

CHUẨN HÓA LIỀU GÂY MÊ TRÊN CHUỘT SWISS BẰNG HỖN HỢP THUỐC AN THẦN XYLAZIL - KETAMIL

Lê Thị Ánh, Phan Thị Diệu Ngân*, Nguyễn Diệu Âu,
Lê Hoàng Duy Minh, Nguyễn Tất Minh Phước

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, ĐH Huế

*Email: dieungan315@gmail.com

Ngày nhận bài: 14/5/2019; ngày hoàn thành phản biện: 22/5/2019; ngày duyệt đăng: 02/7/2019

TÓM TẮT

Gây mê động vật thí nghiệm giữ vị trí quan trọng trong việc bảo đảm chất lượng của các nghiên cứu. Thuốc gây mê tác động lên não và làm mất mọi cảm giác ở cơ thể vật thí nghiệm. Gây mê qua đường hô hấp bằng Chloroform không đáp ứng với thời gian nghiên cứu kéo dài ở trạng thái bất động. Gây mê qua đường tiêm màng bụng bằng hỗn hợp thuốc an thần Xylazil:Ketamil:NaCl theo tỷ lệ 2:3:3 (XKN-2:3:3), với liều 1.67 μ L thuốc XKN-2:3:3 trên gam thân trọng, cho thời gian mê sâu 20 – 25 phút.

Từ khóa: chuẩn hóa, liều gây mê, chuột swiss.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Với tầm quan trọng và cùng với sự phát triển của nghiên cứu sinh học cơ bản và y học, sử dụng động vật vẫn đóng góp rất lớn vào việc thúc đẩy hiểu biết về bệnh tật cũng như tìm ra những phương pháp điều trị mới. Chuột là loài động vật bậc cao có hệ thần kinh phát triển, gây mê chuột phù hợp cho mỗi loại thí nghiệm để đảm bảo số lượng chuột thí nghiệm cũng như quyết định tính chính xác của kết quả thí nghiệm là rất cần thiết.

Chloroform là một thuốc mê rất mạnh, ở nồng độ từ 1-4% hơi Chloroform trong không khí hút vào đủ gây mê động vật trong thời gian 10-12 phút; Chloroform còn là một chất độc với môi trường. Với những thí nghiệm gồm nhiều thao tác liên tục và cần thời gian hôn mê dài, việc tăng liều Chloroform để kéo dài thời gian mê sẽ tăng tỷ lệ chuột tử vong cũng như khả năng hồi phục lại trạng thái ban đầu kém. Điều này ảnh hưởng đến đánh giá chất lượng của kết quả thí nghiệm. Nồng độ Chloroform cao không chỉ gây độc cho đối tượng thí nghiệm, người làm thí nghiệm mà còn ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng bởi sự phát tán của nó trong không khí. Vì vậy ở các nước

phát triển đã cấm gây mê bằng Chloroform và thay thế bằng Isoflurane hay sử dụng thuốc gây mê bằng đường tiêm [4], [6], [7].

Do vậy, thăm dò liều gây mê chuột dòng Swiss bằng kết hợp thuốc an thần Xylazil và Ketamil. Sử dụng thuốc bằng đường tiêm tĩnh mạch và tìm liều phù hợp với các thao tác kéo dài cho từng loại thí nghiệm, bảo toàn số lượng chuột, góp phần hỗ trợ sự thành công cho các nghiên cứu.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chuột đực, dòng *Swiss*, 10-12 tuần, khối lượng trung bình $63g \pm 5g$, được nuôi tại phòng thí nghiệm Sinh lý động vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học - Đại học Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp gây mê qua đường hô hấp

Tiến hành thiết lập mô hình gây mê thông qua đường hô hấp của chuột bằng cách tiếp xúc với hơi Chloroform: đặt vào đầu ống fancel rộng 1 mảnh bông sạch thấm Chloroform, đưa đầu chuột vào miệng ống fancel từ 10-12 giây đến khi chuột mất ý thức hoàn toàn (hình 1).

