

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG TĂNG CƯỜNG CHỨC NĂNG SINH SẢN CỦA CHẾ PHẨM FERTIL PRO FOR MEN TRÊN THỎ ĐỰC

Nguyễn Hoàng Ngân, Nguyễn Thanh Hà Tuấn

Học viện Quân y

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá tác dụng tăng cường chức năng sinh sản của viên nén bao phim Fertil Pro for men trên thỏ đực bị suy giảm sinh sản bằng Fluconazol. **Phương pháp:** Thỏ gây suy giảm sinh sản bằng Fluconazol được cho uống Fertil Pro for men trong 60 ngày. Dùng âm đạo giả lấy tinh của thỏ để đánh giá số lượng và chất lượng tinh trùng tại các thời điểm ban đầu, sau 30 và sau 60 ngày uống thuốc. Sau 60 ngày dùng thuốc, lấy tinh dịch thỏ đực thụ tinh cho thỏ cái, đánh giá số thỏ cái thụ thai và số con sinh ra ở mỗi lứa đẻ. Các chỉ số gồm thời gian tiền nhảy cái của thỏ đực, nồng độ testosterone máu, và mô bệnh học tinh hoàn cũng được đánh giá. **Kết quả:** Fertil Pro for men liều 160 mg/kg/ngày và 320 mg/kg/ngày đã làm rút ngắn thời gian tiền nhảy cái của thỏ đực, làm tăng số lượng (tăng thể tích tinh dịch, mật độ tinh trùng, tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh) và chất lượng tinh trùng (tăng các tỉ lệ tinh trùng di động, giảm tỉ lệ tinh trùng chết và tinh trùng có hình thái bất thường), tăng nồng độ testosterone máu, tăng số thỏ cái thụ thai và số con sinh ra ở mỗi lứa đẻ, và cải thiện mô bệnh học tinh hoàn. **Kết luận:** Fertil Pro for men có tác dụng rõ rệt làm tăng số lượng, chất lượng tinh trùng, tăng khả năng thụ thai và một số chỉ số khác đánh giá chức năng sinh sản khi đánh giá trên thỏ đực bị suy giảm sinh sản bằng Fluconazol.

Từ khóa: Fertil Pro for men, tăng cường sinh sản, tinh trùng, thỏ đực.

RESEARCH EFFECTIVELY IMPROVING MALE RABBIT'S REPRODUCTIVE FUNCTION OF "FERTIL PRO FOR MEN"

Abstract

Objectives: To evaluate the fertility enhancing effect of Fertil Pro for men film-coated tablets in male rabbits with reproductive impairment by fluconazole.. **Methods:** Fluconazole-induced reproductive impairment Rabbits were given Fertil Pro for men orally for 60 days. Using artificial vagina to collect semen from rabbits to evaluate sperm count and quality at beginning, after 30 and 60 days of taking the drug. After 60 days of using the drug, collect male rabbit semen to fertilize female rabbits, evaluate the number of pregnant rabbits and the number of offspring born in each litter. Indicators including pre-jump time of male rabbits, serum testosterone levels, and testicular histopathology were also evaluated. **Results:** Fertil Pro for men at doses of 160 mg/kg/day and 320 mg/kg/day shortened the pre-jumping time of male rabbits, increased the quantity (increased semen volume, sperm density, total sperm count in one ejaculate) and sperm quality (increased percentages of motile sperm, decreased percentage of dead sperm and sperm with abnormal morphology), increased blood

*testosterone levels, increased number of pregnant rabbits and number of offspring per litter, and improved testicular histopathology. **Conclusion:** Fertil Pro for men has a significant effect on increasing count and quality of sperm, fertility and some other indicators of reproductive function when evaluated on Fluconazole-induced reproductive impairment Rabbits.*

Keywords: *Fertil Pro for men, fertility enhancing, sperm, male rabbit.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vô sinh, hiếm muộn ở nam có nhiều nguyên nhân, thường gặp nhất là suy giảm tinh trùng (SGTT) [1]. Y học cổ truyền điều trị suy giảm tinh trùng và một số rối loạn chức năng sinh sản khác bằng các bài thuốc vị thuốc bổ can thận, bổ thận dương, dưỡng thận âm...đã được chứng minh có hiệu quả lâu dài và an toàn, ít tác dụng phụ [2], [3]. Bào chế hiện đại y học cổ truyền giúp tạo ra các chế phẩm được kiểm soát tốt về chất lượng, tiện lợi trong bảo quản, sử dụng, đang là xu thế tất yếu hiện nay và được các bác sĩ, dược sĩ cũng như bệnh nhân quan tâm. Viên nén bao phim Fertil Pro for men là dạng bào chế hiện đại của bài thuốc “bổ thận tăng tinh” với 8 vị dược liệu gồm Nhân sâm đại bổ khí, Lộc Nhung bổ huyết, đại bổ dương, Ba kích, Sâm cau, Tỏa dương bổ thận dương, Bá bệnh (Tongkat Ali) bổ can thận, cùng Kỷ tử, Thục địa là vị thuốc bổ âm, tư dưỡng can thận âm, trợ dương và điều hòa âm dương của bài thuốc. Các vị thuốc sử dụng trong bào chế viên nén bao phim Fertil Pro for men hầu hết đã được đánh giá có thành phần hoạt chất và

tác dụng tốt cho quá trình sinh tinh, nâng cao số lượng, chất lượng tinh trùng, điều trị các rối loạn sinh sản, sinh dục nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng tăng cường chức năng sinh sản (tác dụng làm tăng số lượng, chất lượng tinh trùng, tăng khả năng làm thụ thai, và các chỉ tiêu khác) của viên nén bao phim Fertil Pro for men trên thỏ đực bị suy giảm sinh sản bằng Fluconazol.

II. CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chất liệu, đối tượng và thiết bị nghiên cứu

2.1.1. Thuốc nghiên cứu

Viên nén bao phim **Fertil Pro for men** sản xuất tại công ty cổ phần dược phẩm Phú Tín, đạt tiêu chuẩn cơ sở. Chế phẩm được bào chế từ bài thuốc nghiệm phương “bổ thận tăng tinh”, gồm: Nhân sâm (*Panax ginseng* C.A. Mey) 10g, Lộc Nhung (*Cornu Cervi Pantotrichum*) 4g, Ba kích (*Morinda officinalis* How) 12g, Sâm cau (*Curculigo orchoides*) 12g, Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack) 12g, Kỷ tử (*Fructus Lycii*) 15g, Thục địa (*Rehmannia glutinosa* (Gaertn.)

