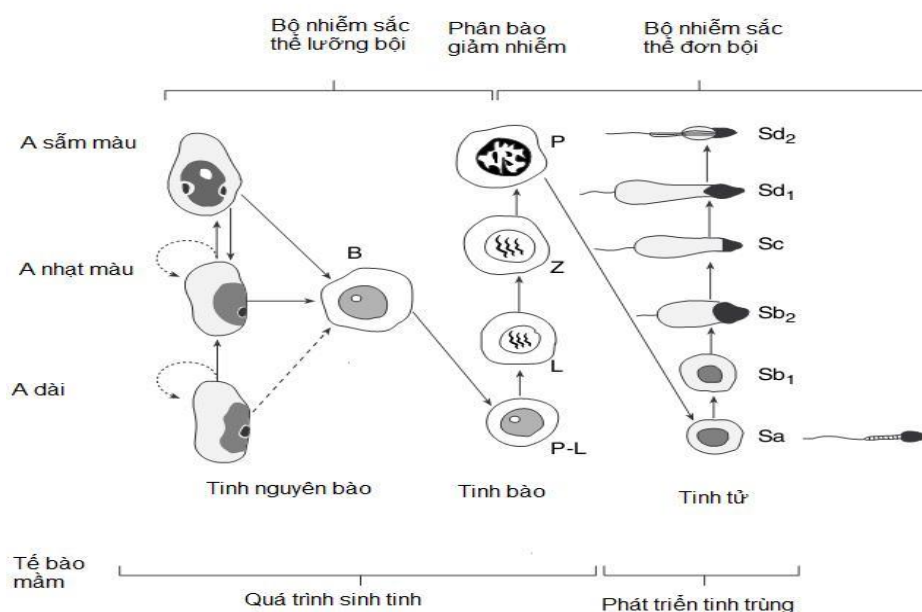
1.1.2.1. Giai đoạn tinh nguyên bào [71], [76]

Quá trình sinh tinh xảy ra trong ống sinh tinh theo hướng hướng tâm, khởi đầu từ các tế bào mầm sinh dục trong ống sinh tinh sẽ biệt hoá thành các tinh nguyên bào. Tinh nguyên bào là những tế bào nhỏ, nằm ở vùng ngoại vi biểu mô tinh, xen giữa màng đáy với tế bào Sertoli [7]. Tinh nguyên bào phân chia gián phân để tăng nhanh về số lượng. Một số tinh nguyên bào biệt hoá thành tinh bào I. Tinh nguyên bào được chia làm 3 loại dựa vào đặc điểm của nhân tế bào:

Tinh nguyên bào chùng: tinh nguyên bào loại A (sẫm màu) là những tế bào mầm nằm trong ống sinh tinh, có khả năng gián phân thường xuyên để tạo ra hai tế bào con: một tế bào có khả năng gián phân để làm nguồn dự trữ sinh tinh vô hạn, tế bào còn lại sẽ biệt hoá thành tinh nguyên bào loại A nhạt màu.

Tinh nguyên bào bụi (loại A nhạt màu): sau vài lần phân chia, tinh nguyên bào bụi biệt hoá thành tinh nguyên bào loại B.

Tinh nguyên bào vảy (loại B): loại này không có khả năng gián phân, biệt hoá thành tinh bào I có bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội $2n = 46$.



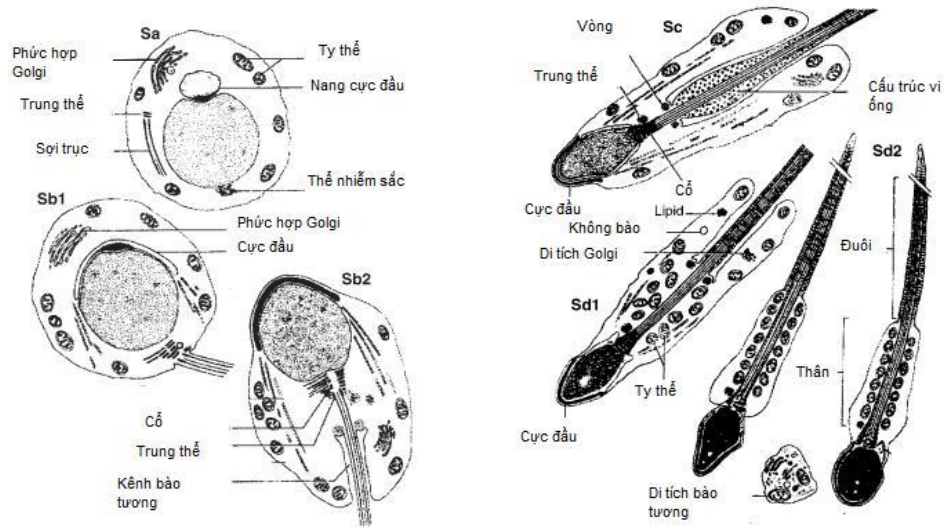
Hình 1.4. Quá trình hình thành tinh trùng [45]

1.1.2.2. Giai đoạn tinh bào I [71], [76]

Tinh nguyên bào nhóm B sau khi chui qua hàng rào máu – tinh hoàn để vào lớp tế bào Sertoli thì lớn dần lên do tích lũy được nhiều chất dinh dưỡng để tạo thành tinh bào I. Ở giai đoạn này, tinh bào I tiến hành giảm phân lần 1 tạo nên 2 tinh bào II, mỗi tinh bào II có bộ nhiễm sắc thể đơn bội $n = 23$. Các nhiễm sắc thể giới tính X và Y cũng phân ly cho hai tinh bào. Tinh bào II vừa được sinh ra sẽ tiến hành giảm phân lần 2 ngay để thành tinh tử (tiền tinh trùng). Mỗi tinh tử mang bộ nhiễm sắc thể đơn bội. Giảm phân lần 1 thường diễn ra trong khoảng 24 ngày, trong khi đó giảm phân lần 2 chỉ xảy ra trong vài giờ, do vậy trên phiến đồ cắt ngang tinh hoàn ít khi tìm thấy tinh bào II.

1.1.2.3. Giai đoạn tiền tinh trùng [71], [76]

Tiền tinh trùng hay tinh tử được sinh ra sau giảm phân có bộ nhiễm sắc thể đơn bội $n = 23$. Có hai loại tinh tử: loại mang nhiễm sắc thể X và loại mang nhiễm sắc thể Y. Tinh tử không phân chia mà trải qua quá trình biệt hoá để trở thành tinh trùng, quá trình này gồm bốn hiện tượng chính liên quan đến những biến đổi hình thái của tinh tử.



Hình 1.5. Các giai đoạn biệt hoá từ tinh tử thành tinh trùng [45]

Tạo túi cực đầu: Bộ Golgi biến đổi tạo thành túi cực đầu, các hạt giàu glycoprotein xuất hiện trong những túi của bộ Golgi. Các túi này hợp thành một túi duy nhất nằm sát với cực trên của nhân.

Tạo mũ cực đầu: đặc trưng của giai đoạn này là nhân cô đặc, dẹt ra, túi cực đầu trải rộng ôm lấy nửa cực trước của nhân tạo ra “mũ cực đầu”.

Tạo đoạn cổ và dây trục: nhờ những biến đổi của hai tiểu thể trung tâm gần và xa di chuyển về phía cực của nhân đối lập với cực có túi cực đầu.

Loại bỏ bào tương: bào tương lan dần về phía sau đuôi tinh trùng, để lại một lớp mỏng xung quanh túi cực đầu, nhân và đoạn cổ tinh trùng. Khối bào tương hơi phình lên, gọi là “giọt bào tương”.

Tinh tử trưởng thành (tinh trùng chưa trưởng thành) không còn dính với nhau mà tách ra và đi vào lòng ống sinh tinh. Các thành phần không cần thiết sẽ bị loại bỏ trong quá trình biệt hoá và được các tế bào Sertoli thực bào. Dấu hiệu để nhận biết tinh trùng chưa trưởng thành hoàn toàn là còn giọt bào tương còn bám quanh cổ tinh trùng.

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

Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh có ý nghĩa rất quan trọng trong điều trị và đặc biệt là dự phòng vô sinh nam. Cho đến nay, đã có nhiều

nghiên cứu và đã xác định được nhiều nguyên nhân trong môi trường sống, chế độ làm việc, sinh hoạt, nghề nghiệp, hóa chất... có ảnh hưởng trực tiếp hay gián tiếp đến quá trình hình thành tinh trùng. Tuy vậy đa số các trường hợp có rối loạn quá trình sinh tinh đều khó xác định các nguyên nhân. Điều này dẫn đến rất nhiều khó khăn trong quá trình điều trị [31].

1.2.1. Điều hòa nội tiết trong quá trình sinh tinh

Cũng giống nữ giới, quá trình hình thành tinh trùng ở nam được điều hòa bằng các nội tiết sinh sản trong cơ thể. Quá trình sinh tinh và sản xuất androgen của tinh hoàn được điều hòa bởi trục dưới đồi – tuyến yên – tinh hoàn [33]. Các nội tiết liên quan đến quá trình sinh tinh bao gồm GnRH, FSH, LH, testosterone, prolactin và inhibin [53], [68].

Sự sinh tinh và tổng hợp nội tiết của tinh hoàn chịu sự điều phối của vùng dưới đồi và tuyến yên. Các nội tiết tố của tuyến yên đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa hoạt động của tinh hoàn bao gồm LH, FSH và prolactin.

Vùng dưới đồi bài tiết hormon GnRH theo dạng xung có tác dụng kích thích tuyến yên tổng hợp và bài tiết ra hormon FSH và LH. Cũng giống như vùng dưới đồi, tuyến yên bài tiết hai hormon này dưới dạng xung. Tại tinh hoàn FSH gắn vào các thụ thể trên bề mặt tế bào Sertoli, kích thích sản xuất tinh trùng, ngoài ra trên tế bào Sertoli còn có các thụ thể tiếp nhận testosterone, cả FSH và testosterone đều cần thiết cho quá trình sản sinh tinh trùng [13].

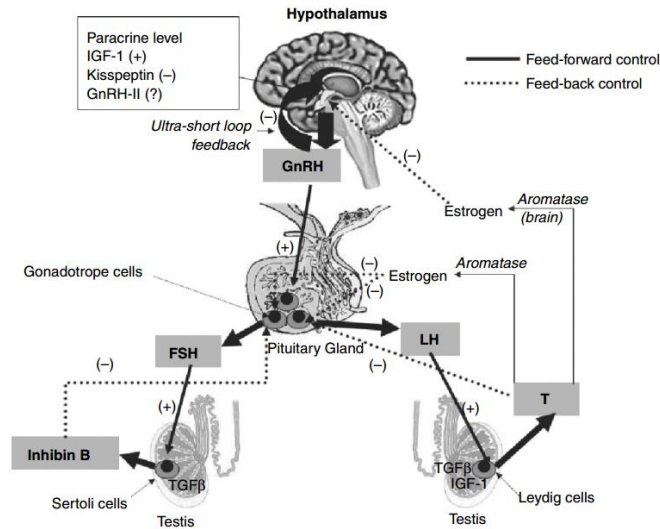
Các tế bào Leydig có tác dụng tổng hợp và bài tiết ra hormon testosterone. Ở nam giới bình thường, mỗi ngày bài tiết khoảng 6mg testosterone, trong đó khoảng 98% tồn tại dưới dạng gắn kết với SHBG và albumin, chỉ có một phần nhỏ testosterone ở dạng tự do mới có hoạt tính sinh học. Hormon LH của vùng dưới đồi kích thích các tế bào Leydig tổng hợp và bài tiết testosterone [13]. Hai nội tiết này tác động trực tiếp và chủ yếu lên tế bào Sertoli và tế bào Sertoli đóng vai trò điều phối hoạt động sinh tinh.

Testosterone tại chỗ đảm trách quá trình tạo tinh trùng. Ngoài ra, testosterone vào máu gây ra một số ảnh hưởng đến các vị trí khác trong cơ thể. Nồng độ testosterone trong lòng ống sinh tinh cao gấp 100 lần so với nồng độ của nó trong máu [33].

Testosteron chỉ có thể duy trì hoạt động sinh tinh. Để khởi phát quá trình sinh tinh, cần sự có mặt của FSH. Chức năng nội tiết của tinh hoàn chủ yếu do tế bào Leydig đảm nhiệm. Các tế bào Leydig của tinh hoàn tổng hợp hầu hết lượng androgen của cơ thể, còn lại dưới 5% được tuyến thượng thận tiết ra. Testosteron được tiết ra từ tế bào Leydig có thể đi vào máu và bạch mạch đến các cơ quan trong cơ thể hoặc đi vào ống sinh tinh. Để đạt được nồng độ cao trong biểu mô ống sinh tinh, testosteron gắn với protein gắn kết androgen (ABP) và được vận chuyển chủ động vào biểu mô ống sinh tinh [19].

Sự phóng thích LH của tuyến yên chịu sự chi phối của nồng độ testosteron trong máu theo cơ chế phản hồi. Nồng độ testosteron trong máu cao sẽ ức chế hạ đồi và tuyến yên làm giảm tiết LH, dẫn tới tế bào Leydig giảm tiết testosteron. Ngược lại nếu nồng độ testosteron trong máu thấp sẽ kích thích vùng dưới đồi và tuyến yên gây tăng tiết LH, kích thích tế bào Leydig tăng tổng hợp testosteron. Tế bào Sertoli còn tiết một số chất đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa chức năng sinh sản như: protein gắn kết adrogen (ABP), inhibin. Inhibin có vai trò điều hòa nồng độ FSH và điều hòa một số lượng tế bào tham gia quá trình sinh tinh, khi đếm thấy tinh trùng cao thì inhibin được tiết ra và nó ức chế tuyến yên tiết FSH và vùng dưới đồi tiết GnRH. Khi mật độ tinh trùng < 20 triệu/ml thì sự tiết inhibin sẽ giảm.

Như vậy nồng độ testosteron và số lượng tinh trùng được sản xuất ra bởi tinh hoàn phản ánh sự cân bằng giữa ba bộ hormon gồm: hormon hướng sinh dục kích thích trực tiếp lên tinh hoàn tiết testosteron, GnRH kích thích gián tiếp tinh hoàn thông qua tác động lên tuyến yên tiết FSH và LH, các hormon tinh hoàn như testosteron và inhibin tác động hồi âm lên vùng dưới đồi và tuyến yên [82], [81].



Hình 4.1. Trục dưới đồi – tuyến yên – tinh hoàn [69]

1.2.2. Yếu tố di truyền

Một số gen nằm trên đoạn dài của NST Y qui định quá trình sinh tinh [61]. Các rối loạn NST có thể gặp trong hội chứng Klinefelter. Hội chứng Klinefelter là một bất thường do đột biến hay gặp với tỷ lệ khoảng 1/600 trường hợp thai bình thường và 1/300 trường hợp sảy thai và cũng rất hay gặp trên các bệnh nhân vô sinh không có tinh trùng. Khoảng 80% bệnh nhân mang bộ nhiễm sắc thể 47XXY và 20% thể khảm 47XXY/46XY. Hay hội chứng Kallmann: hội chứng biểu hiện mất khứu giác và suy sinh dục do suy hạ đồi. Bệnh do gen lặn nằm trên NST X, gen này nằm trên nhánh ngắn của X và có tên là KAL, nếu bị đột biến, làm mất gen này gây nên hội chứng Kallmann.