Mỗi lô thí nghiệm được tiến hành trên 8 con chuột ($n = 8$)

2.2.2. Phương pháp gây mê qua đường tiêm màng bụng

Cách pha thuốc: Tỷ lệ hỗn hợp thuốc Xylazil: Ketamil: NaCl theo tỷ lệ 2:3:3 (X:K:N-2:3:3)

Cụ thể trong 1mL dung dịch gây mê XKN-233 gồm:

- 250 μ L Xylazil-20
- 375 μ L Ketamil
- 375 μ L NaCl 0,9%

Cách thức tiêm thuốc: 2.22 μ L/1g: 5 con – liều 100% chia theo tỷ lệ (μ L thuốc/cân nặng)

- + Cân trọng lượng từng con và tiêm tương ứng với liều 2.22 μ L/1g.
- + Tay phải kéo lớp da ở gáy chuột sao cho đầu chuột cố định rồi lật ngược phần bụng dưới của chuột.
- + Cầm chuột bằng tay trái, hướng đầu chuột xuống dưới, bụng hướng về phía người tiêm, cố định đuôi chuột.
- + Tiêm vào màng bụng của chuột. Hướng mũi kim nghiêng một góc 30°, đầu kim lún vào ½ chiều dài, đẩy nhẹ xilanh để thuốc đi vào màng bụng (hình 2).

Mỗi lô thí nghiệm được tiến hành trên 8 con chuột ($n = 8$)



Hình 1. Gây mê chuột bằng cách hít bông tẩm Chloroform



Hình 2. Gây mê chuột bằng cách tiêm thuốc ở màng bụng

2.2.3. Thăm dò liều gây mê bằng phương pháp tiêm màng bụng

Tiến hành gây mê theo các liều tiêm X:K:N-2:3:3 khác nhau: mỗi nghiệm thức 5 con/ liều tiêm

- 1.67 μ L /g đối với liều 75%
- 1.11 μ L /g đối với liều 50%
- 0.56 μ L /g đối với liều 25%

Theo dõi tình trạng chuột sau khi tiêm thuốc mê. Đánh giá thông qua phản xạ hệ thống vận động, hệ thống xúc giác như phản ứng đồng tử, trạng thái hô hấp và sự co giật... của chuột.

3. KẾT QUẢ

3.1. Đánh giá khả năng hôn mê của chuột qua đường hô hấp bằng Chloroform

Nghiên cứu gây mê qua đường hô hấp bằng Chloroform có thuận lợi là thủ thuật không gây đau cho vật thí nghiệm. Chuột được ngửi bông có thấm dung dịch Chloroform 4% từ 10-12 giây. Kết quả quá trình gây mê bằng ngửi Chloroform liên tục sau 8 – 12 giây, chúng tôi thu được kết quả như sau:

- Trước gây mê: 8/8 con chuột khỏe mạnh.
- Sau gây mê: 2 con sống và 6 tử vong/8 con chuột, cụ thể:
 - + Ngửi Chloroform sau 8 – 10 giây: 2/8 chuột chết khi đang gây mê, trong đó 1 chuột chết ở phút thứ 7 sau gây mê, 1 chuột mê sâu sau 10-12 phút có dấu hiệu co giật và chết
 - + Ngửi Chloroform sau 10 – 12 giây: 4/8 chuột chết khi đang gây mê, trong đó 3 chuột mê sâu sau 10-12 phút có dấu hiệu co giật, hồi phục kém và chết và 1 chuột chết sau 30 phút hôn mê sâu, do không có dấu hiệu hồi phục.

- + Hai con sống sót sau khi ở trạng thái mê sâu có dấu hiệu co giật nhưng hồi phục chậm, trở lại trạng thái hoạt động bình thường sau hơn 12 giờ.