Libosch) 15g, Tỏa dương (*Balanophora spp*) 16g. Mỗi viên nén có chứa 1000 mg cao dược liệu. Theo tính toán hàm lượng dược chất từ bài thuốc được đưa vào trong mỗi viên thuốc thành phẩm, ước tính liều sử dụng trên người là 2viên/ người/ ngày, hay 40mg/kg/ngày. Quy đổi liều tương đương từ người sang trên thỏ (hệ số gấp 4 lần) là 160mg/ kg/ ngày. [4].

2.1.2. Đối tượng nghiên cứu

Thỏ chủng New Zealand, cả hai giống, trưởng thành, khỏe mạnh, cân nặng 2,3- 2,7kg, số lượng gồm 32 thỏ đực và 64 thỏ cái, được cung cấp bởi trại nuôi thỏ Ba Vì, nuôi dưỡng theo tiêu chuẩn động vật nghiên cứu.

2.1.3. Thiết bị, hóa chất

2.1.3.1. Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

- Máy phân tích tinh trùng tự động QwikCheck™ Gold- Isarel kèm theo E- capillary.

- Âm đạo giả sử dụng để lấy tinh ở thỏ. Súng bắn tinh dùng để thụ tinh nhân tạo cho thỏ.

- Kính hiển vi huỳnh quang Nikon Eclipse Ti2 (Nhật Bản).

- Máy nhuộm tiêu bản tự động Leica Autostainer XL-ST5010, Đức.

- Máy đọc đĩa ELISA Chromate 4300, Awareness Technology, Mỹ.

- Tủ ấm Memmert INB 500; Memmert- Đức và một số dụng cụ, máy móc khác.

2.1.3.2. Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

- Fluconazol đạt tiêu chuẩn USP 40; Synergene- Ấn Độ.

- Dung dịch Papanicolaou's solution 2a Orange G solution (OG6), Merck KGaA, Đức.

- Giấy đo pH (pH- indicator strips (pH 6,5 - 10,0, Special Indicator), Merck- Đức).

- Thuốc tiêm testosteron propionat (Tai Yu Chemical & Pharma Co.,Ltd., Trung Quốc).

- Dung dịch tiêm cloprostenol 250µg/mL (Hanprost), lọ 5mL và Dung dịch gonadorelin acetat 100µg/mL (Gonadorelin), lọ 5 mL; Công ty trách nhiệm hữu hạn Dược Hanvet.

- Bộ kit ELISA EliKine™ Testosterone ELISA Kit, Abbkine, và một số hóa chất khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tiến hành nghiên cứu trên thỏ trưởng thành, khỏe mạnh, cả hai giống. Thỏ đực được huấn luyện, làm quen với lấy tinh bằng âm đạo giả với tần suất 2 lần/tuần trong 2 tuần. Âm đạo giả có cấu tạo gồm phần thân là ống rỗng hình trụ, bằng nhựa tổng hợp, cao khoảng 6 cm, đường kính khoảng 5 cm, mặt trên rỗng, mặt dưới có 2 lỗ, một lỗ ở chính giữa đường kính 1,5 cm (để gắn với ống thu tinh) và một lỗ nhỏ điều chỉnh mức nước làm âm âm đạo giả. Quả bóng cao su cắt thùng đáy, lót mặt

trong của thân âm đạo giả, có tác dụng giữ nước đã làm ấm. Ống thu tinh là ống thủy tinh đường kính khoảng 2 cm, được chia vạch. Trùm phần đáy của quả bóng cao su vào mặt trên thân âm đạo giả, cố định bằng dây chun. Đưa phần đầu quả bóng cao su qua lỗ chính giữa phần đáy thân âm đạo giả. Đổ



nước (đã điều chỉnh tới nhiệt độ 42- 45⁰C) qua lỗ ở phần đáy vào giữa lớp cao su và mặt trong của thân âm đạo giả. Cố định phần đầu quả bóng cao su để giữ nước trong thân âm đạo giả. Lắp ống thu tinh ở bên dưới thân âm đạo giả (hình 1).



Hình 1. Dụng cụ lấy tinh (âm đạo giả)

Đưa thỏ cái vào chuồng của thỏ đực cần lấy tinh, khi thỏ đực nhảy lên lưng thỏ cái để thực hiện hành vi giao phối, đưa âm đạo giả sao cho dương vật thỏ đực tiếp xúc với bề mặt cao su được làm ấm của âm đạo giả. Khi dương vật thỏ đực tiếp xúc với bề mặt ấm của âm đạo giả, thỏ đực sẽ xuất tinh.

Thỏ đực sau khi hoàn thành giai đoạn tập làm quen với lấy tinh sẽ được chia ngẫu nhiên thành 4 lô nghiên cứu, mỗi lô 8 con.

+ Lô 1 (chứng sinh lý): uống natri carboxymethyl cellulose

2,0% (dung môi pha FLZ) + uống nước cất (dung môi pha thuốc).

+ Lô 2 (lô mô hình): uống FLZ 50mg/kg/ngày + uống nước cất.

+ Lô 3 (lô trị 1): uống FLZ 50mg/kg/ngày + uống Fertil Pro for men 160mg/kg/ngày.

+ Lô 4 (lô trị 2): uống FLZ 50mg/kg/ngày + uống Fertil Pro for men liều 320mg/kg/ngày.

Thỏ đực cho uống FLZ vào buổi sáng, uống thuốc nghiên cứu vào buổi chiều trong 30 ngày đầu sau đó uống thuốc nghiên cứu 01 lần/ngày vào buổi sáng trong 30 ngày tiếp theo.

Các chỉ số đánh giá bao gồm:

- Tình trạng chung của thỏ (lông, mắt, phân...), các dấu hiệu độc tính.

- Trọng lượng cơ thể: ở thời điểm ban đầu; sau 30 và sau 60 ngày uống thuốc nghiên cứu.