1.2.3. Nhiệt độ

Ở người nhiệt độ tại tinh hoàn thường thấp hơn nhiệt độ của cơ thể khoảng 2⁰C. Nhiệt độ cao gây chết tinh trùng, không thích hợp cho quá trình sinh tinh. Tinh trùng được sinh ra ở nơi có nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ cơ thể. Cơ Dartos của bìu co giãn tùy thuộc vào nhiệt độ môi trường nhằm đảm bảo nhiệt độ tối thuận lợi cho sự sản sinh tinh trùng. Tác động của nhiệt độ có thể từ bên ngoài như môi trường làm việc, nơi ở quá nóng, tắm nước nóng, xông hơi nhiều hoặc bệnh trong cơ thể như bệnh tăng chuyển hóa, tinh hoàn ẩn... có thể ảnh hưởng tới chức năng sinh sản ở nam giới. Thí nghiệm với động vật sống ở nhiệt độ 38,5⁰C trong 55 phút mỗi ngày có thể dẫn tới giảm khả năng sinh sản. Nhiệt độ cao dẫn tới việc ức chế

sản xuất tinh trùng. Các nghiên cứu đã cho thấy nghề nghiệp hoặc môi trường có tiếp xúc với nhiệt độ cao ảnh hưởng tới sự sinh tinh [66].

Tinh hoàn ẩn là bệnh lý tinh hoàn không xuống bìu do bất thường trong quá trình phát triển của thai nhi. Kết quả là tinh hoàn nằm trong ổ bụng hoặc trong các vị trí bất thường khác, có thể 1 bên hoặc 2 bên. Chính vì nằm ở vị trí bất thường, nhiệt độ tăng cao mà quá trình sinh tinh bị suy giảm, tăng nguy cơ gây ung thư tinh hoàn.

Sốt trên 38⁰C có thể ức chế quá trình sinh tinh trong thời gian 6 tháng. Ngoài tác dụng ức chế quá trình sinh tinh, nhiệt độ cao có thể gây tổn thương AND của tinh trùng. Thonneau (1998) cho rằng: các tài xế lái xe đường dài, có điều kiện làm việc như tư thế ngồi lâu đã khiến nhiệt độ bìu tăng lên, dẫn đến giảm quá trình sinh tinh, thậm chí vô sinh.

Một nghiên cứu tinh dịch trên 400 bệnh nhân đã nhận thấy các lái xe đường dài có tỷ lệ bất thường về di động của tinh trùng cao nhất so với nhóm nguy cơ khác. Các tác giả cũng nhận thấy chất lượng tinh trùng giảm ở nhóm bệnh nhân làm việc trong môi trường nóng như đầu bếp, thợ hàn, luyện kim.

1.2.4. Giảm tinh mạch thừng tinh

Bệnh này thường kèm theo suy giảm quá trình sinh tinh theo cơ chế do tăng lượng máu đến tinh hoàn, từ đó làm tăng nhiệt độ tinh hoàn và dẫn đến suy giảm quá trình sinh tinh.

1.2.5. Cấu trúc và chức năng các thụ cảm thể biến đổi

- Do các receptor của androgen bất thường. Bệnh biểu hiện ở nhiều mức độ, nhẹ thì biểu hiện bởi vô sinh đơn thuần, nặng thì kết hợp với các triệu chứng như lỗ tiểu lệch thấp, tinh hoàn ẩn, không tiết dịch tiền liệt tuyến.

- Tổn thương gen qui định cấu trúc thụ cảm thể FSH: từ đó làm cho các thụ cảm thể FSH bị tổn thương và không hoạt động. Biểu hiện của bệnh đó là số lượng tinh trùng không có hoặc có rất ít, nồng độ FSH cao.

1.2.6. Nhiễm trùng [31]

Các bệnh viêm tinh hoàn do virus đặc biệt là bệnh quai bị đã được biết đến từ lâu như là một nguyên nhân gây vô sinh nam. Các bệnh này gây tổn thương các tế bào dòng tinh. Biểu mô ống sinh tinh có thể bị hủy hoại hoàn toàn do tác động trực

tiếp của nhiễm trùng, cụ thể là hiện tượng viêm, tăng nhiệt độ tại chỗ và do các phản ứng miễn dịch sau khi hàng rào máu – tinh hoàn bị phá hủy.

Ngoài ra một số tác nhân gây viêm khác có thể gây viêm tinh hoàn và làm tắc mào tinh như lao, hủi, các bệnh lây truyền qua đường tình dục như lậu, Chlamydia.

1.2.7. Các thuốc [31]

Nhiều loại thuốc có thể làm tổn thương quá trình sinh tinh hay tế bào Leydig hoặc cả 2 như: các thuốc alkyl hóa (cyclophosphamid), các thuốc kháng androgen. Một số thuốc khác như suramin, một thuốc điều trị ký sinh trùng, thuốc có thể làm cho tế bào Leydig không có khả năng tổng hợp testosterone. Ketoconazol cũng có tác dụng tương tự suramin. Glucocorticoid khi được sử dụng sẽ làm giảm nồng độ testosterone trong máu, đến nay vẫn chưa rõ cơ chế.

- Các thuốc điều trị ung thư đều ức chế mạnh quá trình sinh tinh. Hầu hết các phác đồ hóa chất điều trị ung thư đều ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh và gây tình trạng vô sinh tạm thời, trong số đó có 80% có thể phục hồi sau 5 năm. Cơ chế gây tổn thương bao gồm: tổn thương tế bào dòng tinh, rối loạn chức năng tế bào Sertoli, rối loạn tổng hợp nội tiết tố, đồng thời làm tổn thương nhiễm sắc thể ở tinh trùng, những tổn thương này có thể di truyền cho con cái.

- Cimetidin là loại thuốc ức chế thụ cảm thể H_2 , dùng để điều trị loét dạ dày - tá tràng. Đây cũng là thuốc có tác dụng ức chế androgen bằng cách cạnh tranh các thụ cảm thể của androgen. Vì vậy, chúng có tác dụng bất lợi cho quá trình sinh tinh.

- Các chất ức chế phân bào như colchicin cũng có tác dụng phụ làm giảm số lượng và chất lượng tinh trùng.

1.2.8. Hóa chất [31]

- Nhiễm độc một số kim loại nặng như chì, thủy ngân có thể gây giảm sinh tinh và gây vô sinh. Một số hợp chất khác cũng gây tác dụng xấu cho quá trình sinh tinh, ví dụ: dibromodichloropropan là một chất tác động mạnh mẽ đến quá trình sinh tinh, gây không có tinh trùng ở nam giới và chất này đã bị cấm sử dụng ở nhiều nơi trên thế giới.

- Các kim loại nặng như Cd có tác dụng gây tổn hại đến cơ quan sinh sản. Nghiên cứu đã cho thấy tác động của Cd đến tinh hoàn chuột: biến dạng các tinh tử, các cực đầu của tinh tử hình thành ở các vị trí không bình thường.

- Muối lithium có tác dụng làm màng đáy dày lên và gấp nếp, xuất hiện các khoảng trống giữa các tế bào dòng tinh.

- Các thuốc trừ sâu như DBCP, chordecoc, ethylen dibromid, chất diệt cỏ cũng gây ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh. Đặc biệt doxin cũng được coi là một tác nhân tác động lên quá trình sinh tinh gây vô sinh.

- Một số dung môi hữu cơ được ghi nhận có ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh như: glyco ethers, carbon disulphid...

Ngày nay người ta đã biết được một số thuốc và hóa chất có ảnh hưởng đến sự phát triển tinh trùng ở mào tinh như: tritolid, chlorhydrin.

1.2.9. Dinh dưỡng

- Có rất nhiều chất có tác dụng tốt với quá trình sinh tinh như: carnitin, arginin, zinc, selenium, vitamin B₁₂, vitamin C, vitamin E, glutathion và coenzym Q10. Chế độ ăn thiếu 1 trong các chất như: vitamin A, E, một số acid béo, acid amin, kẽm có thể gây ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh do ảnh hưởng trực tiếp lên tuyến yên và gián tiếp lên tinh hoàn. Một số tác giả cũng ghi nhận ăn rau răm có ảnh hưởng đến cấu trúc tinh hoàn.

- Hiện nay có nhiều quan điểm cho rằng các thức ăn hiện đại thường có chứa nhiều gốc hóa học có tính estrogen yếu, nếu tích tụ lâu ngày có thể ức chế sinh tinh.

- Hút thuốc có ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh. Trong một nghiên cứu trên 1770 tân binh, các tác giả nhận thấy hút thuốc lá có ảnh hưởng đến chất lượng tinh trùng. Ahmadnia và Cs (2007) nghiên cứu trên chuột và nhận thấy thuốc lá ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh.

- El – Sokkary và Cs (2001) nghiên cứu tác động của rượu trên tinh hoàn nhận thấy đường kính ống sinh tinh, số lượng tế bào Leydig giảm.

1.2.10. Môi trường

- Yếu tố phóng xạ có tác động rất lớn đến quá trình sinh tinh. Tinh nguyên bào giai đoạn phân chia rất nhạy cảm với phóng xạ, tinh tử và tinh trùng ít bị ảnh hưởng

hơn. Tuy nhiên khi tiếp xúc với phóng xạ liều cao, tất cả các tế bào dòng tinh đều bị ảnh hưởng và có thể dẫn đến vô sinh không hồi phục. Nói chung cường độ phóng xạ càng cao thì thời gian hồi phục càng lâu, có thể nhiều năm hoặc không hồi phục. Ngoài ra nếu quá trình sinh tinh có hồi phục thì phóng xạ lại có thể gây tổn thương nhiễm sắc thể và gây bất thường nhiễm sắc thể ở thế hệ sau. Do đó ở bệnh nhân xạ trị ung thư, người ta có thể trữ lạnh tinh trùng trước khi xạ trị để duy trì khả năng sinh sản của bệnh nhân.

- Từ trường với tần số thấp và cường độ cao có thể gây tổn thương đến quá trình sinh tinh. Các nghiên cứu gần đây cho rằng từ trường điện thoại di động với tần số cao và cường độ trung bình có thể ảnh hưởng gián tiếp đến quá trình sinh tinh do tác động lên tuyến yên.

1.2.11. Các bệnh toàn thân

Các bệnh toàn thân ít nhiều đều ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh, nhưng nhiều khi lại không được chú ý. Các tình trạng bệnh lý cấp tính như bỏng, nhồi máu cơ tim, chấn thương, sau phẫu thuật đều ức chế chức năng của tinh hoàn.

1.2.12. Các nguyên nhân khác

Chấn thương TH cũng có thể gây tổn thương nặng nề đến cả ống sinh tinh và tuyến kẽ. Tinh hoàn bị xoắn vặn làm ngưng trệ đột ngột đến sự cấp máu cho tinh hoàn, nếu không phẫu thuật kịp thời có thể bị hoại tử.

Tóm lại quá trình sản sinh tinh trùng diễn ra rất phức tạp và chịu nhiều tác động khác nhau của các yếu tố trong và ngoài cơ thể. Sự bất thường về tuyến nội tiết, đặc biệt là vùng dưới đồi – tuyến yên sẽ ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh tinh. Các bất thường về di truyền NST thường và NST giới tính sẽ dẫn đến bất thường khả năng sinh tinh. Ngoài ra các bệnh lý tinh hoàn ẩn, giãn tĩnh mạch thừng tinh, bất thường cấu trúc thụ cảm thể, nhiễm trùng, các thuốc, hóa chất và ngay cả môi trường sống, chế độ sinh hoạt, tình trạng sức khỏe cũng ít nhiều ảnh hưởng đến khả năng sinh tinh. Nắm được quá trình sinh tinh và các yếu tố ảnh hưởng có ý nghĩa quan trọng trong khám, tư vấn, điều trị và đặc biệt là dự phòng trong lĩnh vực vô sinh nam.

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

1.3.1. Nguyên nhân

❖ *Thận tinh suy tổn*

Do phú bẩm thiên bẩm bất túc, buông thả tình dục làm cạn kiệt tinh khí. Linh Khu viết: “nhập phòng quá độ thì hại thận”. Vì tinh sinh ra ở huyết, không những tình dục làm tổn tinh, mà tất cả những việc làm tổn huyết hàng ngày đều làm tổn tinh: mắt nhọc vì trông, tinh do trông bị hao, tai nhọc vì nghe, tinh do nghe bị hao, tâm nhọc vì nghĩ, tinh do nghĩ bị hao, thân thể nhọc vì dùng sức, tinh do sức bị hao. Như vậy, phải tùy từng việc mà dè dặt thì huyết được nuôi dưỡng, tinh sẽ đầy đủ [27], [42].

Hoặc tổn thương do thất tình, sợ hãi làm hại thận, tinh khí thiếu hụt. Vì thận chủ việc bế tàng (cất giấu), can chủ việc sơ tiết (thông tiết ra), hai tạng này đều có tướng hỏa mà hệ của nó đều gắn lên tâm. Tâm là quân hỏa, giận làm tổn thương can thì tướng hỏa động, động thì can làm việc, sơ tiết mà bỏ mất chức năng bế tàng, tuy không giao hợp mà tinh cũng chảy hao ngầm, do vậy mà làm tổn tinh. Trong năm tạng đều có tướng hỏa, chỉ có loại tướng hỏa ký ở can, hễ lúc hiền lạnh thì nó đưa ra để nuôi sống, nhưng lúc giận dữ thì nó lại gây hại hơn các loại hỏa tạng khác, do đó cần phải nén giận [27].

Thận tàng tinh chủ về sinh dục, thận tinh hư suy gây liệt dương, tinh dịch ít, số lượng tinh trùng ít, không thụ thai [27].

❖ *Thận dương hư*

Nguyên dương bất túc, thiên quý suy ở người già, ốm lâu ngày, và tất cả các nguyên nhân gây thận tinh suy tổn ở trên làm thận dương hư. Thận dương mất chức năng khí hóa, không còn tác dụng sưởi ấm, làm tinh khí hư lạnh, dần dần thận khí hư làm thận dương hư không ôn dưỡng tinh khí, công năng sinh tinh kém [27], [42].

Thận chủ chứa tinh, nguyên dương bất túc, tinh khí không bền nên có chứng dương nuy, hoạt tinh, tinh lạnh, sức hoạt động của tinh trùng thấp, số lượng ít [27], [24].

Thận chủ tướng hỏa, tâm chủ quân hỏa, khi quân hỏa yên, tướng hỏa lặng thì tinh và huyết mới được sinh ra. Vì tâm tàng thần, thần dựa vào huyết, huyết thì sợ hỏa. Nếu tình dục nổi lên mà tâm hỏa động, thận hỏa cũng hòa theo mà động thì huyết bốc sôi, làm nguyên thần hao tán không thể xuống giao với thận, thận thủy hư hàn, tinh do đó mà tiết bậy ra. Tình dục phóng túng thì hại đến tinh, lao tâm thì tổn đến

thần. Thận tinh tiết bừa bãi là do tâm hỏa bức bách mà sinh ra, tâm hỏa bốc lên cũng do thận thủy thiếu mà không chế lại được [27].

❖ *Tỳ hư tinh tổn*

Do suy nghĩ quá độ; lao động quá sức dẫn đến mệt mỏi làm tổn thương tâm tỳ; ăn uống thiếu thốn; hoặc do bệnh lâu cơ thể suy nhược mệt mỏi quá làm tổn thương tỳ; hoặc do thận dương không đủ không ôn ấm được tỳ dương làm không vận hoá được thủy cốc, hậu thiên mất điều hoà, tinh chất thức ăn không thể hoá sinh khí huyết làm thận tinh suy yếu [17], [22], [27].

Ăn uống không điều độ, đói no thất thường làm tổn hại khí của tỳ vị, làm không sinh hóa được chất tinh vi, không sinh trưởng được khí huyết, cội nguồn khí huyết bất túc [22].