Từ kết quả trên cho thấy khi phối chuột tiếp xúc với khí độc Chloroform có thể làm giảm chức năng hô hấp dẫn đến chết trong quá trình thực nghiệm. Điều này ảnh hưởng đến số lượng chuột ở mỗi nghiệm thức. Cơ quan hô hấp đóng vai trò lớn trong quá trình chất gây mê xâm nhập vào cơ thể, tuy Chloroform là chất dễ bay hơi dễ bài tiết một phần độc chất qua đường hô hấp nhưng chuột sau gây mê vẫn cần thời gian 12 giờ để trở về trạng thái bình thường. Điều này khẳng định Chloroform gây độc tính cao và kéo dài gây ảnh hưởng đến việc đánh giá kết quả thí nghiệm.

3.2. Đánh giá khả năng hôn mê của chuột qua đường tiêm màng bụng bằng thuốc an thần

Thuốc an thần Xylazil và Ketamilức chế hoạt động của hệ thần kinh, đưa cơ thể vào trạng thái bất động. Kết quả thăm dò phương pháp gây mê bằng tiêm thuốc mê X:K:N-2:3:3 được thể hiện ở bảng 1:

Bảng 1. Kết quả thăm dò phương pháp gây mê bằng tiêm thuốc mê XKN-2:3:3

Đối tượng	Thời gian khởi mê	Thời gian mê sâu	Thời gian hồi phục đến tỉnh hẳn
Chuột 1	8 phút	58 phút	110 phút
Chuột 2	10 phút	60 phút	120 phút
Chuột 3	16 phút	60 phút	100 phút
Chuột 4	12 phút	55 phút	120 phút
Chuột 5	16 phút	50 phút	115 phút

Như vậy đối với phương pháp tiêm thuốc X:K:N-2:3:3, cho thấy 100% chuột sống và thời gian mê sâu lâu hơn, phù hợp các thao tác thực nghiệm kéo dài trên chuột. Từ kết quả trên cho thấy, gây mê bằng tiêm tĩnh mạch có ưu điểm hơn so với gây mê qua đường hô hấp:

- Dễ dàng chủ động điều chỉnh thời gian gây mê thông qua liều tiêm.
- Số chuột trong mỗi nghiệm thức được bảo toàn 100%.

Tuy nhiên với liều tiêm 2.22µl/g tương đương liều tiêm là 100% thuốc mê, cho thấy 100% số chuột thí nghiệm rơi vào trạng thái hôn mê quá dài từ 40 - 60 phút, nhịp tim đập rất chậm, nhịp thở khó khăn < 100 lần/phút, đến phút 50 tứ chi có trạng thái co giật. Sau quá trình mê, chuột vẫn ở trạng thái lơ đãng, cử động không linh hoạt do hôn mê kéo dài quá lâu có thể dẫn đến giai đoạn liệt hành tủy và nguy cơ trung khu hô hấp ngưng hoạt động.

Như vậy liều tiêm 100% thuốc mê đã gây độc lên hệ thần kinh. Trong thời gian dài sau gây mê các độc tính bị trích xuất dần bởi thận qua máu và giảm hoạt tính dần qua đường thận bài tiết ra ngoài bởi nước tiểu. Đồng thời gan khử độc thay đổi về mặt

hóa học thành các chất ít độc hơn qua chuyển hóa sinh học, từ đó chuột dần trở lại trạng thái linh hoạt ban đầu. Vì vậy chúng tôi tiếp tục nghiên cứu thăm dò gây mê chuột ở những liều tiêm thấp hơn từ 25-75%.

3.3. Đánh giá các liều gây mê bằng tiêm thuốc XKN-2:3:3.