- Lấy tinh dịch: Thỏ được lấy tinh dịch vào buổi sáng như mô tả ở trên tại thời điểm ban đầu; sau 30 và sau 60 ngày uống thuốc nghiên cứu.

- Tính thời gian tiền nhảy cái của thỏ đực, là thời gian (giờ) kể từ khi thả thỏ cái vào chuồng thỏ đực đến khi thỏ đực có động tác nhảy lên lưng con cái để thực hiện hành vi giao phối.

- Tinh dịch sau khi lấy được phân tích đánh giá ngay thể tích tinh dịch (đo trực tiếp bằng ống thu tinh) và pH tinh dịch (xác định bằng giấy đo pH). Sau đó tinh dịch được chuyển ngay đến phòng thí nghiệm để phân tích các chỉ tiêu:

+ Mật độ tinh trùng, các phần trăm tinh trùng di động và không di động, được phân tích bằng máy phân tích tinh trùng tự động QwikCheck™ Gold- Isarel kèm theo E- capillary.

+ Tổng số tinh trùng/một lần xuất tinh = mật độ tinh trùng x thể tích tinh dịch.

+ % tinh trùng chết được đánh giá bằng vật kính 100X trên kính hiển vi huỳnh quang Nikon Eclipse Ti2 sau khi nhuộm eosin- nigrosin.

+ % tinh trùng có hình thái bất thường: nhuộm Papanicolaou trên máy nhuộm tự động Leica

Autostainer XL- ST5010 và đánh giá trên kính hiển vi huỳnh quang Nikon Eclipse Ti2 ở vật kính 100X.

Quy trình nhuộm đánh giá sự sống - chết và hình thái của tinh trùng được thực hiện theo hướng dẫn của WHO [5].

- Nồng độ TES huyết thanh: Phân tích nồng độ TES huyết thanh bằng phương pháp ELISA, sử dụng kit ELISA EliKine™ Testosterone ELISA Kit, Abbkine.

- Đánh giá tỉ lệ thụ thai và số con sinh ra của thỏ cái: Ở thời điểm sau 60 ngày, các mẫu tinh dịch được pha loãng với dung dịch đệm Tris tới mật độ khoảng 20×10^6 (tinh trùng/mL). Thỏ cái được tiêm bắp 0,8mL dung dịch cloprostenol 250µg/mL trước khi thụ tinh 52 giờ. Thụ tinh cho thỏ cái bằng súng bắn tinh với lượng 0,5mL/con. Ngay sau khi thụ tinh, tiêm bắp 0,2mL dung dịch gonadorelin acetat 100 µg/mL để gây rụng trứng. Tinh dịch của mỗi thỏ đực được thụ tinh cho 2 thỏ cái. Xác định thỏ cái mang thai sau 14 ngày thụ tinh. Theo dõi thỏ cái đến khi đẻ, tính tỉ lệ thụ thai và số con/lứa đẻ.

- Mô học tinh hoàn: Kết thúc thí nghiệm, lấy tinh hoàn, làm tiêu bản nhuộm HE (hematoxylin và eosin) và đánh giá hình ảnh vi thể của 50% số tinh hoàn.

2.3. Xử lý số liệu

So sánh sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các lô sử dụng One-

way ANOVA và Post Hoc least-significant differences (LSD) test với trường hợp phương sai đồng nhất, sử dụng One-way ANOVA và Dunnett’s T3 test với trường hợp phương sai không đồng nhất. So sánh sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các thời điểm nghiên cứu trong cùng một lô sử dụng phép so sánh theo cặp (Paired sample T test). So sánh tỉ lệ thụ thai giữa các lô sử dụng Chi Square tests. Các kết quả

xử lý thống kê được tính toán trên phần mềm IBM SPSS Statistics 20.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả đánh giá thể trạng chung, trọng lượng cơ thể và thời gian tiền nhảy cái của thỏ đực

Các thỏ khỏe mạnh, ăn uống bình thường, không có triệu chứng bất thường.

Bảng 1. Trọng lượng thỏ và thời gian tiền nhảy cái của thỏ đực tại các thời điểm nghiên cứu

Lô nghiên cứu		Thời điểm nghiên cứu			Pgiữa các thời điểm
		Ban đầu (a)	Sau 30 ngày (b)	Sau 60 ngày (c)	
Trọng lượng thỏ (kg; $\bar{X} \pm SD$)					
Lô chứng (n = 8)	(1)	2,51 ± 0,21	2,68 ± 0,19	2,80 ± 0,20	$p_{b,ca} < 0,01$
Lô mô hình (n = 8)	(2)	2,55 ± 0,19	2,72 ± 0,17	2,83 ± 0,16	$p_{b,ca} < 0,01$
Lô trị 1 (n = 8)	(3)	2,53 ± 0,18	2,70 ± 0,18	2,85 ± 0,19	$p_{b,ca} < 0,01$
Lô trị 2 (n = 8)	(4)	2,54 ± 0,16	2,71 ± 0,15	2,84 ± 0,18	$p_{b,ca} < 0,01$
Pgiữa các lô		> 0,05	> 0,05	> 0,05	-
Thời gian tiền nhảy cái (giờ; $\bar{X} \pm SD$)					
Lô chứng (n = 8)	(1)	11,54 ± 6,24	13,12±6,46	13,62 ± 6,15	> 0,05
Lô mô hình (n = 8)	(2)	11,28 ± 5,85	35,41±12,93	36,20±14,57	$p_{b,ca} < 0,001$
Lô trị 1 (n = 8)	(3)	13,42 ± 6,18	14,50 ± 7,64	15,75 ± 7,11	> 0,05
Lô trị 2 (n = 8)	(4)	13,36 ± 6,03	13,94 ± 5,12	10,36 ± 6,83	> 0,05
Pgiữa các lô		> 0,05	$p_{2-1,34} < 0,001$	$p_{2-1,34} < 0,001$	-

Nhận xét: Trọng lượng thỏ ở các lô nghiên cứu tăng đều ($p_{b,ca} < 0,01$), không có sự khác biệt có ý nghĩa về trọng lượng thỏ giữa các lô ở cùng một thời điểm nghiên cứu ($p > 0,05$). Thời gian phản ứng của thỏ đực ở lô mô hình có sự tăng sau 30 ngày và sau 60 ngày nghiên cứu khi so sánh với lô chứng và các lô

trị (các giá trị p đều $< 0,001$). Ở lô trị 2, tại thời điểm sau 60 ngày có sự giảm của thời gian phản ứng, tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa lô chứng và các lô trị với nhau ($p > 0,05$).