“Vị mạnh thì thần đầy đủ mà tinh khí vượng, vị bại thì tinh tổn thương mà dương sự suy yếu” [27].

Do tinh hậu thiên do tỳ khí sinh ra, có nhiệm vụ nuôi dưỡng tinh tiên thiên và tinh của ngũ tạng, tỳ khí hư làm tinh ngũ tạng hư yếu không tàng nạp về thận, thận tinh hư yếu, nên có thể suy ra sinh tinh giảm, số lượng tinh trùng giảm, sức hoạt động tinh trùng kém.

❖ *Can khí uất kết, khí trệ huyết ứ (can khí hoành nghịch)*

Do tình chí không thư sướng, uất giận làm mất đi sự sơ tiết dẫn đến khí cơ uất trệ, mộc không điều đạt mà gây bệnh [30].

Khi can tạng sơ tiết thái quá, can khí hoành nghịch, xâm lấn tỳ thổ (can mạnh, tỳ yếu) và quấy rối thận mà gây nên [30].

Do khí của tạng can bị uất mà không được thoải mái và phát tiết, vì thế kết tụ và ứ trệ ở trong cơ thể làm khí trệ, huyết ứ.

Mộc khắc thổ, khắc là quan hệ ức chế bình thường, tức là sự vận hóa của tỳ thổ cần phải nhờ vào công năng sơ tiết điều đạt của can mộc mới hoàn thành, như sách Huyết chứng luận nói: “tính của mộc chủ về sơ tiết, đồ ăn vào vị phải nhờ vào khí của can mộc để sơ tiết thì thủy cốc mới biến hóa được”. Can khí uất kết mất khả năng sơ tiết điều đạt bình thường, không hỗ trợ cho công năng của tỳ thổ, làm đầy bụng, chậm tiêu, biếng ăn. Vì vậy, tinh hoa của ngũ cốc không chuyển thành tinh hậu thiên

để nuôi dưỡng tinh thiên thiên, thận tinh hư tổn, có thể suy ra trong tinh dịch số lượng tinh trùng ít, tinh trùng dị dạng nhiều, sức sống của tinh trùng thấp [27]. [30].

Theo Hải Thượng Lãn Ông: vì thận chủ việc bế tàng (cất giấu), can chủ việc sơ tiết (thông tiết), hai tạng này đều có tương hỏa, giận làm tổn thương can, mà tương hỏa động, động thì can sơ tiết mà thận bỏ mất chức năng bế tàng, tuy không giao hợp mà tinh cũng chảy hao ngầm. Do vậy mà làm tổn tinh [27].

Trong quá trình bệnh biến của chứng can khí uất kết, vì khí là soái của huyết, huyết là mẹ của khí, khí uất thì huyết trệ, nên khí huyết trong kinh can vùng quanh tinh hoàn ứ trệ dẫn đến tinh hoàn nhói đau, nơi đau cố định. Can khí uất trệ thì mộc thịnh khắc thổ quá mạnh (can mộc xâm lấn tỳ thổ), tỳ vị bị tổn thương, vận hóa thất thường mà thành thực trệ, biểu hiện ăn uống không tiêu, bụng đầy, nôn mửa, ợ hơi, đau bụng ỉa chảy. Can khí hoành nghịch thì quấy rối thận, làm tinh quan không bền, dẫn đến di tinh, tiết tinh, di niệu. Vì vậy, tinh hậu thiên không đầy đủ, tinh thiên thiên bị tổn thương sẽ dẫn đến SGTT [30].

❖ *Thấp nhiệt hạ tiêu*

Do ăn uống không điều độ, uống rượu nhiều, nhiễm phải tà khí thấp nhiệt uế trọc [9], [16], [32], [42].

Hạ tiêu thấp nhiệt: do hạ tiêu nhiễm phải tà khí thấp nhiệt uế trọc, thấp nhiệt nung nấu, câu kết ở bàng quang hoặc thận chuyển nhiệt xuống bàng quang làm chảy mũ dương vật, đái đục, đái rắt, đái buốt.

Can kinh thấp nhiệt, can đờm thấp nhiệt: thấp nhiệt xâm phạm can kinh ở vùng bộ phận sinh dục gây tức nặng, tinh hoàn sưng [9], [16].

❖ *Do chế độ ăn uống, sinh hoạt*

Uống rượu nhiều: huyết trong mình chỗ nào về chỗ nấy thì tinh mới ngưng đọng được, rượu làm động huyết (uống rượu thì mặt đỏ, chân tay đỏ... đó là làm quấy rối huyết). Người mà khí huyết đã suy, thận tinh không đầy đủ, khi uống rượu lại làm tinh không ngưng đọng được [27];

Sách Nội kinh nói “tinh không đủ thì bỏ bằng vị của thức ăn”, nhưng vị nồng gắt không thể sinh tinh được, chỉ có vị ngọt nhạt mới có thể bổ tinh. Thiên Hồng Phạm bàn về vị ăn có nói “cây cây thành vị ngọt, các sản vật trên thế gian chỉ có ngũ

cốc là vị chính yếu, nếu có thể ăn nhàn ngũ cốc thì rất hay sinh tinh, cho nên cần phải chú ý đến vị của thức ăn [27].

1.3.2. Điều trị

1.3.2.1. *Thận âm hư*

❖ *Pháp điều trị:* Bổ ích tinh tủy, tư bổ thận âm.

❖ *Phương dược*

- Bài thuốc 1: Tả quy hoàn gia giảm: thực địa 8 g, hoài sơn 4 g, lộc giác giao 4g, quy bản 4g, sơn thù 4g, thỏ ty tử 4g, câu kỷ tử 4g, ngư tử 3g [43].

Giải phương: lộc giác giao, quy bản bổ tinh ích tủy là quân dược; thực địa, sơn dược, sơn thù, câu kỷ tử bổ can thận âm; ngư tử bổ can thận, cường gân cốt.

Cả bài có tác dụng *bổ ích tinh tủy, tư bổ thận âm*.

Gia giảm: miệng khô gia mạch môn, đại tiện táo gia nhục dung.

- Bài thuốc 2: Ngũ tử diễm tông hoàn hợp lục vị hoàn gia giảm: thực địa 5g, câu kỷ tử 25g, thỏ ty tử 75g, phúc bồn tử, ba kích, sơn dược, sơn thù 50g, ngũ vị tử, tiên mao, xa tiền tử 20g. Làm hoàn mỗi lần uống 9g.

Giải phương: thực địa, câu kỷ tử, thỏ ty tử để tư âm bổ huyết ích tinh; phúc bồn tử, ngũ vị tử, bổ thận sáp tinh; ba kích, tiên mao ôn bổ thận dương; sơn dược kiện tỳ cố thận ích tinh; xa tiền tử ích tinh thông lợi. Các vị thuốc tương hợp có tác dụng *bổ tinh ích tủy, cố thận khí* mà có thể có con [43].

1.3.2.2. *Thận dương hư*

❖ *Pháp điều trị:* ôn thận tráng dương, cố tinh ích khí.

❖ *Phương dược*

- Bài thuốc 1: “Kim quỹ thận khí hoàn” hợp “Ngũ tử diễm tông” gia giảm [43].

Giải phương: nhục dung, tiên mao, dâm dương hoắc, phụ tử chế, nhục quế: bổ thận tráng dương; thực địa, thỏ ty tử, câu kỷ tử: tư âm bổ thận, ích tinh; sơn dược: kiện tỳ cố tinh; ngũ vị tử, phúc bồn tử: bổ thận cố tinh.

Gia giảm: Tùy theo triệu chứng và tính chất của tinh dịch mà gia giảm.

- Bài thuốc 2: Hữu quy âm: thực địa 16g, hoài sơn 12g, sơn thù 8g, đỗ trọng 12g, câu kỷ tử 12g, cam thảo 8g, phụ tử chế 10g, nhục quế 10 g.

Giải phương: thực địa, sơn dược, thù nhục, câu kỷ tử bổ thận âm. Nhục quế, phụ tử chế ôn dưỡng thận dương. Đỗ trọng cường tráng ích tinh, cam thảo bổ trung ích khí và điều hòa các vị thuốc. Phương này bổ hỏa tận gốc, để bồi thận nguyên dương, cố tinh ích khí [43].

Gia giảm: hàn thịnh thì gia ba kích; chân tay mềm yếu gia tang ký sinh, tục đoạn.

- Bài thuốc 3: Sinh tinh thang: thực địa, hoài sơn, đan bì, trạch tả, câu kỷ tử, cam thảo, phụ tử chế, bạch thược, sài hồ, đương quy, bạch truật, nhân sâm, bạch linh. Có tác dụng: *bổ thận, kiện tỳ, hòa can* [36].

1.3.2.3. Tỳ hư tinh tổn

❖ Pháp điều trị: ích khí, kiện tỳ, dưỡng huyết sinh tinh.

❖ *Phương dược*

- Bài thuốc 1: Quy tỳ thang gia giảm (*Tễ sinh phương*): bạch truật 10, phục thần 10, hoàng kỳ 15, long nhãn 5, táo nhân 10g, nhân sâm 10g, mộc hương 5g, đương quy 10g, cam thảo 4g, lộc giác giao 5g [43].

Giải phương: nhân sâm, bạch truật, hoàng kỳ, cam thảo: cam ôn bổ tỳ, ích khí; phục thần, táo nhân, viễn trí, long nhãn, đương quy cam ôn, chua đắng để dưỡng huyết hòa doanh, bổ tâm, an thần; mộc hương lý khí tỉnh tỳ, khiến bổ mà không trệ. Đây là phương thuốc trọng dụng dưỡng tâm, kiện tỳ là thuốc ích khí dưỡng huyết, khí vượng huyết sinh.

- Bài thuốc 2: “Bát chân sinh tinh thang” gia giảm.

Giải phương: Đảng sâm, bạch truật, phục linh, hoàng kỳ, cam thảo, thực địa, A giao: bổ khí huyết; thỏ ty tử, câu kỷ tử, hoàng tinh: bổ thận sinh tinh.

- Bài thuốc 3: Sinh tinh thang [36].

1.3.2.4. Can khí uất kết, khí trệ huyết ứ

❖ *Pháp điều trị*: sơ can, giải uất, kiện tỳ hòa doanh.

Hoạt huyết hóa ứ thông tinh.

❖ *Phương dược*

- Bài thuốc 1: Hắc tiêu dao tán (Hòa tễ cục phương) hợp Huyết phủ trục ứ thang (Y lâm cải thác) gia giảm: sài hồ 10g, đương quy 10g, bạch thược 10g, bạch truật

10g, phục linh 10g, cam thảo 5g, sinh khương 3 lát, bạc hà 2g, đào nhân 8g, hồng hoa 6g, xuyên khung 3g, ngư tât 6, chỉ xác 6g [43].

Giải phương: đương quy, bạch thược, thực địa: dưỡng huyết nhu can, sài hồ sơ can giải uất, một chút bạc hà để tăng cường sơ tán. Bạch thược, cam thảo để bồi thổ, khương, quy, thược kết hợp lại là để điều hòa khí huyết. Đào nhân, hồng hoa, xuyên khung, ngư tât, chỉ xác có tác dụng hoạt huyết tiêu ứ.

- Bài thuốc 2: sài hồ, chỉ xác, bạch thược, sinh cam thảo, ô dược, xuyên luyện tử 10g, đan sâm, sinh ý dĩ nhân, tiên linh tỳ, sinh hoàng kỳ 30g, tiên mao, câu kỷ tử 15g. Sắc uống ngày 1 thang.

1.3.2.5. *Thấp nhiệt hạ tiêu*

❖ Phương pháp điều trị: thanh nhiệt, lợi thấp, giải độc.

❖ *Phương dược*

- Bài thuốc 1: Tỳ giải phân thanh ẩm gia giảm (Đan khô tâm pháp): tỳ giải, ý dĩ nhân 15g, thổ phục linh, xa tiền tử, sơn dược 12g, bạch truật 10g, ngư tât, nhục thung dung 8g [43].

Giải phương: ý dĩ nhân, tỳ giải, thổ phục linh, xa tiền tử thanh nhiệt lợi thấp giải độc, dẫn tà qua đường tiểu tiện mà giải; sơn dược, bạch truật kiện tỳ vận thấp; ngư tât, nhục thung dung bổ can thận ích thận tinh.

Gia giảm: thấp nhiệt thịnh gia: hoàng bá, chi tử 10g thanh lợi hạ tiêu. Có ứ trệ gia: đào nhân, hồng hoa 10g để hoạt huyết hóa ứ.

- Bài thuốc 2: Long đởm tả can thang, gia giảm (Y tôn kim giám): long đởm thảo sao rượu 8g, hoàng cầm 8g, chi tử 8g, sa tiền tử 4g, trạch tả 8g, sinh địa 8, đương quy 6g, sài hồ 8g, cam thảo 2g [43].

Giải phương: long đởm rất đắng, rất hàn tả can đởm thực hỏa, trị hạ tiêu thấp nhiệt là quân dược. Sa tiền tử, trạch tả: thanh nhiệt lợi thấp. Hỏa thịnh ức hiếp âm dịch dùng sinh địa, đương quy tư dưỡng can huyết, khiến đuổi được tà mà không hại đến chính khí. Sài hồ điều đạt can khí, cam thảo lợi trung giải độc và điều hòa các vị thuốc. Cả phương có tác dụng *tả can kinh thấp nhiệt*.

Gia giảm: Tùy theo hoạt động tình dục và tinh dịch đồ mà gia vị.

Trong tinh dịch có nhiều bạch cầu gia: thổ phục linh, bồ công anh, kim ngân hoa; Tinh trùng ít hoạt động: sơn tra, đan sâm để lợi thấp hóa trọc;

Huyết tinh gia: đại tiểu kế, hạ liên thảo, bạch mao căn.

1.3.2.6. Chế độ ăn uống luyện tập

Ngoài việc uống thuốc, còn có kết hợp châm cứu, khí công dưỡng sinh, giữ cho tinh thần thoải mái và chế độ ăn uống. Phải tổng hợp nhiều phương pháp mới mong đạt được hiệu quả cao trong điều trị.

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

- Xuất xứ của bài thuốc: Bài thuốc do PGS. TS Vũ Văn Điền – Trường Đại học Dược Hà Nội thiết kế

1.4.2. Thông tin về các vị thuốc của bài thuốc

1.4.2.1. Bá bệnh

- Tên khoa học: *Herba et Radix Eurycomae*
- Tên khác: Bách bệnh, Lòng bệt, Sâm alipas, Mật nhân...

* Tác dụng dược lý

- Tác dụng làm tăng cường chức năng sinh dục nam: Các nghiên cứu về tác dụng của rễ Bá bệnh lên chức năng sinh dục nam chủ yếu tập trung vào các phân đoạn nước, methanol, butanol và chloroform [46], [47], [86].

+ Chiết xuất rễ Bá bệnh dùng đường uống liều lặp lại 500mg/kg trên chuột cống đực già chậm chạp tình dục có tác dụng kích thích hành vi giao cấu biểu hiện ở sự tăng cả hành vi xâm nhập và xuất tinh [48].

+ Chiết xuất rễ Bá bệnh phân đoạn butanol, methanol, nước, chloroform dùng uống với liều 200, 400 và 800mg/kg cho thấy tác dụng tuyến tính phụ thuộc liều và tăng có ý nghĩa thống kê phản xạ cương dương cũng như hành vi gáp, lật dương vật của chuột đực điều trị. Đồng thời liều 800mg/kg của cả 4 phân đoạn này đều làm tăng khối lượng cơ nâng hậu môn ở cả chuột đực không thiếu và thiếu [47].