Liều lượng thuốc XKN-2:3:3 được tính bằng milligram trong mỗi gram trọng lượng cơ thể: (Nồng độ cao các chất hóa học trong khoảng thời gian o Hóa chất với các hiệu ứng cấp tính):

Chúng tôi tiêm với các liều: 25%, 50% và 75% và tiến hành theo dõi liên tục các tác động cấp tính đến sức khỏe chuột để đánh giá nồng độ của các chất hóa học trong khoảng thời gian trước và sau tiêm. Kết quả tổng hợp các trạng thái được thể hiện ở Bảng 2:

Bảng 2. Thời gian và các biểu hiện của chuột với mỗi liều tiêm khác nhau

Liều tiêm	T	T1	T2	Nhịp thở trung bình (lần/phút)	Trạng thái
25%	30	00	00	110-120	Bò loạng choạng, mắt nhìn được
50%	40	21	14	110-120	Tứ chi hơi co giật, đồng tử giãn
75%	45	16	20	100-110	Tứ chi duỗi ra, mất phản xạ mắt

Ghi chú: T: tổng thời gian mê của chuột từ khi tiêm đến khi có động tác bò

T1: thời gian từ khi tiêm thuốc đến khi chuột bắt đầu mê sâu (chuột nằm bất động)

T2: khoảng thời gian cơn mê sâu kéo dài

Qua theo dõi các trạng thái ở các nghiệm thức chúng tôi đều nhận thấy rằng sau khi gây mê, chuột bò chậm dần, nằm yên và rơi dần vào trạng thái mê sâu, nhịp thở 100-110 lần/phút, mất phản xạ đóng mi mắt. Vào giai đoạn khởi mê, chuột có nhịp thở đều 100/110, bất động. Khi chuột rơi vào trạng thái hôn mê sâu, đồng tử không phản xạ, hoàn toàn bất động. Sau 45-50 phút, chuột bò nhẹ, tìm vòi nước uống, có phản xạ tránh các chướng ngại vật trên đường bò.

Từ kết quả trên chúng tôi nhận thấy rằng:

- *Liều tiêm 25%:* theo dõi đến hơn 30 phút, nhận thấy chuột còn bò loạng choạng và vẫn có khả năng tránh được chướng ngại vật. Như vậy ở liều tiêm 25% chức năng của trung khu thị giác vẫn hoạt động bình thường, chuột chưa mê sâu.

- *Liều tiêm 50%:* theo dõi đến hơn 18 phút, chuột nằm yên, hô hấp và tim đập đều, nhịp thở 110-120 lần/phút, đồng tử giãn, tứ chi co giật nhẹ ở một số cá thể. Thời gian mê kéo dài 10 - 14 phút. Như vậy ở liều tiêm 50% đã làm cho chuột mê sâu.

- *Liều tiêm 75%:* theo dõi đến hơn 14 phút, chuột nằm bất động, nhịp thở 100-

110 lần/phút, mất phản xạ đóng mi mắt, đồng tử giãn, ngưng cử động mắt, tứ chi duỗi ra. Thời gian hôn mê sâu kéo dài 20-25 phút. Chuột có khả năng hồi phục tốt, hoạt động linh hoạt sau gây mê, do đó liều tiêm 1.67 μ L thuốc XKN-2:3:3 cho mỗi gram cân nặng, phù hợp cho các thao tác thí nghiệm kéo dài nhưng vẫn đảm bảo chất lượng kết quả cũng như số chuột thí nghiệm.

Như vậy: với liều tiêm 25% thuốc, 100% chuột chưa đến trạng thái hôn mê sâu. Với liều tiêm 50% chuột hôn mê sâu kéo dài 12-14 phút và lấy lại ý thức sau 14 phút gây mê. Với liều tiêm 75% (tiêm 1.67 μ L thuốc cho mỗi gam cân nặng) chuột hôn mê sâu kéo dài 20-25 phút và chuột lấy lại ý thức sau 30 phút gây mê.