3.2. Kết quả đánh giá các chỉ số về số lượng và chất lượng tinh dịch

Bảng 2. Thể tích, pH tinh dịch và số lượng tinh trùng của các lô nghiên cứu

Lô nghiên cứu	Thời điểm nghiên cứu			p giữa các thời điểm
	Ban đầu (a)	Sau 30 ngày (b)	Sau 60 ngày (c)	
Thể tích tinh dịch (mL)				
Lô chứng (n = 8)	0,69 ± 0,18	0,70 ± 0,19	0,72 ± 0,16	> 0,05
Lô mô hình (n = 8)	0,70 ± 0,19	0,46 [▲] ± 0,14	0,51 [▲] ± 0,15	p _{b-ca} < 0,01
Lô trị 1 (n = 8)	0,71 ± 0,16	0,61 [*] ± 0,13	0,66 [*] ± 0,19	> 0,05
Lô trị 2 (n = 8)	0,72 ± 0,21	0,70 ^Δ ± 0,15	0,75 ^Δ ± 0,21	> 0,05
pH tinh dịch				
Lô chứng (n = 8)	7,19 ± 0,15	7,22 ± 0,16	7,21 ± 0,14	> 0,05
Lô mô hình (n = 8)	7,22 ± 0,19	7,24 ± 0,18	7,23 ± 0,15	> 0,05
Lô trị 1 (n = 8)	7,21 ± 0,16	7,23 ± 0,17	7,25 ± 0,19	> 0,05
Lô trị 2 (n = 8)	7,20 ± 0,17	7,21 ± 0,19	7,20 ± 0,16	> 0,05
Mật độ tinh trùng (TT x 10 ⁶ /mL)				
Lô chứng (n = 8)	224,71± 16,69	219,84±20,36	225,44 ± 16,83	> 0,05
Lô mô hình (n = 8)	226,24±15,38	159,12 [▲] ±16,45	164,45 [▲] ± 27,60	p _{b-ca} < 0,01
Lô trị 1 (n = 8)	225,92±19,21	176,56 ^{*¥} ±22,30	218,63 ^Δ ± 24,68	p _{b-a} < 0,01
Lô trị 2 (n = 8)	222,96±18,35	189,13 ^{Δ¥} ±22,37	224,76 ^Δ ± 9,00	P _{b-a} < 0,05
Tổng số tinh trùng trong 1 lần xuất tinh (TT x 10 ⁶)				
Lô chứng (n = 8)	155,05±18,94	153,89±42,32	162,32 ± 47,59	> 0,05
Lô mô hình (n = 8)	158,36±16,43	73,21 [▲] ±28,66	83,88 [▲] ± 18,09	p _{b-ca} < 0,01
Lô trị 1 (n = 8)	160,40±21,18	107,72 ^{Δ¥} ±26,88	144,31 ^Δ ± 27,62	p _{b-a} < 0,01
Lô trị 2 (n = 8)	160,53±17,59	132,39 ^Δ ± 22,80	168,59 ^Δ ± 48,18	P _{b-a} < 0,05

¥[▲]-p < 0,05 và p < 0,01 so với lô chứng; *^Δ-p < 0,05 và p < 0,01 so với lô mô hình.

Nhận xét: Khi so sánh giữa các lô: Tại thời điểm ban đầu, thể tích tinh dịch, mật độ tinh trùng và tổng số tinh trùng ở các lô không có sự khác biệt (p > 0,05). Tại thời điểm sau 30 ngày và sau 60 ngày, ở lô mô hình thể tích tinh dịch, mật độ tinh trùng và tổng số tinh trùng đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng (p < 0,01). Thể tích tinh dịch, mật độ tinh trùng và tổng số tinh trùng của hai lô dùng thuốc nghiên cứu cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình (p < 0,05 và p < 0,01), tuy nhiên tại thời điểm 30 ngày mật độ tinh trùng và tổng số tinh trùng

ở hai lô dùng thuốc còn thấp hơn so với ở lô chứng, tại thời điểm 60 ngày mật độ tinh trùng ở lô trị 1 còn thấp hơn so với ở lô chứng (p < 0,05). Không có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05) khi so sánh giữa các lô trị 1, lô trị 2.

- Khi so sánh giữa các thời điểm: Ở lô chứng, thể tích tinh dịch, mật độ tinh trùng và tổng số tinh trùng ở các thời điểm khác nhau không có ý nghĩa (p > 0,05). Ở lô mô hình, thể tích tinh dịch, mật độ tinh trùng và tổng số tinh trùng ở các thời điểm sau 30 ngày và sau 60 ngày giảm có ý nghĩa thống kê

so với thời điểm ban đầu ($p < 0,01$). Ở lô trị 1 và lô trị 2, mật độ tinh trùng và tổng số tinh trùng tại thời điểm sau 30 ngày giảm có ý nghĩa thống kê so với thời điểm ban đầu ($p < 0,01$ và $p < 0,05$, tương ứng); và tại thời điểm sau 60 ngày hồi phục về tương đương so

với thời điểm ban đầu ($p > 0,05$). Thê tích tinh dịch lô trị 1 và trị 2 không khác biệt tại các thời điểm nghiên cứu.

- pH tinh dịch không có sự khác biệt ($p > 0,05$) giữa các lô tại cùng một thời điểm nghiên cứu và trong cùng một lô tại các thời điểm khác nhau.