+ Theo Dương Thị Ly Hương, dịch chiết toàn phần trong nước liều 10 g/kg trọng lượng làm tăng khối lượng túi tinh, tuyến Cowper, cơ nâng hậu môn chuột nhắt 1 cách có ý nghĩa thống kê so với lô chứng, cải thiện được số lượng và độ di động của tinh trùng trên những chuột bị gây suy sinh dục bằng natri valproat [18].

- Ngoài tác dụng trên, Bá bệnh còn có tác dụng gây độc tế bào ung thư phổi, ung thư vú và ức chế sự sao chép HIV trên lympho H9 trên in vivo, kháng ký sinh trùng sốt rét,...

1.4.2.2. Bạch tật lê

- Tên khoa học: *Fructus Tribuli terrestris*

- Tên khác: Gai chông, gai sấu, thích tật lê, quý kiến sấu, gai ma vương, bạch tịch lợi..

*** Tác dụng dược lý**

- Tác dụng làm tăng cường hoạt động sinh dục ở chuột bình thường và chuột bị thiếu. Dịch chiết nước đông khô quả bạch tật lê cho chuột uống dài ngày có tác dụng tăng nồng độ testosterone trong huyết thanh, tăng hành vi tình cụ như tăng tần suất tiếp cận với chuột cái, tăng số lần giao cấu, không ảnh hưởng đến số lượng tinh trùng một cách phụ thuộc vào liều trên chuột cống suy giảm tình dục, không độc khi cho chuột uống 28 ngày.

+ Chất chiết được từ phân đoạn ethanol quả Gai trống đã cho uống với liều 5mg/kg kết hợp với α -tocopherol, 75mg/kg x 1 lần/ngày x 6 tuần, trên chuột đã được gây độc tinh hoàn bằng cadimium với liều 3mg/kg x 1 lần/tuần. Có tác dụng làm giảm tổn thương tinh hoàn, cơ chế liên quan đến tác dụng chống oxy hóa và kích thích sản xuất testosterone của tế bào Leydig [4], [41].

+ Nghiên cứu ảnh hưởng của Bạch tật lê khi cho chuột cống trưởng thành uống liều 5mg/kg trên hành vi tình dục cho thấy làm tăng số lần tiếp cận, số lần xâm nhập, giảm thời gian đạt đến xuất tinh, thời gian sau xuất tinh [57].

- Tác dụng khác: Tác dụng trên đường huyết: làm chậm sự tăng glucose máu sau bữa ăn. Tác dụng trên cơ tim: loại trừ các tổn thương của tế bào cơ tim và ngăn chặn sự biến dạng tâm thất sau nhồi máu cơ tim. Chống oxy hóa, hạ áp, ức chế tế bào ung thư, bảo vệ gan, giảm đau, kháng nấm, kháng khuẩn.

1.4.2.3. Xà sàng tử

- Tên khoa học: *Fructus Cnidii*

- Tên khác: Cây giần sàng

*** Tác dụng dược lý**

- Tác dụng kiểu nội tiết tố sinh dục

+ Dịch chiết ethanol tiêm dưới da chuột nhắt trắng 32 ngày liên tục, chuột cái có tác dụng kéo dài thời gian động dục, tăng trọng lượng buồng trứng, tử cung, chuột đực gây tăng trọng lượng tiền liệt tuyến, túi tinh, cơ nâng hậu môn [40].

+ Theo Yuan (2004) ảnh hưởng của osthole lên nồng độ androgen và NOS kết quả cho thấy nồng độ testosterone, LH và FSH đều tăng lên, hoạt động NOS được tăng cường trên chuột cống thiếu sau 20 ngày sử dụng liên tục [85].

+ Nghiên cứu in vitro của Chen J (2000) đã đánh giá tác dụng của osthole trên cơ trơn thể hang cô lập của thỏ. Kết quả cho thấy osthole có tác dụng gây giãn cơ trơn thể hang của thỏ, tác dụng này phụ thuộc vào liều. Cơ chế gây giãn cơ trơn thông qua tăng giải phóng nitric oxyd tự nội mạc, ức chế không chọn lọc PDE, làm giảm tốc độ thủy phân cGMP và tăng nồng độ cAMP nội bào [51].

+ Hoàng Việt Dũng (2014) nghiên cứu về tác dụng tăng cường chức năng sinh dục nam của osthole trên chuột cống đực thực nghiệm, kết quả cho thấy việc sử dụng liều lặp lại của osthole sau 5 ngày với liều 150mg/kg ngoài việc rút ngắn thời gian nhảy còn làm giảm thời gian đạt tới xuất tinh, thời gian nhảy lại so với lô hứng ($p < 0,05$). Osthole cũng có hoạt tính androgen. Ở liều 150mg/kg thuốc làm tăng trọng lượng túi tinh, liều 250mg/kg thuốc làm tăng cả trọng lượng túi tinh và tuyến Cowper có ý nghĩa so với lô chứng ($p < 0,05$) [10].

- Tác dụng khác: Chống loãng xương, bảo vệ hệ thần kinh, tác dụng chống loạn nhịp, tác dụng chống dị ứng, tác dụng long đờm, bình suyễn.

1.4.2.4. Hoàng kỳ

- Tên khoa học: *Radix Astragali membranacei*

- Tên khác: Miên hoàng kỳ, tiễn kỳ, khẩu kỳ

- Tác dụng dược lý

+ Tác dụng trên hệ sinh dục: gây kích thích co tử cung cô lập của chuột cống có thai, nhưng ức chế sự co cơ của ruột thờ cô lập. Kéo dài thời gian động dục trên chuột nhắt, bình thường chu kỳ động dục [40].

+ Tác dụng khác: kích thích phát triển cơ thể [40], tác dụng lên hệ miễn dịch [40], tác dụng trên tim, tác dụng trên mạch và huyết áp, tác dụng trên gan, lợi tiểu, chống viêm, kháng khuẩn, ức chế tế bào ung thư.

+ Độc tính: Hoàng kỳ độc tính rất thấp, dùng liều cao gấp 500 lần liều dùng bình thường trên người không biểu hiện độc tính [40].

1.4.2.5. Đương quy

- Tên khác: Tần quy, đương quy, vân quy.

- Tên khoa học: *Radix Angelicae sinensis*

*** Tác dụng dược lý**

- *Tác dụng hướng sinh dục theo kiểu vitamin E*: Cho chuột cống đực ăn chế độ có 5-6% đương quy có tác dụng phục hồi tinh hoàn bị thoái hóa do thiếu vitamin E gây nên.

- *Tác dụng khác*: trên tử cung tim, huyết áp, tác dụng tăng cường miễn dịch, gây trấn tĩnh, chống thiếu máu, kháng khuẩn, ức chế ngưng tập tiểu cầu [40].

1.4.2.6. Câu kỷ tử

- Tên khác: Cam câu kỉ, hồng câu kỉ, câu kỉ tử, khủ khởi

- Tên khoa học vị thuốc: *Fructus Lycii*

*** Tác dụng dược lý**

- *Tác dụng lên khả năng sinh sản*: Cho gà ăn chất Betain sẽ đẻ số lượng trứng nhiều hơn. Dịch chiết kỉ tử tác dụng trực tiếp lên tuyến yên chuột cống trắng kích thích rụng trứng

- Tác dụng làm hạ cholesterol huyết, hạ đường huyết, chống oxy hóa, bảo vệ tế bào thần kinh, bảo vệ gan, tăng cường miễn dịch, tác dụng trên máu.

- *Độc tính*: câu kê tử có độc tính rất thấp [40].

1.4.2.7. Ba kích

- Tên khoa học: *Radix Morindae*

- Tên khác: Ba kích thiên, dây ruột gà

*** Tác dụng dược lý**

- Tác dụng kiểu androgen: Một thí nghiệm của nhóm tác giả thuộc Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh trên chuột nhắt đực bình thường và chuột nhắt đực bị suy giảm chức năng sinh dục cho thấy Ba kích có tác dụng kiểu androgen. Chuột đực cho uống cao chiết còn 45% rễ Ba kích liều 50 và 100mg/kg liên tục trong 15 ngày. Kết quả cho thấy, trên chuột nhắt đực bình thường uống liều 100mg/kg, nồng độ testosterone huyết tương, khối lượng túi tinh, tuyến tiền liệt, cơ nâng hậu môn đều tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng, chuột uống liều 50mg/kg không làm tăng testosterone và cơ nâng hậu môn. Trên chuột nhắt suy giảm chức năng sinh dục, ở cả 2 mức liều 50 và 100mg/kg đều làm tăng nồng độ testosterone huyết tương, khối lượng túi tinh, tuyến tiền liệt, cơ nâng hậu môn so với nhóm chứng [35].

- Ngoài ra còn có tác dụng khác: Tăng sức dẻo dai, tăng sức đề kháng, chống viêm, nước sắc ba kích có tác dụng làm tăng co bóp ruột và hạ huyết áp

1.4.2.8. Dâm dương hoắc

- Tên khoa học: *Herba Epimedii*

- Tên khác: Cương tiên, Tiên linh tỳ, Tam chi cửu diệp thảo, Phòng trường thảo...

*** Tác dụng dược lý**

- Tác dụng nội tiết sinh dục: Dâm dương hoắc qua bào chế thí nghiệm trên chuột nhắt đực liều 15g/kg, dùng liên tục trong 10 ngày có tác dụng làm tăng lượng testosterone trong máu và tăng trọng lượng cơ nâng hậu môn. Dâm dương hoắc dùng sống không có tác dụng nâng cao khả năng sinh dục, trái lại làm giảm lượng testosterone và trọng lượng cơ nâng hậu môn [40].

- Tác dụng khác: Với hệ tim mạch làm tăng lưu lượng mạch vành so với thời điểm trước lúc dùng thuốc. Tác dụng trên hệ miễn dịch làm tăng lượng kháng thể

hemolysin huyết thanh, tăng số lượng tế bào kháng thể ở lách, thúc đẩy sự chuyển dạng tế bào lympho và tăng cường tác dụng thực bào của các đại thực bào [40].

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

Thành phần 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

- 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 [2].

+ 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 [2].

+ 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 [2], [25], [40].

- 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 [2], [40].

- Tác dụng của bài thuốc: Bổ thận ích tinh, ích khí huyết.

- Công dụng: Chữa suy giảm sinh dục nam

- Cách dùng: Ngày uống 1 thang, sắc 3 lần, cô còn 3 bát thuốc, chia 3 lần uống trong ngày.

- Kiên kị: Thận trọng khi dùng cho người bị tiêu chảy, không dùng cho phụ nữ có thai, trẻ em dưới 16 tuổi.

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, cả 2 giống đực và cái, khỏe mạnh, 6 tuần tuổi, trọng lượng $20,0 \pm 2,0$ g do Ban Chăn nuôi (Học viện Quân y) cung cấp. Động vật được nuôi ổn định trong phòng thí nghiệm bằng thức ăn chuẩn, uống nước sạch tự do.

❖ Độc tính bán trường diễn

Thỏ nhà, cả hai giống đực và cái khỏe mạnh, trọng lượng 1,8-2,1kg. Tất cả thỏ được nuôi trong phòng thí nghiệm với cùng điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng thí nghiệm, thời gian sáng - tối 12/12 giờ, ăn thức ăn dành riêng cho thỏ thí nghiệm (rau xanh, viên thức ăn làm theo công thức của Bộ môn Dược lý).

❖ Độc tính trên sinh sản

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, cả 2 giống đực và cái, khỏe mạnh, 6 tuần tuổi, trọng lượng $20,0 \pm 2,0$ g do Ban Chăn nuôi (Học viện Quân y) cung cấp. Động vật được nuôi ổn định trong phòng thí nghiệm bằng thức ăn chuẩn, uống nước sạch tự do.

❖ Nghiên cứu tác dụng của Testin CT3 lên hình thái tinh hoàn

Chuột cống trắng đực, 3 tháng tuổi, trọng lượng khoảng 140 ± 20 g do Ban Chăn nuôi (Học viện Quân Y) cung cấp. Động vật được nuôi ổn định trong phòng thí nghiệm bằng thức ăn chuẩn, uống nước sạch tự do.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nghiên cứu độc tính cấp

Được thực hiện tại Bộ môn Dược lý – Học viện Quân Y

Dựa theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon [11] và hướng dẫn của WHO [83] về xác định độ an toàn cho các chế phẩm có nguồn gốc thiên nhiên. Thí nghiệm được tiến hành trên chuột nhắt trắng. Chuột được nhịn đói 12 giờ trước khi làm thí

nghiệm. Chia ngẫu nhiên chuột thành 9 lô, mỗi lô 10 con. 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 [11].

2.2.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Được thực hiện tại Bộ môn Dược lý – Học viện Quân Y

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 [5], [11], [73], [83].

- Thí nghiệm tiến hành trên thỏ. Thỏ được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, 8 con/lô.

+ Lô 1 (chứng): uống nước muối sinh lý

+ Lô 2 (lô trị 1): uống cao đặc Testin CT3 liều 5,88 g/kg/24 giờ (liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người, tính theo hệ số 3).

+ Lô 3 (lô trị 2): uống cao đặc Testin CT3 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.

- Các chỉ tiêu đánh giá: Theo dõi tình trạng chung, hoạt động tự nhiên, ăn uống, phân, nước tiểu, trọng lượng cơ thể. Huyết học: số lượng hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu. Sinh hóa: AST, ALT, urea, creatinin. Mô bệnh học: vào ngày thứ 42 thỏ được mổ để quan sát đại thể toàn bộ cơ quan, so sánh với nhóm chứng. Ở mỗi lô chọn ngẫu nhiên 50% thỏ lấy gan, lách, thận làm tiêu bản đánh giá tổn thương ở mức độ vi thể.

- Thời điểm làm xét nghiệm: Các chỉ tiêu đánh giá được kiểm tra vào lúc trước khi uống thuốc, sau 14 ngày uống thuốc, sau 42 ngày theo dõi.

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

Được thực hiện tại Bộ môn Dược lý – Học viện Quân Y

Dựa theo quy định hướng dẫn của OECD và WHO về nghiên cứu độc tính trên sinh sản và phát triển [11], [74], [83].

Thế hệ P

➤ **Giai đoạn trước khi ghép cặp**

180 chuột nhắt trắng thế hệ P, 4 tuần tuổi, gồm 60 chuột đực và 120 chuột cái được chia ngẫu nhiên vào 3 nhóm, tách riêng đực - cái:

Nhóm không uống thuốc gồm: 20 chuột đực và 40 chuột cái

Nhóm uống thuốc liều 1: 20 chuột đực uống thuốc liều 1 và 40 chuột cái không uống thuốc

Nhóm uống thuốc liều 2: 20 chuột đực uống thuốc liều 2 và 40 chuột cái không uống thuốc

- Liều dùng thuốc:

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

+ Lô 2 (lô trị 1): uống cao đặc Testin CT3 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).

+ Lô 3 (lô trị 2): uống cao đặc Testin CT3 liều 69,15 g dược liệu khô/kg/24 giờ (gấp 3 lần lô trị 1).

Chuột nhận về được nuôi trong phòng chăn nuôi thực nghiệm 3 ngày để chuột quen môi trường mới, tách riêng đực, cái. Sau đó chia chuột vào các chuồng, mỗi chuồng 5 chuột, theo dõi cân nặng 1 tuần 2 lần để điều chỉnh lượng thuốc.