Chloroform là thuốc mê rất mạnh, đã được sử dụng từ trước những thập niên 50 của thế kỷ XVIII, tuy nhiên vì độc tính cao nên ở các nước phát triển đã không còn sử dụng. Theo RM Waters - Đại học Wisconsin, đã nghiên cứu về độc tính của loại thuốc mê này và đưa ra kết quả đáng quan ngại khi thực nghiệm trên mô hình động vật: sử dụng Chloroform làm tổn thương gan chậm nhưng nghiêm trọng khi gây mê nhiều lần ở chó đi cùng với thể trạng của từng con mà có những mức độ tổn thương khác nhau. Đối với hệ thống tim mạch, Chloroform ảnh hưởng đến hoạt động của tim, làm suy cơ tim, gây tê liệt hệ mạch ngoại biên và khi quá liều sẽ dẫn đến ngừng hoạt động ở tâm thất khi thực nghiệm ở chó [4].

Việc sử dụng gây mê đường hít khó chủ động kiểm soát lượng khí mà đối tượng hít vào là đủ và phù hợp để gây mê cho từng cá thể. Lượng khí khi hít vào cơ thể sẽ đi thẳng đến hệ thần kinh, khi lượng khí vượt quá ngưỡng cho phép của vật chủ sẽ dẫn đến việc ức chế hệ thần kinh trung ương và suy hô hấp, dẫn đến tử vong [3]. Như vậy hóa chất Chloroform vốn có thành phần gây nguy hại hoặc tiềm ẩn khả năng gây nguy hại đã trực tiếp hoặc gián tiếp gây ra một tác động không mong muốn nào đó cho động vật thí nghiệm thậm chí nguy cơ gây tử vong.

Trong khi đó Ketamil, chúng tôi có thể điều chỉnh số liều để đáp ứng liều lượng, điều này tạo ra sự khác biệt giữa tính độc và dưới ngưỡng gây độc - phương thức gây mê an toàn cho vật thí nghiệm. Với việc điều chỉnh liều gây độc thấp, ít gây ra tác động không mong muốn do nồng độ độc tố thấp đảm bảo chất lượng nghiên cứu. Bên cạnh đó Ketamil có tính năng sử dụng trong các phẫu thuật ngắn hạn, giảm đau nhanh và gây mê sâu do cắt đứt chọn lọc những con đường hội tụ ở não. Con vật sẽ không cảm nhận được tác động từ môi trường, bất động và không cảm thấy đau trong suốt thời gian mê. Ngoài ra, Xylazil là thuốc an thần, giảm đau, giãn cơ, thường được dùng kết hợp Ketamil. Việc sử dụng kết hợp Xylazil và Ketamil hòa tan trong dung dịch NaCl 0,9% là dung dịch thuốc mê an thần có độ an toàn cao và được sử dụng phổ biến trong thú y.

Theo *Son Yong (2010)* cơ chế của thuốc mê an thần được hiểu dựa trên tính tan trong lipid của chúng, do những tương tác trực tiếp của thuốc với protein trên các vị trí

ky nước tại ligand của kênh ion ở các synape thần kinh gây ức chế hoạt động của các thụ thể kích thích (vd: *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA), nicotinic, serotonin) hoặc tăng cường hoạt động của các thụ thể ức chế (vd: GABAA, glycine) [5]. Sự tương tác của thuốc mê lên màng lipid hoặc protein qua đó tác động lên kênh ion dẫn đến ức chế sự hoạt động của chất dẫn truyền thần kinh.

Thuốc gây mê XKN-2:3:3 kích hoạt các kênh kali hai lỗ rỗng, đóng vai trò trong việc gây ức chế hoạt động dẫn truyền của các tế bào thần kinh. Kênh natri có vai trò quan trọng trong việc dẫn truyền xung thần kinh, tác động của thuốc gây mê làm ức chế kênh natri ở khe synape, ngăn chặn sự dẫn truyền tín hiệu đến tế bào thần kinh [2].

Lựa chọn sử dụng phương pháp và liều gây mê phù hợp là rất quan trọng. Thuốc gây mê sử dụng phải có độ an toàn đối với đối tượng thí nghiệm và cả người thực hiện thí nghiệm. Sự kết hợp của Ketamil và Xylazine đã được W. Erhardt *et al* (1984) chứng minh là đáng tin cậy để gây mê cho động vật [1].