Bảng 3. Chất lượng tinh trùng ở các lô chuột nghiên cứu

Lô nghiên cứu	Thời điểm nghiên cứu			p giữa các thời điểm
	Ban đầu (a)	Sau 30 ngày (b)	Sau 60 ngày (c)	
Tỉ lệ tinh trùng di động (%)				
Lô chứng (n = 8)	31,24 ± 10,61	32,01 ± 9,89	31,85 ± 9,05	> 0,05
Lô mô hình (n = 8)	32,19 ± 9,85	24,62 [▲] ± 8,44	22,96 [▲] ± 9,97	p _{bca} < 0,01
Lô trị 1 (n = 8)	33,02 ± 11,16	33,15 ^Δ ± 10,21	33,81 ^Δ ± 11,08	> 0,05
Lô trị 2 (n = 8)	30,98 ± 9,83	33,42 ^Δ ± 11,76	36,74 ^Δ ± 12,15	> 0,05
Tỉ lệ tinh trùng di động tiến tới (%)				
Lô chứng (n = 8)	28,28 ± 6,96	29,09 ± 5,94	28,83 ± 8,11	> 0,05
Lô mô hình (n = 8)	29,05 ± 7,13	21,88 [▲] ± 6,12	20,33 [▲] ± 8,02	p _{bca} < 0,01
Lô trị 1 (n = 8)	29,95 ± 6,96	29,80 ^Δ ± 6,54	30,52 ^Δ ± 7,46	> 0,05
Lô trị 2 (n = 8)	27,96 ± 7,32	30,01 ^Δ ± 6,28	33,21 ^Δ ± 6,98	> 0,05
Tỉ lệ tinh trùng di động không tiến tới (%)				
Lô chứng (n = 8)	3,06 ± 0,45	3,09 ± 0,54	3,12 ± 0,37	> 0,05
Lô mô hình (n = 8)	3,14 ± 0,42	2,71 [¥] ± 0,35	2,63 [¥] ± 0,32	p _{bca} < 0,05
Lô trị 1 (n = 8)	3,07 ± 0,51	3,35 ^Δ ± 0,48	3,29 ^Δ ± 0,49	> 0,05
Lô trị 2 (n = 8)	3,10 ± 0,39	3,41 ^Δ ± 0,46	3,53 ^Δ ± 0,51	> 0,05
Tỉ lệ tinh trùng không di động (%)				
Lô chứng (n = 8)	68,76 ± 8,94	67,99 ± 9,85	68,15 ± 9,19	> 0,05
Lô mô hình (n = 8)	67,81 ± 9,12	75,38 [▲] ± 10,13	77,04 [▲] ± 9,94	p _{bca} < 0,01
Lô trị 1 (n = 8)	66,98 ± 7,65	66,85 ^Δ ± 8,94	66,19 ^Δ ± 8,93	> 0,05
Lô trị 2 (n = 8)	69,02 ± 7,42	66,58 ^Δ ± 9,16	63,26 ^Δ ± 9,32	> 0,05
Tỉ lệ tinh trùng chết (%)				
Lô chứng (n = 8)	26,96 ± 6,57	26,89 ± 8,18	27,05 ± 9,14	> 0,05
Lô mô hình (n = 8)	26,35 ± 6,49	36,84 [▲] ± 9,65	39,84 [▲] ± 9,47	p _{bca} < 0,01
Lô trị 1 (n = 8)	26,81 ± 8,12	24,98 ^Δ ± 6,89	23,75 ^Δ ± 7,91	> 0,05
Lô trị 2 (n = 8)	26,54 ± 7,63	22,66 ^Δ ± 6,32	21,82 ^Δ ± 6,69	> 0,05
Tỉ lệ tinh trùng hình thái bất thường (%)				
Lô chứng (n = 8)	16,68 ± 4,15	16,59 ± 4,96	17,14 ± 5,95	> 0,05
Lô mô hình (n = 8)	16,91 ± 3,86	26,65 [▲] ± 5,72	25,51 [▲] ± 6,48	p _{bca} < 0,01
Lô trị 1 (n = 8)	17,03 ± 5,74	19,76 ^Δ ± 6,97	18,10 ^Δ ± 6,93	> 0,05
Lô trị 2 (n = 8)	16,82 ± 5,18	18,02 ^Δ ± 4,46	14,89 ^Δ ± 6,01	> 0,05

▲ - $p < 0,01$ so với lô chứng; Δ - $p < 0,01$ so với lô mô hình.

Nhận xét: - Khi so sánh giữa các lô: Tại thời điểm ban đầu, các chỉ số đánh giá chất lượng tinh trùng ở các lô không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Tại thời điểm sau 30 ngày và sau 60 ngày: ở lô mô hình, các tỷ lệ tinh trùng di động đều thấp hơn ($p < 0,01$ và $p < 0,05$), tỷ lệ tinh trùng không di động, tinh trùng chết và tinh trùng bất thường đều cao hơn ($p < 0,01$) so với lô chứng; ở hai lô dùng thuốc nghiên cứu, các tỷ lệ tinh trùng di động đều cao hơn ($p < 0,01$), tỷ lệ tinh trùng không di động, tinh trùng chết và tinh trùng bất thường đều

thấp hơn so với lô mô hình ($p < 0,01$), và tương đương so với lô chứng ($p > 0,05$). Khi so sánh giữa các thời điểm: Ở lô chứng, lô trị 1 và lô trị 2, các chỉ số đánh giá chất lượng tinh trùng ở các thời điểm khác nhau không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Ở lô mô hình, tại các thời điểm sau 30 ngày và sau 60 ngày, các tỷ lệ tinh trùng di động đều thấp hơn ($p < 0,01$), tỷ lệ tinh trùng không di động, tinh trùng chết và tinh trùng bất thường đều cao hơn ($p < 0,01$) so với thời điểm ban đầu.