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 3 lô nghiên cứu sau:

Lô chứng: 20 chuột đực không uống thuốc + 40 chuột cái không uống thuốc

Lô 1: 20 chuột đực uống thuốc liều 1 + 40 chuột cái không uống thuốc

Lô 2: 20 chuột đực uống thuốc liều 2 + 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 mắt 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 thế 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 [79]. 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

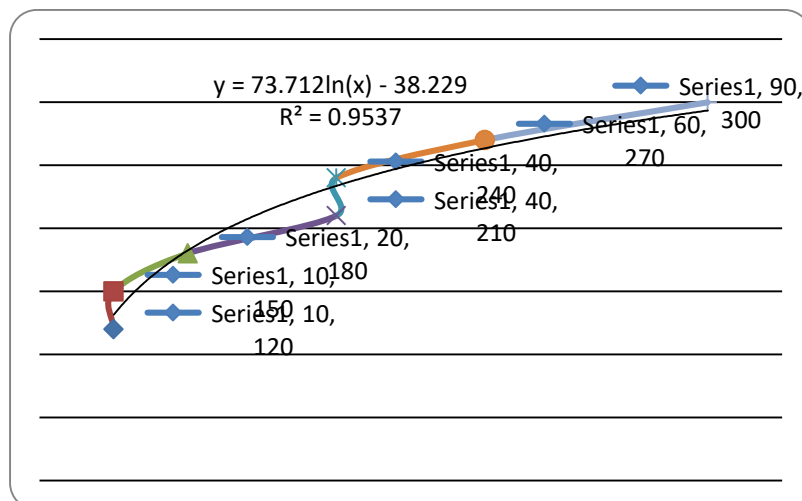
3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của cao đặc Testin CT3

Theo dõi chuột sau uống cao đặc Testin CT3 với các mức liều khác nhau thấy: ở liều 90g/kg trọng lượng cơ thể (TLCT), tất cả các chuột đều khỏe mạnh, hoạt động ăn uống bình thường. Với mức liều 120g/kg, chuột bắt đầu xuất hiện các biểu hiện kém hoạt động, lông xù, ăn uống kém, đi ngoài phân lỏng và có 01/10 chuột chết trong vòng 24 giờ. Số chuột chết tăng dần khi tăng liều dùng, tới liều 330 g/kg gây chết 100% chuột thí nghiệm. Số chuột còn sống ở các lô dần phục hồi, hoạt động, ăn uống bình thường.

Bảng 3.1. Kết quả đánh giá độc tính cấp của cao đặc Testin CT3

Lô	Liều dùng (g/kgTLCT)	n	Số lượng động vật chết (sau 72 giờ)	Tỷ lệ % chết
1	90	10	0	0
2	120	10	1	10
3	150	10	1	10
4	180	10	2	20
5	210	10	4	40
6	240	10	4	40
7	270	10	6	60
8	300	10	9	90
9	330	10	10	100

Từ kết quả bảng trên, đã sử dụng phương pháp dùng Excel máy tính sau đó kiểm tra lại bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon, vẽ được đường biểu diễn mối tương quan giữa liều dùng và tỷ lệ chuột chết [11].



Biểu đồ 3.1. Một tương quan giữa liều dùng và tỷ lệ chuột chết trong vòng 72h

Từ đó tính được $LD_{50} = 250,13$ 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

3.2.1. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 đến trọng lượng thỏ

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của Testin CT3 đối với TLCT thỏ (n = 8, M±SE)

Thời điểm xét nghiệm	Trọng lượng thỏ (kg)			p
	Lô trị 1 (1)	Lô trị 2 (2)	Lô chứng (3)	
Trước thí nghiệm (a)	2,04±0,02	2,03±0,02	2,03±0,02	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 2 tuần (b)	2,08±0,03	2,04±0,06	2,01±0,01	$p_{3-1} > 0,05$
Sau 6 tuần (c)	2,15±0,06	2,11±0,09	2,13±0,03	$p_{3-2} > 0,05$
p (trước – sau)	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			

So sánh giá trị trung bình trọng lượng cơ thể thỏ ở 2 lô dùng cao đặc Testin CT3 với lô đối chứng sinh học tại các thời điểm thấy thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các thời điểm sau so với trước uống thuốc ở từng lô thấy trung bình trọng lượng thỏ ở 2 lô dùng Testin CT3 đều có sự thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả trên chứng tỏ cao đặc Testin CT3 ở cả 2 mức liều không ảnh hưởng đến phát triển cân nặng bình thường của thỏ.

3.2.2. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 đến một số chỉ tiêu huyết học của thỏ

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của Testin CT3 đến chỉ số huyết học của thỏ

(n = 8, M±SE)

Thời điểm xét nghiệm	Số lượng hồng cầu ($\times 10^{12}/l$)			
	Lô trị 1 (1)	Lô trị 2 (2)	Lô chứng (3)	p
Trước thí nghiệm (a)	5,67±0,16	5,42±0,05	5,95±0,27	p ₂₋₁ > 0,05 p ₃₋₁ > 0,05 p ₃₋₂ > 0,05
Sau 2 tuần (b)	5,51±0,13	5,32±0,15	5,38±0,15	
Sau 6 tuần (c)	5,61±0,15	5,69±0,35	5,56±0,11	
p (trước – sau)	p _{b-a} > 0,05; p _{c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Hàm lượng huyết sắc tố (G/l)				
Trước thí nghiệm (a)	115,25±2,80	112,50±1,97	117,88±2,67	p ₂₋₁ > 0,05
Sau 2 tuần (b)	110,14±2,67	109,25±3,49	109,75±3,15	p ₃₋₁ > 0,05
Sau 6 tuần (c)	110,88±3,00	114,38±6,91	110,00±3,78	p ₃₋₂ > 0,05
p (trước – sau)	p _{b-a} > 0,05; p _{c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Số lượng bạch cầu (G/l)				
Trước thí nghiệm (a)	9,28±1,19	6,59±0,49	7,61±0,81	p ₂₋₁ > 0,05
Sau 2 tuần (b)	8,00±0,76	6,21±0,55	7,84±1,56	p ₃₋₁ > 0,05
Sau 6 tuần (c)	9,31±1,17	7,83±0,94	10,9±1,25	p ₃₋₂ > 0,05
p (trước – sau)	p _{b-a} > 0,05; p _{c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Số lượng tiểu cầu (G/l)				
Trước thí nghiệm (a)	509,38±54,2	438,50±46,50	495,75±84,57	p ₂₋₁ > 0,05
Sau 2 tuần (b)	424,57±81,01	513,00±85,90	543,12±123,1	p ₃₋₁ > 0,05
Sau 6 tuần (c)	453,50±75,04	431,25±52,52	551,50±56,45	p ₃₋₂ > 0,05
p (trước – sau)	p _{b-a} > 0,05; p _{c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			

So sánh trong từng lô giữa các thời điểm và giữa các lô ở cùng một thời điểm thấy số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hàm lượng hemoglobin thay đổi không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05) giữa nhóm chứng và nhóm nghiên cứu.

Như vậy, cho thở ổng cao đặc Testin CT3 liên tục trong thời gian 42 ngày ở cả 2 mức liều không ảnh hưởng tới số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hàm lượng hemoglobin. Chứng tỏ thuốc an toàn đối với chức năng tạo máu khi dùng kéo dài.

3.2.3. Đánh giá chức năng gan, thận

Bảng 3.4. Ảnh hưởng Testin CT3 đến chỉ số sinh hóa trong máu thỏ
(n = 8, M±SE)

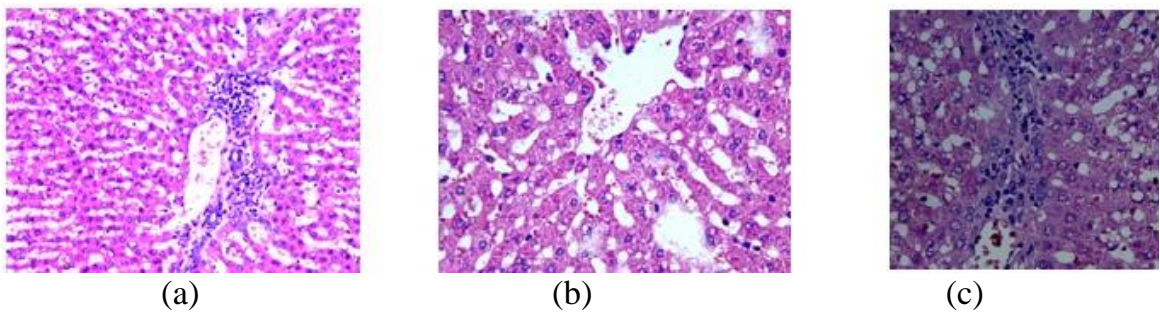
Thời điểm xét nghiệm	Hoạt độ AST (UI/l)			
	Lô trị 1 (1)	Lô trị 2 (2)	Lô chứng (3)	p
Trước thí nghiệm (a)	24,88±3,09	25,63±5,26	27,12±7,07	p ₂₋₁ > 0,05
Sau 2 tuần (b)	44,38±13,24	50,14±12,13	28,13±5,09	p ₃₋₁ > 0,05
Sau 6 tuần (c)	52,75±14,87	39,75±9,15	37,63±10,13	p ₃₋₂ > 0,05
p (trước – sau)	p _{b-a} > 0,05; p _{c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Hoạt độ ALT (UI/l)				
Trước thí nghiệm (a)	48,88±4,19	52,25±5,03	46,37±8,86	p ₂₋₁ > 0,05
Sau 2 tuần (b)	57,38±3,88	62,63±4,29	60,00±8,11	p ₃₋₁ > 0,05
Sau 6 tuần (c)	58,50±3,58	58,00±4,68	58,25±7,42	p ₃₋₂ > 0,05
p (trước – sau)	p _{b-a} > 0,05; p _{c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Nồng độ Urea (mmol/L)				
Trước thí nghiệm (a)	3,89±0,59	3,23±0,84	3,74±0,91	p ₂₋₁ > 0,05
Sau 2 tuần (b)	3,38±0,35	4,08±0,22	3,55±0,27	p ₃₋₁ > 0,05
Sau 6 tuần (c)	3,35±0,54	3,81±0,41	3,64±0,37	p ₃₋₂ > 0,05
p (trước – sau)	p _{b-a} > 0,05; p _{c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			
Nồng độ Creatinin (mmol/L)				
Trước thí nghiệm (a)	80,13±5,19	73,38±5,08	82,38±1,93	p ₂₋₁ > 0,05
Sau 2 tuần (b)	78,38±4,38	81,75±2,53	87,13±2,30	p ₃₋₁ > 0,05
Sau 6 tuần (c)	85,88±4,92	81,63±1,25	85,50±1,45	p ₃₋₂ > 0,05
p (trước – sau)	p _{b-a} > 0,05; p _{c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			

So sánh trong từng lô giữa các thời điểm và giữa các lô ở cùng một thời điểm thấy nồng độ urea, creatinin, hoạt độ AST, ALT thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) giữa nhóm chứng và nhóm nghiên cứu.

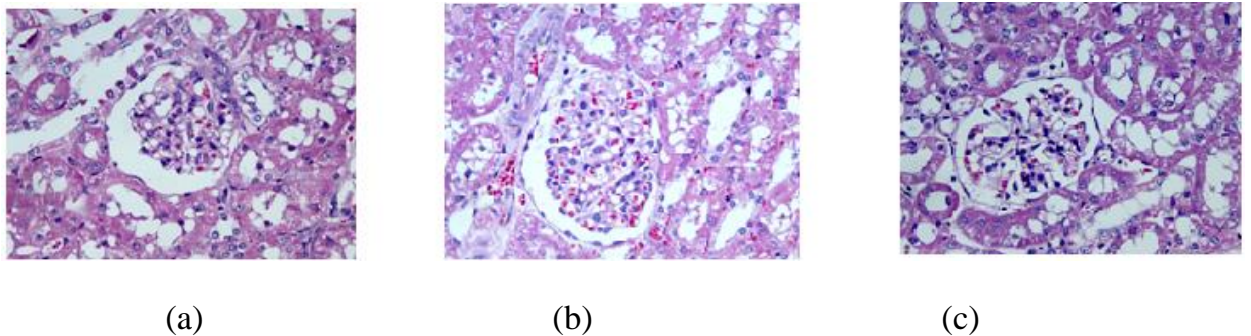
Như vậy, cao đặc Testin CT3 ở cả 2 mức liều không ảnh hưởng tới nồng độ ure, creatinin, hoạt độ AST, ALT.

3.2.4. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 đến mô bệnh học gan, thận, lách thỏ

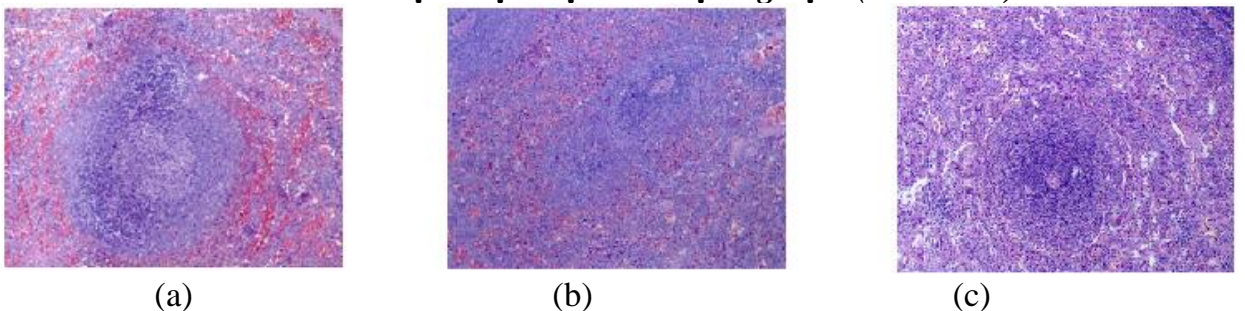
- Quan sát đại thể: sau khi mổ thỏ, quan sát thấy hình thái của gan, thận bình thường, nguyên vẹn màu sắc ở hai lô dùng cao đặc Testin CT3 không khác so với lô chứng.



Hình 2.1. Ảnh mô bệnh học gan thỏ thực nghiệm (HE x 200)



Hình 2.2. Ảnh mô bệnh học thận thỏ thực nghiệm (HE x 200)



Hình 2.3. Ảnh mô bệnh học lách thỏ thực nghiệm (HE x 200)

(a): Lô trị 1; (b): Lô trị 2; (c): Lô chứng

- Quan sát vi thể: sau khi quan sát đại thể, cắt rời gan, thận, lách ngâm vào dung dịch formol 10% làm tiêu bản và quan sát dưới kính hiển vi.

+ Lô chứng: các bè gan và tiểu thùy gan không thay đổi về cấu trúc. Tế bào gan không có tổn thương thoái hóa, không có xâm nhập viêm. Cấu trúc vùng vỏ, vùng tủy, cầu thận bình thường, không có tổn thương. Vỏ xơ lách mỏng, vùng vỏ có nhiều nang lympho, có nơi hình thành các trung tâm mầm, các xoang lách chứa hồng cầu và một số đại thực bào.

+ Lô trị 1 và 2: thùy gan và bè gan không thay đổi về cấu trúc. Tế bào gan không tổn thương thoái hóa. Tĩnh mạch trung tâm không giãn, không xung huyết. Khoang cửa không có xâm nhập viêm. Cấu trúc vùng vỏ, vùng tủy, cầu thận bình thường, không thấy hình ảnh tổn thương. Vỏ lách nguyên vẹn, các nang lympho rõ, có các động mạch bút lông, các xoang lách chứa hồng cầu và một số đại thực bào.