4. KẾT LUẬN

1. Gây mê bằng Chloroform 4% hít 10-12 giây: chết 6/8 con.
2. Gây mê XKN-2:3:3 bằng tiêm màng bụng với liều 1.67μl thuốc đối với 1g cân nặng là an toàn và phù hợp cho thời gian làm thí nghiệm trên mô hình chuột dòng *Swiss*.
3. Đề nghị các ý tưởng nghiên cứu tiếp

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] W. Erhardt, A. Hebestedt, G. Aschenbrenner, B. Pichotka, and G. J. R. i. e. m. Blümel. (1984). A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). vol. 184, no. 3, pp. 159-169.
- [2] H. J. B. j. o. a. Hemmings Jr. (2009). Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics. vol. 103, no. 1, pp. 61-69.
- [3] C. J. H. Lionte and e. toxicology. (2010). Lethal complications after poisoning with chloroform—case report and literature review. vol. 29, no. 7, pp. 615-622.
- [4] R. M. J. C. A. s. a. y. WATERS. (1951). Chloroform. A study after 100 years.
- [5] S. Yong. (2010). Molecular mechanisms of general anesthesia. *Korean journal of anesthesiology*, vol. vol. 59, pp. 3-8.
- [6] Leikin, Jerrold B.; Paloucek, Frank P., eds. (2008). "Chloroform". *Poisoning and Toxicology Handbook* (4th ed.). Informa. p. 774.
- [7] Gordon, H. Laing (November 2002). *Sir James Young Simpson and Chloroform (1811–1870)*. Minerva Group. pp. 106–109. ISBN 978-1-4102-0291-8. Retrieved 11 November 2011.

OPTIMIZING DOSAGE OF KETAMINE AND XYLAZINE IN SWISS MICE

**Le Thi Anh, Phan Thi Dieu Ngan*, Nguyen Dieu Au,
Le Hoang Duy Minh, Nguyen Tat Minh Phuoc**

Faculty of Biology, University of Sciences, Hue University

*Email: dieungan315@gmail.com

ABSTRACT

Anesthesia of experimental animals plays an important role in ensuring the quality of the research. Anesthesia in mice is an impact on the brain and loss of sensation of the animal's body. Inhalation through anesthesia with chloroform is not suitable for the experimental research long time. In traperitoneal injection anesthesia with tranquilizers mixture Xylazil:Ketamil:NaCl-2:3:3 (XKN-2:3:3) with dose 1.67 μ L/g weight provokes coma deep during time 20-25 minutes in mice.

Keywords: optimizing, dosage, Swiss mice.



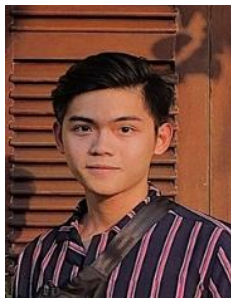
Lê Thị Ánh sinh ngày 16 tháng 01 năm 1996 tại Thanh Hóa. Cô tốt nghiệp ngành Công nghệ Sinh học tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế năm 2019. Hiện cô đang là kỹ thuật viên tại Bionet, Hà Nội.



Phan Thị Diệu Ngân sinh ngày 31 tháng 05 năm 1995 tại Quảng Trị. Cô tốt nghiệp ngành Công nghệ Sinh học tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế năm 2019.



Nguyễn Diệu Âu sinh ngày 26 tháng 04 năm 1996 tại Quảng Nam. Cô tốt nghiệp ngành Công nghệ Sinh học tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế năm 2019. Hiện cô đang thực tập làm việc tại Bệnh viện Trung ương Huế.



Lê Hoàng Duy Minh sinh ngày 22 tháng 12 năm 1996 tại thành phố Huế. Anh tốt nghiệp ngành Công nghệ Sinh học tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế năm 2019.



Nguyễn Tất Minh Phước sinh ngày 29 tháng 05 năm 1997 tại thành phố Huế. Hiện tại anh là sinh viên khóa 39 ngành Công nghệ Sinh học tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