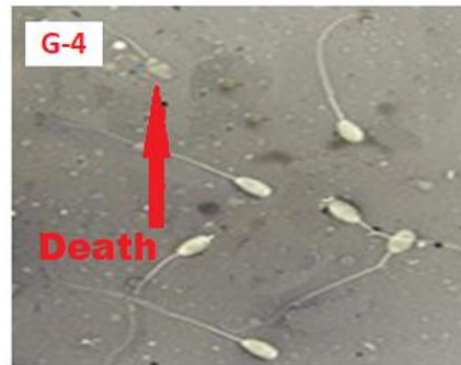
Lô chứng



Lô mô hình

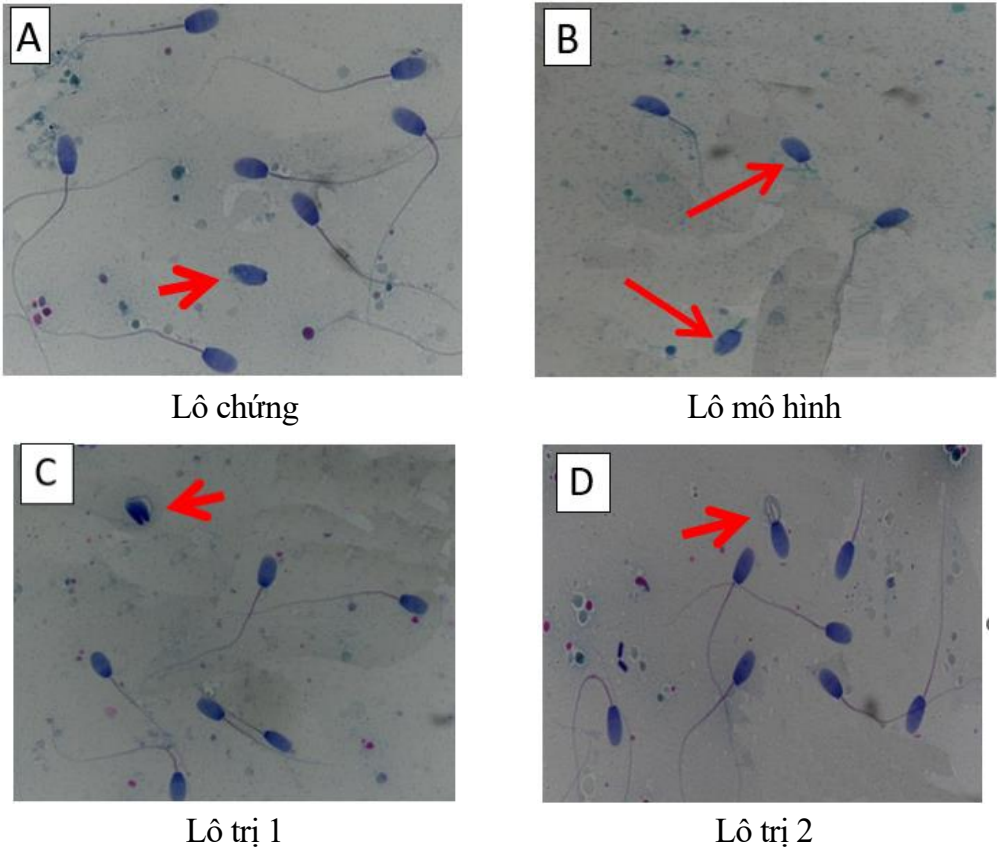


Lô trị 1



Lô trị 2

Hình 2. Hình ảnh nhuộm đánh giá sự sống - chết của tinh trùng (nhuộm eosin- nigrosin, 100X)



Hình 3. Hình ảnh nhuộm đánh giá hình thái tinh trùng bất thường (Nhuộm papanicolou, 100X)

3.3. Kết quả đánh giá nồng độ testosterone trong huyết thanh

Bảng 4. Nồng độ testosterone huyết thanh ở các lô chuột nghiên cứu

Lô nghiên cứu	Nồng độ testosterone huyết thanh (ng/mL)			P giữa các thời điểm
	Ban đầu (a)	Sau 30 ngày (b)	Sau 60 ngày (c)	
Lô chứng (n = 8)	2,518 ± 0,581	2,529 ± 0,643	2,541 ± 0,598	> 0,05
Lô mô hình (n = 8)	2,521 ± 0,594	1,413 [▲] ± 0,381	1,698 [▲] ± 0,346	p _{b-c-a} < 0,01
Lô trị 1 (n = 8)	2,530 ± 0,612	2,188 ^Δ ± 0,495	2,462 ^Δ ± 0,591	> 0,05
Lô trị 2 (n = 8)	2,498 ± 0,623	2,468 ^Δ ± 0,603	2,552 ^Δ ± 0,669	> 0,05

▲ - $p < 0,01$ so với lô chứng; Δ - $p < 0,01$ so với lô mô hình.

Nhận xét: Khi so sánh giữa các lô: Tại thời điểm ban đầu, nồng độ testosterone huyết thanh ở các lô không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Tại thời điểm sau 30 ngày và sau 60 ngày, ở lô mô hình, nồng độ

testosterone huyết thanh thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,01$). Nồng độ testosterone huyết thanh ở lô trị 1 và lô trị 2 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,01$), tương đương so với ở lô

chúng. Không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) khi so sánh giữa các lô trị 1, lô trị 2. Khi so sánh giữa các thời điểm: Ở lô chứng, lô trị 1 và lô trị 2, nồng độ testosterone huyết thanh tại các thời điểm khác nhau không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Ở lô mô

hình, nồng độ testosterone huyết thanh tại các thời điểm sau 30 ngày và sau 60 ngày giảm có ý nghĩa thống kê so với thời điểm ban đầu ($p < 0,01$).

3.4. Kết quả đánh giá trên khả năng thụ thai

Bảng 5. Tỷ lệ thụ thai và số con sinh ra

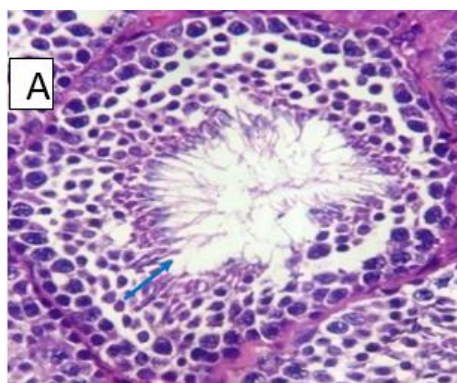
Lô nghiên cứu		Số thỏ cái được thụ tinh	Số thỏ cái có thai	Tỷ lệ thụ thai (%)	Số con sinh ra ở mỗi lứa đẻ
Lô chứng (n = 8)	(1)	16	10	62,50	$6,44 \pm 1,13$
Lô mô hình (n = 8)	(2)	16	4	25,00	$4,50 \pm 0,58$
Lô trị 1 (n = 8)	(3)	16	12	75,00	$6,92 \pm 1,31$
Lô trị 2 (n = 8)	(4)	16	13	81,25	$7,77 \pm 1,59$
P giữa các lô				$p_{2-1} < 0,05$ $p_{3,4-2} < 0,01$; $p_{3,4-1} > 0,05$; $p_{4-3} > 0,05$	$p_{3,4-2} < 0,001$ $p_{1-2} < 0,01$; $p_{4-1} < 0,05$; $p_{3-1} > 0,05$; $p_{4-3} > 0,05$

Ghi chú: n - số thỏ đực ở mỗi lô, mỗi thỏ đực được lấy tinh và thụ tinh cho cho 2 thỏ cái.