Như vậy, cao đặc Testin CT3 dùng đường uống liên tục trong 42 ngày không gây tổn thương trên gan, thận, lách của thỏ.

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

3.3.1. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên khả năng mang thai các thế hệ

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của Testin CT3 khả năng mang thai qua các thế hệ

Thế hệ	Chỉ số nghiên cứu	Lô chứng (a)	Lô trị 1 (b)	Lô trị 2 (c)	p (a-b,c)
P	Tỷ lệ mang thai	34,1%	40,5%	40%	> 0,05
F1	Tỷ lệ mang thai	36,36%	44,83%	38,71%	> 0,05

Nhận xét:

- Với thế hệ P, cao đặc Testin CT3 ở cả 2 mức liều không làm ảnh hưởng đến tỷ lệ mang thai của chuột cái so với lô chứng.

- Thế hệ F1: tỷ lệ thụ thai ở chuột cái F1 sinh ra từ thế hệ chuột P ở cả 2 mức liều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$).

3.3.2. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên chỉ số phôi thai qua các thế hệ

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của Testin CT3 lên các chỉ số phôi thai

Thế hệ	Chỉ số nghiên cứu	Lô chứng (a)	Lô trị 1 (b)	Lô trị 2 (c)	p (a-b,c)
P mang thai F1	Số hoàng thể/mẹ (M±SE)	14,0±2,28	13,0±2,23	13,33±3,93	> 0,05
	Số thai đậu/mẹ (M±SE)	14,0±2,28	12,0±3,39	13,33±3,93	
	Số thai bình thường/mẹ (M±SE)	14,0±2,28	12,0±3,39	13,33±3,93	
	Tỷ lệ thai chết sớm (%)	0	7,81	0	> 0,05
	Tỷ lệ thai chết muộn (%)	0	0	0	
	Tỷ lệ mất trứng	0	0	0	
F1 mang thai F2	Số hoàng thể/mẹ (M±SE)	11,33±3,56	7,94±3,1	7,49±3,47	> 0,05
	Số thai đậu/mẹ (M±SE)	11,17±3,82	7,98±2,92	7,36±3,6	
	Số thai bình thường/mẹ (M±SE)	11,0±3,69	7,84±3,1	7,24±3,79	
	Tỷ lệ thai chết sớm (%)	1,49	1,67	0	> 0,05
	Tỷ lệ thai chết muộn (%)	0	4,08	0	
	Tỷ lệ mất trứng	1,47	0	2,04	

Nhận xét:

- Chuột thế hệ P: Chuột ở các lô dùng thuốc có số hoàng thể, số thai đậu, số thai bình thường không có sự khác biệt có thống kê so với lô chứng. Tỷ lệ thai chết sớm, thai chết muộn, tỷ lệ mất trứng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$).

- Thế hệ F1: Các chuột ở 2 lô trị 1 và trị 2 có số hoàng thể, số thai đậu, số thai bình thường không có sự khác biệt có thống kê so với lô chứng. Tỷ lệ thai chết sớm, thai chết muộn, tỷ lệ mất trứng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$).

3.3.3. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 đến sự sinh con qua các thế hệ

Thế hệ	Chỉ số nghiên cứu	Lô chứng (a)	Lô trị 1 (b)	Lô trị 2 (c)	p (a-b,c)
P mang thai F1	Số chuột con/mẹ (M±SE)	9,0±0,94	10,81±3,25	11,0±3,0	> 0,05
	Tỷ lệ chuột con có dị tật	0	0	0	
	Tỷ lệ chuột con chết	0	0	0	
F1 mang thai F2	Số chuột con/mẹ (M±SE)	9,0±0,94	6,13±4,15	7,04±3,72	> 0,05
	Tỷ lệ chuột con có dị tật	0	0	0	
	Tỷ lệ chuột con chết	0	0	0	

Nhận xét:

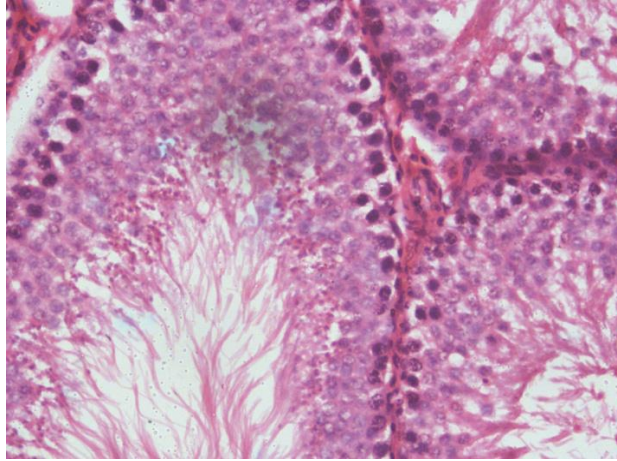
- Thế hệ P: Số chuột con F1 trong mỗi lứa đẻ của chuột mẹ P không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$). Ở các lô không quan sát thấy hiện tượng chuột con bị chết hoặc có dị tật bẩm sinh.

- Thế hệ F1: Số chuột con F2 trong mỗi lứa đẻ của chuột mẹ F1 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$). Ở các lô không quan sát thấy hiện tượng chuột con bị chết hoặc có dị tật bẩm sinh.

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

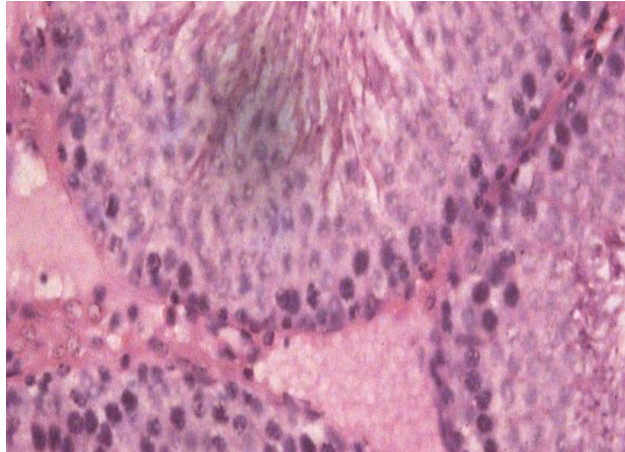
3.4.1. Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên hình thái tinh hoàn bình thường

❖ **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.



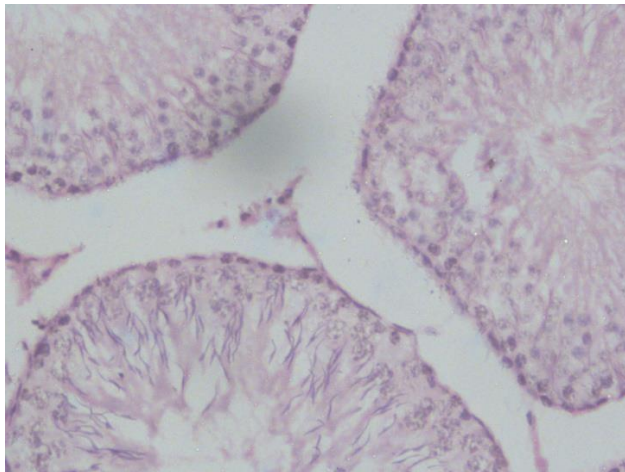
Hình 3.1. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô chứng không nhiệt (HE x 40)

❖ **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.



Hình 3.2. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô không nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)

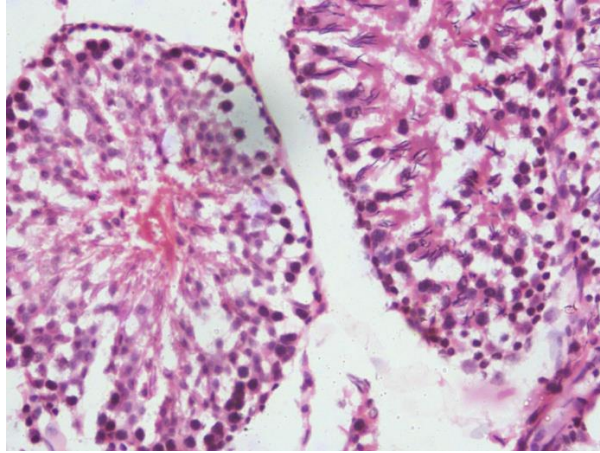
❖ **Lô trị 2:** Ống sinh tinh có hình thái bình thường, lòng ống sinh tinh có cấu trúc bình thường, chứa đầy đủ các tế bào dòng tinh.



Hình 3.3. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô không nhiệt thuốc liều 2 (HE x 40)

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

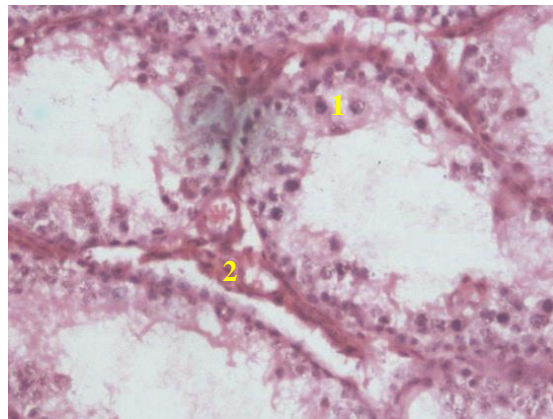
❖ **Lô chứng:** Nhiều ống sinh tinh có rối loạn quá trình sinh tinh.



Hình 3.4. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô không nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)

❖ **Lô trị 1:**

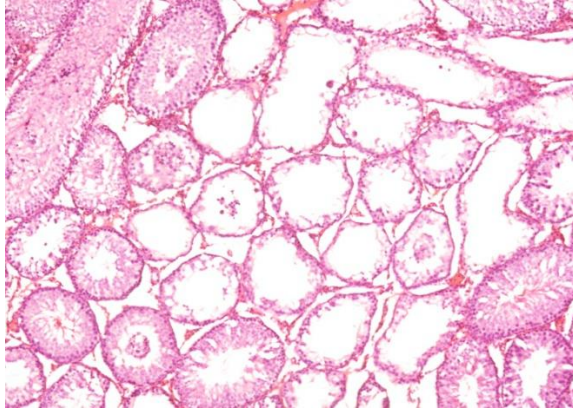
- **Ngày thứ 21:** Lòng ống sinh tinh bị tổn thương giãn rộng, trong lòng ống sinh tinh còn rất ít tế bào dòng tinh, cấu trúc tế bào dòng tinh bị đảo lộn, trong mô kẽ có chứa tế bào tuyến kẽ.



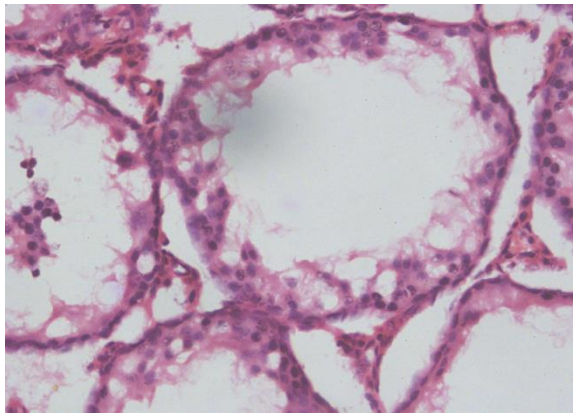
Hình 3.5. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)

1. Ống sinh tinh; 2. Mô 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

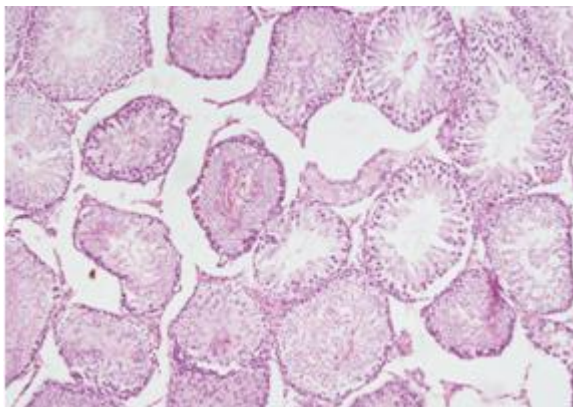


Hình 3.6. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 10)



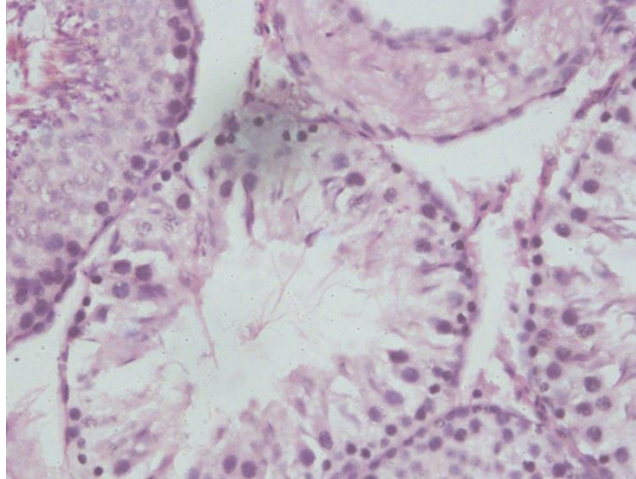
Hình 3.7. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)

- 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.



Hình 3.8. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 10)

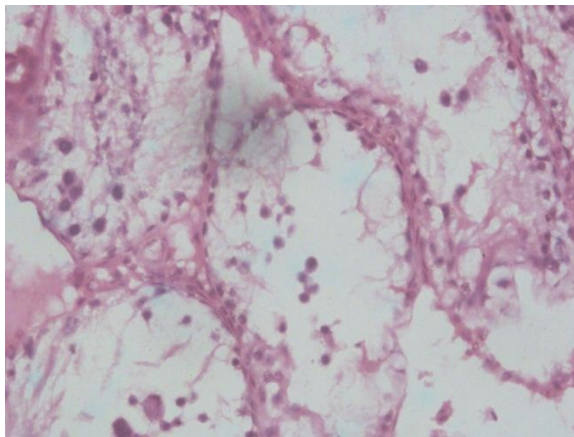
- Trong lòng ống sinh tinh các tế bào dòng tinh hồi phục tốt, các tinh nguyên bào, tinh bào 1, tinh bào 2 tăng sinh nhiều, có tiền tinh trùng và tinh trùng.



Hình 3.9. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)

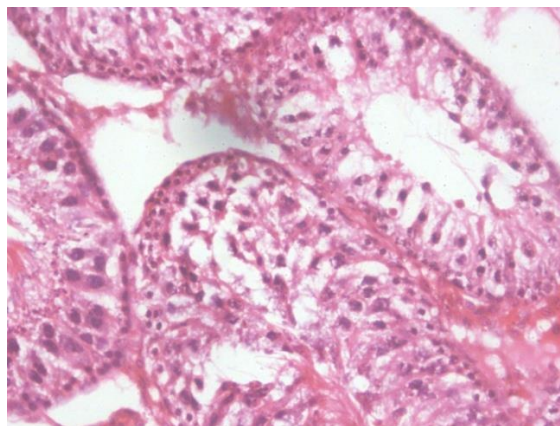
❖ Lô trị 2:

- **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



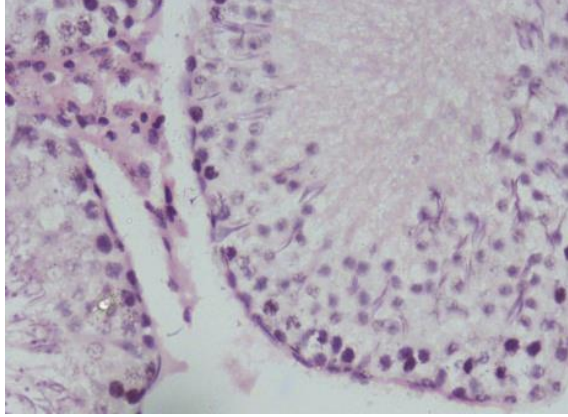
Hình 3.10. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)

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



Hình 3.11. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)

- 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.



Hình 3.12. Mặt cắt qua tinh hoàn chuột lô nhiệt thuốc liều 1 (HE x 40)

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, Thổ 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... [18], [10], [35].

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 [10], [18], [35]. 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 [2], [40].

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 nhắt 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

Theo hướng dẫn của WHO, tất cả các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu đều phải đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn trên động vật thực nghiệm trước khi đưa vào thử nghiệm trên người. Đánh giá độc tính cấp và xác định LD₅₀ là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá tính an toàn của một chế phẩm [83]. Vì vậy, việc xác định độc tính cấp và liều chết 50% để đánh giá mức độ độc và có cơ sở chọn liều thử tác dụng cho các bước nghiên cứu tiếp theo là cần thiết và bắt buộc.

Nghiên cứu độc tính cấp trên chuột nhắt trắng được thực hiện theo phương pháp của Litchfield – Wilcoxon. Đây là phương pháp rất hay được dùng hiện nay trên thế giới.

Theo kết quả ở bảng 3.1, 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 nhắt 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 [56], 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. Trong nghiên cứu của Phan Hoài Trung (2004), nghiên cứu độc tính cấp của bài thuốc Sinh tinh thang nhận thấy với liều 55 g/kg trọng lượng, là liều đậm đặc nhất có thể cho chuột nhắt uống được

(gấp 6,67 lần liều dùng trên người) cũng không xác định được LD₅₀ [36]. Nghiên cứu của Đoàn Minh Thụy (2010) về bài thuốc Hồi Xuân Hoàn khi cho chuột nhắt uống đến liều 25 g/kg trọng lượng (gấp 8,33 lần liều dùng trên người) cũng không xác định được độc tính cấp LD₅₀ [34].

Trong nghiên cứu độc tính cấp, những chuột chết được mổ để quan sát đại thể thì đều thấy gan, thận hồng, mềm mại và không xung huyết. Như vậy, có thể độc tính của cao đặc Testin CT3 không phải do ảnh hưởng đến chức năng gan, thận và là độc tính tối cấp mà có thể ảnh hưởng chức năng của hệ cơ quan khác. Đặc biệt, dấu hiệu tiêu chảy rất nhiều và lông xù lên khi uống Testin CT3 với liều cao. Liệu thuốc có ảnh hưởng đến hệ tiêu hóa không? Như vậy cần phải có những nghiên cứu về độc tính chuyên biệt để có thể trả lời được câu hỏi này.

Mặt khác, theo kết quả nghiên cứu của Mai Ngọc Tú (2014) khi nghiên cứu LD₅₀ của cao đặc Testin bằng đường uống trên chuột nhắt trắng xác định LD₅₀ của cao đặc Testin là 33,47 g/kg (31,75 – 34,37 g/kg) [37], thấp hơn liều LD₅₀ trong nghiên cứu của chúng tôi. Lý giải sự khác biệt này theo chúng tôi có thể do một số nguyên nhân sau: Thành phần các vị thuốc ở 2 bài thuốc khác nhau, trong bài thuốc Testin có vị dược liệu Cốt khí củ, nhưng trong bài thuốc Testin CT3 nghiên cứu của chúng tôi không có Cốt khí củ mà thay vào đó là Dâm dương hoắc. Tổng bài thuốc Testin là 106 g dược liệu, còn tổng bài thuốc Testin CT3 của chúng tôi là 98 g dược liệu.

Cao đặc Testin CT3 trong thành phần gồm 8 vị dược liệu. Một số dược liệu đã xác định được LD₅₀ theo đường uống như: Dịch chiết nước rễ Bá bệnh có LD₅₀ là 135,00 g/kg trọng lượng (116,38 – 156,60) theo nghiên cứu của Dương Thị Ly Hương [18], có thể thấy trong rễ bá bệnh có nhiều thành phần gây độc nên dẫn đến có LD₅₀ của rễ Bá bệnh. Hay Ba kích có LD₅₀ là 193 g/kg. Còn các vị dược liệu khác thì độc tính rất thấp hoặc không có LD₅₀ [40].

4.2.2. Độc tính bán trường diễn

Trên thực tế khi sử dụng các dược liệu Y học cổ truyền để điều trị thì thường phải dùng trong thời gian dài thì mới phát huy tối đa tác dụng. Vì vậy, với các dược liệu khi sử dụng lâu dài trên lâm sàng thì việc nghiên cứu độc tính bán trường diễn là hoàn toàn cần thiết và là yêu cầu bắt buộc để đảm bảo vấn đề y đức trong nghiên cứu.

Theo quy định, thời gian nghiên cứu độc tính bán trường diễn ít nhất bằng thời gian sử dụng trên người. Thời gian nghiên cứu độc tính bán trường diễn càng dài so với thời gian nghiên cứu trên lâm sàng thì càng tăng thêm tính chặt chẽ, khoa học trong nghiên cứu. Trong nghiên cứu của chúng tôi, thời gian dùng thuốc trên người là 4 tuần và chúng tôi tiến hành thử độc tính bán trường diễn trên thỏ trong thời gian 6 tuần. Như vậy, về mặt khoa học nghiên cứu đã đảm bảo tốt yêu cầu về mặt thời gian.

Theo nguyên tác ngoại suy liều của Đỗ Trung Đàm [12], nếu coi liều dùng cho người là 1 thì tỷ lệ liều tương ứng ngoại suy sang thỏ là 3. Như vậy với liều dùng của cao đặc Testin CT3 trên người là 1,96 g/kg trọng lượng thì liều ngoại suy trên thỏ là 5,88 g/kg trọng lượng. Do đó, trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao đặc Testin CT3 trên thỏ sẽ đánh giá ở 2 mức 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).

Theo hướng dẫn của WHO, tình trạng chung, trọng lượng cơ thể và các chỉ số huyết học, sinh hóa, mô bệnh học là những xét nghiệm bắt buộc khi đánh giá độc tính của thuốc thử. Nếu thuốc có độc tính sẽ ảnh hưởng tới tình trạng toàn thân, một số cơ quan trong cơ thể như cơ quan tạo máu, chức năng gan, thận.

Tình trạng chung: Trong thời gian nghiên cứu, thỏ ở cả 3 lô hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, ăn uống tốt. Tuy nhiên ở lô thỏ uống cao đặc Testin CT3 liều cao 17,64 g/kg thì thấy một số thỏ đi ngoài phân đen lỏng (màu giống cao đặc không phải máu) và một số bị tiêu chảy nhẹ. Điều này cũng giống trong nghiên cứu của Mai Ngọc Tú [37].

Thay đổi trọng lượng cơ thể thỏ: Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.2 cho thấy sau 2 tuần và sau 6 tuần uống cao đặc Testin CT3 thì: So sánh giá trị trung bình trọng lượng cơ thể thỏ ở 2 lô dùng cao đặc Testin CT3 với lô đối chứng sinh học tại các thời điểm thấy thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các thời điểm sau so với trước uống thuốc ở từng lô thấy trung bình trọng lượng thỏ ở 2 lô dùng Testin CT3 đều có sự thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Thỏ dùng trong nghiên cứu là thỏ đã trưởng thành, có trọng lượng ổn định từ 2 – 2,5 kg. Vì vậy cân nặng duy trì ở mức độ trên là hoàn toàn phù hợp với sinh lý

phát triển. Như vậy, các thử nghiệm cứu đều phát triển tốt và cao đặc Testin CT3 uống liên tục trong 6 tuần không ảnh hưởng đến sự phát triển trọng lượng bình thường của thỏ.

Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 đến chức năng tạo máu: Cơ quan tạo máu là một trong những mô có nhiều tế bào phân chia với tốc độ mạnh nhất trong các mô của cơ thể. Vì vậy, trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn khi dùng thuốc kéo dài, ngoài việc đánh giá 2 cơ quan chịu trách nhiệm chính về chuyển hóa và thải trừ là gan và thận thì việc khảo sát cơ quan tạo máu thông qua các chỉ số huyết học là quy trình bắt buộc [83], [84].

Theo kết quả nghiên cứu ở bảng 3.3 cho thấy sau 2 tuần và sau 6 tuần uống cao đặc Testin CT3, các chỉ số huyết học ở cả hai lô trị thay đổi không có ý nghĩa thống kê so với trước khi dùng thuốc ($p > 0,05$) và so với lô chứng ở cùng thời điểm. Như vậy, cao đặc Testin CT3 không thể hiện độc tính trên cơ quan tạo máu.

Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 đến chức năng gan: Khi đưa thuốc vào cơ thể, thuốc có thể gây độc với gan, làm ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng gan. Vì vậy, khi đánh giá độc tính của thuốc, nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc tới cấu trúc và chức năng gan là rất cần thiết. Mức độ tổn thương tế bào gan thường được đánh giá thông qua hoạt độ các transaminase trong huyết thanh là ALT và AST. Khi tổn thương hủy hoại tế bào gan, hoạt độ enzym ALT tăng cao. Khác với ALT, đa số enzym AST cư trú trong ty thể, chỉ 1/3 enzym cư trú ở bào tương của tế bào. Khi tổn thương gan ở mức độ dưới tế bào, hoạt độ enzym AST trong ty thể được giải phóng ra ngoài. Vì vậy, trong viêm gan nói chung, hoạt độ ALT luôn tăng cao hơn AST [23], [39]. Kết quả định lượng hoạt độ ALT và AST trong huyết thanh thỏ ở bảng 3.4 cho thấy: sau 6 tuần uống thuốc liên tục, hoạt độ 2 enzym này ở cả 2 lô trị đều tăng, tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 đến chức năng thận: Thận là cơ quan bài tiết của cơ thể. Nhu mô thận rất dễ bị tổn thương bởi các chất nội sinh và ngoại sinh [39]. Vì vậy khi đưa thuốc vào cơ thể có thể gây độc, làm tổn thương thận, từ đó ảnh hưởng đến chức năng thận. Đánh giá chức năng thận sau khi dùng thuốc, thường dùng xét nghiệm định lượng creatinin máu. Creatinin máu là thành phần đạm trong

máu ổn định nhất, hầu như không phụ thuộc vào chế độ ăn hoặc những thay đổi sinh lý mà chỉ phụ thuộc vào khả năng đào thải của thận [23]. Creatinin máu là chỉ tiêu tin cậy nên hiện nay dùng để đánh giá và theo dõi chức năng thận.

Theo kết quả bảng 3.4 cho thấy sau 6 tuần dùng thuốc, ở cả 2 lô dùng cao đặc Testin CT3 thấy nồng độ urea và creatinin trong máu thỏ không có sự thay đổi khác biệt so với lô chứng và so với trước khi uống thuốc ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của cao đặc Testin CT3 lên cấu trúc đại thể và vi thể gan, thận thỏ:

Giải phẫu đại thể và vi thể gan thận là chỉ số bắt buộc khi đánh giá độc tính bán trường diễn theo hướng dẫn của WHO [83]. Hơn nữa xét nghiệm vi thể là tiêu chuẩn vàng để đánh giá tổn thương 2 cơ quan chính chịu trách nhiệm chuyển hóa và thải trừ thuốc.

Kết quả nghiên cứu hình thái đại thể gan, lách, thận của thỏ ở cả 2 lô dùng cao đặc Testin CT3 thấy kích thước, màu sắc, mật độ nhu mô không có biểu hiện gì khác biệt so với lô chứng.

Vi thể: Nghiên cứu cấu trúc vi thể thấy thùy gan và bè gan không thay đổi về cấu trúc. Tế bào gan không có tổn thương thoái hóa. Tĩnh mạch trung tâm không giãn, không xung huyết. Khoang cửa không có xâm nhập viêm. Như vậy, cao đặc Testin CT3 không ảnh hưởng đến chức năng gan. Cấu trúc vùng vỏ, vùng tủy, cầu thận bình thường, không thấy hình ảnh tổn thương. Vỏ lách nguyên vẹn, các nang lympho rõ, trong đó có các động mạch bút lông, các xoang lách chứa hồng cầu và một số đại thực bào. Qua đó ta thấy, cao đặc Testin CT3 ở cả 2 liều không ảnh hưởng đến chức năng và hình thái gan, thận thỏ.

Như vậy, 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.

Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả khi nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao đặc Testin của Mai Ngọc Tú [37] và một số các vị

thuốc riêng rẽ trong bài thuốc Testin CT3: Nghiên cứu của Dương Thị Ly Hương về Bá bệnh [18].

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

Những hướng dẫn về nghiên cứu độc tính di truyền đã được công bố bởi Ủy ban Châu Âu (EEC, 1987), Nhật Bản (1989) và Mỹ (1993). Lúc đầu những hướng dẫn này chỉ được áp dụng trong phạm vi Châu Âu, Nhật Bản và Mỹ. Tuy nhiên sau đó đã được nhân rộng ra và phổ biến trên toàn thế giới. Năm 1994, OECD đã tập hợp lại và đưa ra một hướng dẫn về nghiên cứu độc tính trên di truyền (OECD guideline 471) [65], [75]. Cho đến nay các nghiên cứu về độc tính di truyền của thuốc mới có nguồn gốc hóa học hay dược liệu đều được áp dụng theo các phương pháp này.

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

Tinh hoàn là cơ quan đảm nhận chức năng tạo ra tinh trùng và tiết vào máu những hormon sinh dục. Quá trình sinh tinh và tổng hợp hormon sinh dục xảy ra ở hai khoang có hình thái và chức năng khác nhau, đó là khoang ống (bao gồm các ống sinh tinh) và khoang kẽ nằm giữa các ống sinh tinh. Mặc dù cách biệt về giải phẫu nhưng cả hai khoang này liên kết chặt chẽ với nhau. Chức năng của tinh hoàn cũng là chức năng của các khoang này.

Quá trình sản sinh tinh trùng chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như: nhiệt độ, hóa chất,... Do vậy, cần xác định hình thái của tinh hoàn của cả những nhóm chúng để loại trừ những thay đổi không phải do tác động của thuốc.

Nhằm đánh giá tác dụng của cao đặc Testin CT3 một cách đầy đủ chúng tôi 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 chúng tôi 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 [13].

Dùng nước nhiệt độ cao gây tác hại cho tinh hoàn đã được các nhà khoa học nghiên cứu từ lâu như Setchell B.P và cộng sự [78], [78]. Tại Việt Nam cho đến nay đã có một vài công trình nào được công bố về việc dùng nhiệt gây tổn thương tinh hoàn.

Selchell BP và CS đã nghiên cứu trên chuột cống đực và ghi nhận rằng chuột cống trưởng thành được nhúng tinh hoàn một lần vào nước có nhiệt độ 43⁰C và 45⁰C và theo dõi sau 35 ngày thì thấy nhóm tiếp xúc nhiệt độ 45⁰C có tổn thương tinh hoàn nặng nề và sự tổn thương này theo dõi đến 182 ngày vẫn không thấy biểu hiện tự hồi phục [77], [78]. Bowler K và CS đã dùng nhiệt tác động nhắc lại nhiều lần vào tinh hoàn chuột và nhận thấy tinh hoàn bị tổn thương, theo dõi trong 70 ngày vẫn không có biểu hiện hồi phục [49]. Nhóm tiếp xúc nhiệt độ 43⁰C có biểu hiện tự hồi phục sau 35 ngày [77]. Xuất phát từ những vấn đề trên tác giả sử dụng mô hình này để gây tổn thương tinh hoàn.