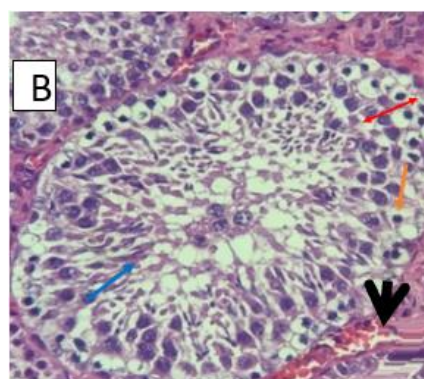
Nhận xét: Lô chứng có tỷ lệ thụ thai là 62,50%. Tỷ lệ thụ thai của lô mô hình là 25,00 %, thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng với $p < 0,05$. Tỷ lệ thụ thai của lô trị 1 là 75,00% và của lô trị 2 là 81,25%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với $p < 0,01$; cao hơn chưa có ý nghĩa khi so sánh với lô chứng ($p > 0,05$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa số thỏ cái thụ thai ở lô trị 1 và lô trị 2 ($p > 0,05$). Về số lượng con sinh ra: ở lô mô hình, số lượng con

sinh ra thấp hơn có ý nghĩa so với lô chứng với $p < 0,01$. Ở lô trị 1, số con sinh ra cao hơn so với lô mô hình với $p < 0,001$; cao hơn chưa có ý nghĩa khi so sánh với lô chứng ($p > 0,05$). Ở lô trị 2, số con sinh ra cao hơn so với lô mô hình với $p < 0,001$, và cao hơn có ý nghĩa khi so sánh với lô chứng ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa số lượng con sinh ra ở lô trị 1 và lô trị 2 ($p > 0,05$).

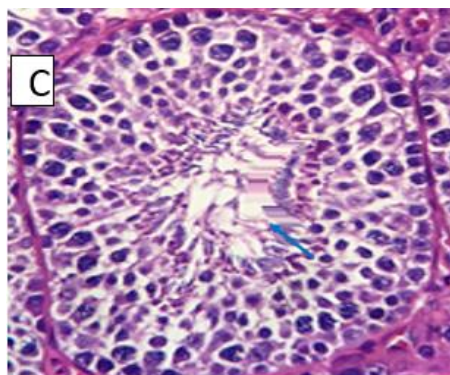
3.5. Kết quả đánh giá mô bệnh học tinh hoàn



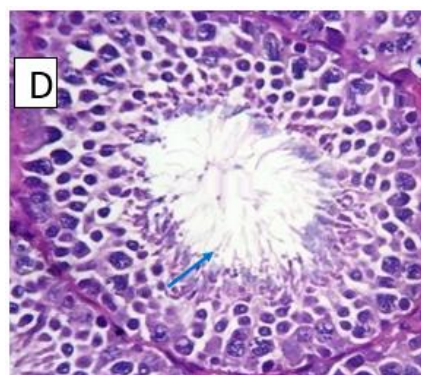
Lô chứng



Lô mô hình



Lô trị 1



Lô trị 2

Hình 4. Hình ảnh mô bệnh học tinh hoàn thỏ (nhuộm HE, 400X)

Nhận xét: Ở lô chứng hình ảnh tinh hoàn bình thường, các ống sinh tinh khá đều nhau, các ống sinh tinh trong lòng có chứa nhiều tinh trùng có đuôi rõ (mũi tên xanh). Thành ống sinh tinh có đầy đủ các tế bào dòng tinh: tế bào Sertoli, tinh nguyên bào, tinh bào 1, tinh bào 2 và tiền tinh trùng. Ở lô mô hình: có hình ảnh suy giảm sinh tinh, các ống sinh tinh trong lòng có chứa ít tinh trùng (mũi tên xanh). Thành ống sinh tinh có các tế bào dòng tinh với số lượng ít, số hàng tế bào ở thành ống sinh tinh ít (mũi tên đỏ). Một số ống sinh

tinh có các tế bào dòng tinh bị thoái hóa (mũi tên vàng). Mô liên kết ngoài ống sinh tinh có các mao mạch máu sung huyết (mũi tên đen). Ở lô trị 1 và lô trị 2 hình ảnh tinh hoàn bình thường, các ống sinh tinh khá đều nhau, các ống sinh tinh trong lòng có chứa nhiều tinh trùng có đuôi rõ (mũi tên xanh). Thành ống sinh tinh có đầy đủ các tế bào dòng tinh: tế bào Sertoli, tinh nguyên bào, tinh bào 1, tinh bào 2 và tiền tinh trùng. Mô liên kết ngoài ống sinh tinh các mao mạch máu không bị sung huyết.

IV. BÀN LUẬN

Các nghiên cứu đánh giá tác dụng của thuốc lên khả năng sinh tinh trên động vật thực nghiệm trước đây thường được tiến hành trên chuột, và tinh dịch chỉ lấy được một lần vào thời điểm kết thúc thí nghiệm, trên chuột gây mê để mổ lấy tinh. Nghiên cứu này được tiến hành trên thỏ, cho phép lấy tinh bằng âm đạo giả, thỏ đực được cho cưỡi lên thỏ cái và thực hiện động tác phóng tinh (vào âm đạo giả) gần giống như quá trình giao hợp tự nhiên. Tinh trùng lấy được nhiều lần, cho phép phân tích tinh trùng ở nhiều thời điểm nghiên cứu để so sánh đánh giá. Ngoài ra, thỏ cái có thể được thụ tinh nhân tạo bằng tinh dịch lấy từ thỏ đực để đánh giá tác động lên khả năng thụ thai, số lượng con trong một lứa đẻ...

Các kết quả nghiên cứu cho thấy, viên nén Fertil Pro for men liều 160mg/ kg/ ngày và 320mg/ kg/ ngày đã làm tăng rõ rệt khả năng sinh sản trên thỏ gây suy giảm sinh sản bằng Fluconazol, thể hiện rõ trên tất cả các chỉ số nghiên cứu. Trên chỉ tiêu đánh giá về số lượng và chất lượng tinh trùng, Fertil Pro for men làm tăng thể tích tinh dịch, mật độ tinh trùng và tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh; làm tăng các tỉ lệ tinh trùng di động, giảm tỉ lệ tinh trùng chết và tinh trùng có

hình thái bất thường, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Kết quả về số lượng và chất lượng tinh trùng được củng cố thêm bởi kết quả về sự cải thiện hình ảnh mô bệnh học tinh hoàn ở các lô dùng Fertil Pro for men. Tinh hoàn là cơ quan chịu trách nhiệm chính trong quá trình sản sinh tinh trùng. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu về tác dụng tăng sinh tinh của các dược liệu trong bài thuốc như Lộc nhung [6], Bá bệnh [7], Toả dương [8]..., cũng như kinh nghiệm dân gian trong sử dụng các vị thuốc này để điều trị vô sinh nam [2]. Kết quả nghiên cứu còn cho thấy tác dụng của Fertil Pro for men làm tăng thụ thai, với tỷ lệ thỏ cái thụ thai tăng cao, số con sinh ra ở mỗi lứa đẻ tăng cao. Khả năng thụ thai là cái đích cuối cùng của điều trị vô sinh, là kết quả của rất nhiều yếu tố phức tạp mà không dễ gì đánh giá hết được. Vì vậy, kết quả nghiên cứu khả năng thụ thai rất có ý nghĩa đối với sản phẩm sử dụng điều trị vô sinh. Đặc biệt, số con sinh ra trong mỗi lứa đẻ ở lô dùng Fertil Pro for men liều 320mg/ kg/ ngày cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý, chứng tỏ thuốc không chỉ làm hồi phục khả năng thụ thai bị suy giảm mạnh do Fluconazol, mà còn làm được hơn thế nữa là làm tăng vượt trội khả năng thụ thai

cao hơn cả lô chứng sinh lý. Cơ quan liên quan nhiều đến sự sản xuất tinh trùng là tinh hoàn [4].

Ngoài các chỉ tiêu chính là đánh giá số lượng, chất lượng tinh trùng và khả năng thụ thai, các chỉ tiêu khác liên quan tới chức năng sinh sản cũng được đánh giá. Thời gian tiền nhảy cái của thỏ đực, được tính là thời gian từ lúc thả thỏ cái vào chuồng thỏ đực đến khi thỏ đực có động tác nhảy lên lưng con cái để thực hiện hành vi giao phối, ở lô dùng Fertil Pro for men ngắn hơn so với lô mô hình với $p < 0,001$. Như vậy Fertil Pro for men đã thể hiện tác dụng trên hành vi tình dục của thỏ đực, làm tăng khả năng hưng phấn tình dục ở thỏ đực. Tăng hưng phấn tình dục cũng là một yếu tố quan trọng giúp tăng cường chức năng sinh sản. Hoạt động tình dục của thỏ đực liên quan nhiều đến hormone Testosteron. Kết quả xét nghiệm testosteron máu của thỏ đực ở các lô dùng Fertil Pro for men tăng cao rõ rệt so với lô mô hình ($p < 0,01$), về mức tương đương so với lô chứng sinh lý. Hầu hết các dược liệu sử dụng trong bào chế viên nang Fertil Pro for men đều có tác dụng làm tăng Testosteron huyết thanh. Các dược liệu chủ yếu làm tăng testosteron theo con đường nội sinh, kích thích cơ thể bài tiết testosteron [2], [3]. Vì vậy, sự tăng testosteron máu khi sử dụng

chế phẩm từ dược liệu có tính an toàn hơn so với việc sử dụng hormone từ bên ngoài vào, tránh được tình trạng feedback ngược gây ức chế sản xuất hormone bên trong cơ thể.

V. KẾT LUẬN

Trên mô hình thỏ đực gây suy giảm sinh tinh bằng Fluconazol, viên nén Fertil Pro for men liều 160mg/ kg/ ngày và 320mg/ kg/ ngày đã làm tăng số lượng và chất lượng tinh trùng (tăng thể tích tinh dịch, mật độ tinh trùng, tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh; tăng các tỉ lệ tinh trùng di động, giảm tỉ lệ tinh trùng chết và tinh trùng có hình thái bất thường); tăng khả năng thụ thai (tăng số thỏ cái mang thai và số con sinh ra trong một lứa đẻ); tăng testosteron máu; cải thiện mô bệnh học tinh hoàn; tăng hưng phấn tình dục thể hiện thông qua làm giảm thời gian tiền nhảy cái của thỏ đực.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1. Trần Quán Anh (2013).** “Mãn dục nam giới (Andropause)”. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 403(3; Số đặc biệt): 7-17
- 2. Lê Hùng (2013).** “Mãn dục nam dưới góc nhìn của y học cổ truyền”. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 403(3; Số đặc biệt): 143-147.
- 3. 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. 278-287.

4. Đỗ Trung Đàm (2006), “Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm”, *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo*, NXB khoa học và kỹ thuật, tr. 377 – 392.

5. World Health Organization (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen

6. Liudmila Vyacheslavovna Fomina, Nguyen Duy Bac, Xuan Phong Pham, Hoang Ngan Nguyen (2018). “Evaluating the effect of improving sperm production of Vietnamese Deer

Antler on experimental animals”. *Academy Journal* No.10(12), pp. 8-27.

7. Dương Thị Ly Hương, Lê Thị Hoa, Nguyễn Thị Thùy, et al. (2013). “Bước đầu đánh giá tác dụng của rễ bá bệnh thu hái tại Việt Nam trên sự suy giảm sinh dục gây ra bởi natri valproat trên chuột nhắt thực nghiệm”. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 403(3; Số đặc biệt): 431-437.

8. Nguyễn Thanh Hương, Nguyễn Trần Thị Giáng Hương, Phan Anh Tuấn, và cs (2015). “Nghiên cứu hoạt tính androgen của cao lỏng tỏa dương (*Balanophora laxiflora*) trên chuột đực”. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 96(4): 31-40.