Tuy nhiên do điều kiện thí nghiệm ở Việt Nam hiện nay chưa thể đảm bảo chuẩn như ở nước ngoài nên chúng tôi phải kiểm chứng thí nghiệm gây tổn thương tinh hoàn ở cả hai nhiệt độ 43⁰C và 45⁰ C bằng cách cố định chuột vào giá và nhúng tinh hoàn một lần kéo dài trong 30 phút và theo dõi trong 35 ngày theo mô hình của Setchell B.P và cs [77]. Kết quả kiểm chứng cho thấy, nhúng tinh hoàn vào nước

45°C cũng cho kết quả tương tự như của Setchell B.P và CS. Do vậy chúng tôi đã chọn mô hình gây tổn thương tinh hoàn bằng nước nóng ở nhiệt độ 43°C

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 [77].

Trên cơ sở kết quả thu được, chúng tôi 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. Chúng tôi 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. Đối với lô gây tổn thương tinh hoàn: 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.

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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO**TIẾNG VIỆT**

1. Trần Quán Anh, Nguyễn Bửu Triều (2009), *Bệnh học giới tính nam*, NXB Y học.
2. Bộ môn Dược liệu, Đại học Dược Hà Nội (2006), *Bài giảng Dược liệu*, NXB Y học, tập 1 và 2.
3. Bộ môn Dược học cổ truyền, Đại học Dược Hà Nội (2004), *Bài giảng Dược học cổ truyền*, NXB Y học.
4. Bộ môn Y học cổ truyền dân tộc, Đại học Y Hà Nội (2006), *Y học cổ truyền*, NXB Y học.
5. Bộ Y tế (2007), Quyết định số 01/2007/QĐ-BYT về việc ban hành “quy định về thử thuốc trên lâm sàng”.
6. Bộ Y tế (2007), *Dược điển Việt Nam IV*, NXB Y học, Hà Nội
7. Trịnh Bình (2004), “Hệ sinh dục nam”, *Mô học*, NXB Y học, tr. 201 – 211.
8. Trần Thị Trung Chiến (2006), “Hệ sinh sản”, *Mô học*, NXB Quân đội nhân dân, tr. 293-350.
9. Trần Bích Côn (2005), “Chứng can đởm thấp nhiệt”, *Chẩn đoán phân biệt chứng hậu trong đông y*, Nguyễn Thiên Quyển tuyển dịch từ tài liệu của Viện nghiên cứu Trung y, NXB Văn hóa dân tộc, tr. 636-41.
10. Hoàng Việt Dũng (2014), *Nghiên cứu tác dụng tăng cường chức năng sinh dục nam của OS35 trên chuột cống đực thực nghiệm*, Khóa luận tốt nghiệp dược sĩ, Trường Đại học Dược Hà Nội.
11. Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, NXB Y học.
12. Đỗ Trung Đàm (2001), Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm. *Tạp chí Dược học*, 3, 8-9
13. Phạm Thị Minh Đức (2005), “Sinh lý sinh sản nam”, *Sinh lý học tập 2*, NXB Y học, tr.119
14. Frank H. Netter (2004), *Atlas giải phẫu người*, NXB Y học, p. 389-391

15. Vương Tiến Hòa (2012), *Bệnh học nam giới với sinh sản và tình dục*, NXB Y học
16. Trình Thiệu Hoàn (2005), “Chứng can kinh thấp nhiệt”, *Chẩn đoán phân biệt chứng hậu trong đông y*, Nguyễn Thiên Quyển tuyển dịch từ tài liệu của Viện Nghiên cứu Trung y, NXB Văn hóa dân tộc, tr. 338-45.
17. Vương Dục Học (2005), “Chứng tỳ thận dương hư”, *Chẩn đoán phân biệt chứng hậu trong đông y*, Nguyễn Thiên Quyển tuyển dịch từ tài liệu của Viện Nghiên cứu Trung y, NXB Văn hóa dân tộc, tr. 533-40.
18. Dương Thị Ly Hương (2012), *Nghiên cứu tác dụng lên chức năng sinh sản và độc tính của rễ Bá bệnh thu hái tại Việt Nam trên động vật thực nghiệm*, Luận án tiến sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
19. Phạm Minh Huệ (2012), “Nghiên cứu hình thái cấu trúc, siêu cấu trúc tinh trùng ở mào tinh của bệnh nhân vô tinh và sự biến đổi trong môi trường nuôi cấy *in vitro*”, Luận văn Thạc sĩ Y học, Học Viện Quân Y.
20. Đỗ Kính (2002), *Mô học*, NXB Y học
21. Đỗ Kính (2008), *Phôi thai học (Thực nghiệm và ứng dụng lâm sàng)*, NXB Y học.
22. Hồ Quốc Khánh (2005), “Chứng khí huyết đều hư”, *Chẩn đoán phân biệt chứng hậu trong đông y*, Nguyễn Thiên Quyển tuyển dịch từ tài liệu của Viện nghiên cứu Trung y, NXB Văn hóa dân tộc, tr. 106-13.
23. Nguyễn Thế Khánh, Phạm Tử Dương (2005), *Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng*, NXB Y học
24. Vương Khánh Kỳ (2006), *Chẩn đoán phân biệt chứng hậu trong đông y*, Nguyễn Thiên Quyển tuyển dịch từ tài liệu của Viện nghiên cứu Trung Y, NXB Văn Hóa dân tộc.
25. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học
26. Nguyễn Thành Như (2013), *Nam khoa lâm sàng*, NXB Tổng hợp Thành phố Hồ Chí Minh.
27. Hải Thượng Lãn Ông (2001), *Hải Thượng Lãn Ông Y tông tâm lĩnh*, Tái bản nguyên bản, NXB Y học, tập 1-2.

28. Nguyễn Quang (2012). *Bệnh học nam khoa cơ bản*, NXB Y học
29. Nguyễn Quang Quyền (1999), *Giải phẫu học tập 2*, Cơ quan sinh dục nam, NXB Y học, 239-243.
30. Chu Kiến Quý (2005), “Chứng can khí uất kết”, *Chẩn đoán phân biệt chứng hậu trong đông y*, Nguyễn Thiên Quyển tuyển dịch từ tài liệu của Viện Nghiên cứu Trung y, NXB Văn hóa dân tộc, tr. 302-07.
31. Nguyễn Đình Tảo (2012), *Một số chuyên đề trong điều trị vô sinh*, Nhà xuất bản Y học
32. Diêm Hồng Thần, Hứa Vĩnh Quý (2005), “Chứng thấp nhiệt”, *Chẩn đoán phân biệt chứng hậu trong đông y*, Nguyễn Thiên Quyển tuyển dịch từ tài liệu của Viện Nghiên cứu Trung Y, NXB Văn hóa dân tộc, tr. 175-82.
33. Cao Ngọc Thành, Phạm Chí Kông (2011), *Nam học và vô sinh nam*, Nhà xuất bản Đại học Huế.
34. Đoàn Minh Thụy (2010), *Nghiên cứu tính an toàn và hiệu quả của viên nang Hồi xuân hoàn trong điều trị bệnh nhân bị suy giảm tình trùng thể thận dương hư*, Luận án tiến sỹ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
35. Trần Mỹ Tiên, Nguyễn Mai Thanh Tâm và cs (2012), “Nghiên cứu tác dụng hướng sinh dục nam của Ba kích”, *Chuyên đề Y học cổ truyền, Tạp chí Y học TP HCM*, 16(1)
36. Phan Hoài Trung (2004), “Nghiên cứu tính an toàn và tác dụng của bài thuốc “Sinh tinh thang” đến số lượng, chất lượng tinh trùng”, Luận án tiến sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
37. Mai Ngọc Tú (2014), *Nghiên cứu tác dụng trên chức năng sinh sản và độc tính của cao đặc bài thuốc Testin trên chuột thực nghiệm*, Luận văn thạc sỹ dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội.
38. Nguyễn Quang Tuấn (2013), *Suy sinh dục nam khởi phát muộn và vai trò của testosterone trong bệnh tim mạch chuyển hóa*, NXB Y học, Hà Nội.
39. Vũ Đình Vinh (2001), *Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hóa*, NXB Y học, 115-287

40. Viện dược liệu (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, tập 1, tr. 101-106, 11-118, 362-366, 529-531, 833-840, 842-846, 946-950, 1092-1095.
41. Viện dược liệu (2011), *Công trình nghiên cứu khoa học Viện Dược liệu 2006-2011*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội
42. Viện Y học cổ truyền quân đội (2002), “Chứng bệnh vô sinh do nam giới”, *Kết hợp đông, tây y chữa một số bệnh khó*, NXB Y học, tr. 27-87
43. Viện Y học Trung y Bắc Kinh (Dương Hữu Nam, Dương Trọng Hiếu lược dịch) (1994), *Phương tễ học giảng nghĩa*, NXB Y học (2002). tr. 126, 173, 284, 294, 287, 378, 456.

TIẾNG ANH

44. American Society for Reproductive Medicine (2015), “Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion”, *Fertil Steril*, 103(3), pp.18-25.
45. Anne M. Jequier (2000), “The Anatomy and Physiology of the Male Genital Tract”, *Male Infertility A Guide for The Clinician*, Blackwell Science
46. Ang H.H (1997), “*Eurycoma longifolia* Jack enhances libido in sexually experienced male rats”, *Experimental Animals*, 46(4), pp.287-290
47. Ang H.H, Ikeda S., Gan E.K (2001), “Evaluation of the Potency activity of aphrodisiac in *Eurycoma longifolia* Jack”, *Phytotherapy Research*, 15, pp.435-436.
48. Ang H.H, Sim M.k (1998), “Aphrodisiac effects of *Eurycoma longifolia* root in non-copulator male rats”, *Fitoterapia*, 69, pp.445-447.
49. Bowler K (1972), “The effect of repeated applications of heat on spermatogenesis in the rat: a histological study”, *Journal of Reproduction and Fertility*, 28, pp. 325-333.
50. Chan KL, et al (2009), “The effect of *Eurycoma longifolia* on sperm quality of male rats”, *Nat Prod Commun*, 4(10), pp.1331-6.
51. Chen J., et al (2000), “Effect of plant – extract osthole on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue in vitro”, *Journal of Urology*, 163(6), 1975-1980.

52. Christiaan F Hoogendijk, Thinus F Kruger, Roelof Menkveld (2007), "Anatomy and molecular morphology of the spermatozoon", *Male Infertility Diagnosis and Treatment*, Informa UK.
53. Chumpol Pholpramool (1995), "Hormon control of testis", *Workshop in Andrology*, pp.15-22.
54. Crosignani P.G (1997), "Final agreement", *Ovarian hyperstimulation syndrome*. Serono Fertility Series Volume 1. pp 83-88.
55. European Association of Urology (2015), *Guidelines on Male infertility*
56. Frida L, et al (2008), "In vitro and in vivo effects of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) leaf aqueous and ethanol extracts on primed-oestrogenized rat uterine muscle", *African journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 5(1), pp.79-91
57. Gauthaman K., Ganesan A. P, Prasad R.N (2003), Sexual effects of puncturevine (*Tribulus terrestris*) extract (protodioscin): an evaluation using a rat model, *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 9, 257-265.
58. Gudeloglu A, Brahmabhatt J, Parekattil S (2015), "Definitions and Epidemiology of Unexplained Male Infertility", *Unexplained infertility*, 1, pp.7-12.
59. Guyton AC (2006). Reproductive and Hormonal Functions of the male (and Function of the Pineal Gland), *Textbook of Medical Physiology*, Saunders Elsevier, pp.996-1010.
60. Guyton AC, Hall JE (2011), "Reproductive and Hormonal Functions of the Male", *Medical Physiology*, 12, pp.973-986
61. Goncaves J, Lavinha J (1998). "Y chromosome and male infertility", *Acta – Med Port*, 11(4), pp.365-372.
62. Hochschild Z.F, et al (2009), "International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology", *Fertil Steril*, 92(5), pp.1520-4
63. Hinman F. and P.H. Stempen (1993), *Atlas of urosurgical anatomy*, WB Saunders Philadelphia, pp.335-360.

64. Huhtaniemi I (1999), Endocrine Regulation of Male Reproduction, *Male Reproductive Function*, Kluwer Academic Publisher, USA, pp.1-18.
65. ICH Harmonised Tripartite Guideline (1995), *Guideline on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Test for Pharmaceuticals S2A*, Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process on 19 July by the ICH Steering Committee.
66. Irvine D.S (2002), *Male infertility: Causes and management*, Medical progress.
67. Junquera L.C, Carneiro J. (2005), “The male reproduction system”, Basic histology, *McGraw-hill*, pp. 418 - 434.
68. Kruger T.F., Coetzee K. (1998), “Predicting treatment success for male infertility”, *Fertility and reproductive medicine*, pp.465-474.
69. Larry I. Lipshultz, Stuartd S. Howards, Craig S. Niederberger (2009), “Male hypothalamic – pituitary – gonadal axis”, *Infertility in the male*, 4rd Edition, Cambridge University press, pp.15.
70. Luiz Carlos Junqueira, JosÃ Carneiro (2005), *Basic Histology text & Atlas*, New York
71. Mortimer D (2010), “A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology”, *Cambridge University press*.
72. Nieschlag E., Simoni M, Gromoll J, Weibauer GF (1999), Role of FSH in the regulation of spermatogenesis: clinical aspects, *Clinical Endocrinology*, 51, pp.139-146.
73. OECD (2002), *Drug Safety Evaluation I: Acute and Subchronic toxicity assesment*; USA Academy Press.
74. OECD (2015), *Reproduction/Developmental Toxicity screening test*, Guideline for testing of Chemicals
75. OECD 471 (1997), *Guideline for the testing of chemical: Bacterial Reverse Mutation Test*
76. Rajasingam S. Jeyendran (2003), *Sperm Collection and Processing Methods*, Cambridge University press.

77. Setchell B.P et al. (1999), “Effects of heating on rat testis with suppressed spermatogenesis”, *Journal of Reproduction and fertility*, Abstract series, pp. 23-30
78. Setchell B.P et al. (2001), “Reduction of long-term effects of local heating of the testis by treatment of rats with a GnRH agonist and anti-androgen”, *Journals of Reproduction and fertility*, 122, pp. 255-263
79. Setchell B.P, et al (2002), “Effect of local heating of rat testes after suppression of spermatogenesis by pretreatment with a GnRH agonist and an anti-androgen”, *Reproduction*, 124, pp. 133-140.
80. Sigman M, Suart S. Howards, Larry I. Lipshultz (2009), “Office evaluation of the subfertile male”, *Infertility in the male*, 4, pp.153-176.
81. Speroff L, A.Fritz M (2005), “Hormon Biosynthesis, Metabolism and mechanism of Action”, *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*, Lippincott William & Wikins, USA, pp.25-96.
82. Weinbauer GH, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E (2010), “Physiology of Testicular Function”, *Andrology – Male Reproductive Health and Dysfunction*, 3rd Edition, Spinger, London, pp.11-55.
83. World Health Organization (2000), *Working group on the safety and efficacy of herbal medicines*, Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization.
84. World Health Organization (2000), *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*, Geneva, World Health Organization.
85. Yuan J., et al (2004), Effect of osthol on androgen level and nitrit oxide synthase acitivity in castrate rats, *Zhong Yao Cai*, 2 (7), pp.504-506
86. Zanolli P., Zavatti M., et al (2009), Influence of Eurycoma longifolia on the copulatory activity of sexually sluggish and impotent male rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 126, pp.308-313.