

VAI TRÒ CỦA THỎ TRONG NGHIÊN CỨU TÍNH AN TOÀN VÀ TÁC DỤNG TRÊN SINH SẢN ĐỰC CỦA THUỐC Y HỌC CỔ TRUYỀN

Vũ Ngọc Thắng¹, Nguyễn Hoàng Ngân²

¹Viện Kiểm nghiệm, Nghiên cứu dược và TBYT Quân đội;

²Học viện Quân y.

Tóm tắt

Trong các loài động vật thường được sử dụng trong nghiên cứu, thỏ được sử dụng phổ biến sau chuột nhắt và chuột cống; có nhiều ưu điểm khi sử dụng thỏ trong các nghiên cứu về độc tính và trên khả năng sinh sản đực. Khi sử dụng thỏ làm đối tượng nghiên cứu cần chú ý đến tuổi của thỏ; thời gian dùng thuốc; các marker cần đánh giá đồng thời cần chuẩn hóa quy trình chăm sóc để hạn chế sự ảnh hưởng bởi điều kiện tiến hành thí nghiệm.

Từ khóa: Mô hình thỏ, độc tính, sinh sản đực.

THE ROLE OF RABBITS IN RESEARCHING THE SAFETY AND EFFECTS ON MALE REPRODUCTION OF TRADITIONAL MEDICINE

Abstract

Among the animals models commonly used in research, rabbits are the third commonly used after mice and rats, and there are many advantages when using rabbits as research subjects in toxicity and male reproductive studies. When using rabbits as research subjects, attention should be paid to the age of the rabbits; the duration of drug administration; the markers that need to be evaluated; and it is necessary to standardize the care process to limit the influence of experimental conditions.

Keywords: Rabbit model, toxicity, male reproductive.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong nghiên cứu phát triển thuốc mới, kể cả thuốc mới trong y học cổ truyền; giai đoạn nghiên cứu trên động vật (*in vivo*) có vai trò quan trọng, giúp nhà nghiên cứu có được những thông tin quan trọng về hiệu quả tác dụng, độc tính và dược động học của thuốc. Hiện nay, với công nghệ nuôi cấy mô và nuôi cấy tế bào phát triển, việc sàng lọc tác dụng và độc tính của thuốc đã được

thực hiện trên *in vitro* nhiều hơn tuy nhiên, việc đánh giá độc tính và tác dụng trên động vật vẫn là giai đoạn không thể thiếu. Trong liên minh Châu Âu, sau chuột nhắt (59,3%) và chuột cống (17,7%), loài động vật thực nghiệm có vú được các phòng thí nghiệm sử dụng thường xuyên nhất là thỏ (2,78%) [1]. Tại Việt Nam, thỏ đã được dùng là đối tượng nghiên cứu độc tính khá thường xuyên nhưng còn được sử dụng rất

* Ngày nhận bài: 31/07/2024

* Ngày phản biện: 15/08/2024

* Ngày phê duyệt đăng bài: 24/08/2024

hạn chế trong các nghiên cứu trên khả năng sinh sản đực nhất là áp dụng kỹ thuật lấy tinh bằng âm đạo giả và thụ tinh nhân tạo cho thỏ cái. Bài tổng quan này tập hợp một số thông tin có thể hữu ích cho việc thiết kế nghiên cứu độc tính và tác dụng với sinh sản đực của thuốc y học cổ truyền trên thỏ.

II. SINH LÝ, SINH SẢN CỦA THỎ ĐỰC

Tuyến sinh dục của thỏ đực phát triển nhanh chóng bắt đầu từ 5 tuần tuổi, tuy nhiên sự sản xuất tinh trùng bắt đầu khoảng 40- 50 ngày tuổi. Các nguyên bào tinh bắt đầu phân chia lúc 7 đến 8 tuần tuổi, hàng rào máu tinh hoàn hình thành từ 10 tuần tuổi. Tinh hoàn bắt đầu đi xuống và các ống sinh tinh phát triển khi 12 tuần tuổi, tinh bào cấp 2 được nhìn thấy lần đầu tiên vào lúc 14 đến 15 tuần tuổi. Các ống xuất hiện trưởng thành về mặt mô học khi được 18 tuần tuổi. Tinh hoàn tiếp tục phát triển và tăng sản xuất tinh trùng cho đến khi 6 tháng tuổi. Sự trưởng thành sinh dục của thỏ New Zealand khoảng 32 tuần tuổi trong điều kiện ôn đới, dù vậy những thỏ đực trẻ có thể sử dụng cho sự phối giống sinh sản khoảng 20 tuần tuổi. Trong thực tế, sự bộc lộ những tập tính phối giống của thỏ là khoảng 60- 70 ngày tuổi khi thỏ có biểu hiện đầu tiên nhảy cưỡi lên trên những con khác.

Cần khoảng 48 ngày, hoặc 4,5 chu kỳ, để một tinh nguyên bào biệt

hóa thành tinh trùng trưởng thành và được phóng thích vào lòng ống của ống sinh tinh. Cần thêm 10 đến 14 ngày (1 đến 1,5 chu kỳ) để tinh trùng đi qua mào tinh hoàn vào túi tinh. Như vậy, thời gian để cần thiết cho sự sinh tinh và di chuyển vào túi tinh là khoảng 58 đến 62 ngày.

III. CÁC MÔ HÌNH NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG THỎ

3.1. Nghiên cứu độc tính

Thỏ có thể được sử dụng trong nhiều các nghiên cứu độc tính, thỏ thường là loài thứ hai bắt buộc bên cạnh chuột nhắt hoặc chuột cống, và là loài được ưu tiên trong thử nghiệm hóa chất liên quan đến kích ứng da cấp tính. Đối với nghiên cứu đánh giá tính kích ứng hoặc ăn mòn trên da, nếu không tiến hành trên thỏ mà sử dụng đối tượng nghiên cứu khác thì cần phải đưa ra lý do phù hợp. Một số nghiên cứu độc tính khác sử dụng thỏ như: Nghiên cứu độc tính mãn tính [2], độc tính trước sinh, độc tính qua đường uống liều lặp lại trong 28 ngày hay độc tính qua đường uống liều lặp lại trong 90 ngày [3].

3.2. Nghiên cứu tác dụng trên sinh sản nam

* Nghiên cứu tác dụng của thuốc trên khả năng cương dương:

Ngoài chuột cống, thỏ là đối tượng thứ hai thường được sử dụng trong các mô hình nghiên cứu trên khả năng cương dương. Để đánh giá khả năng cương dương, phương pháp đáng tin cậy và thường được

sử dụng là đo áp lực xoang hang (ICP) bằng kích thích điện dây thần kinh hang. Có thể có nhiều mô hình (phương pháp gây suy giảm, rối loạn cương dương) khác nhau tuy nhiên đo ICP có thể coi là con đường chung, là phương pháp đánh giá để đưa ra kết quả của những mô hình đó.

Các mô hình trên thỏ có thể được sử dụng là: Gây đái tháo đường bằng alloxan; mô hình tuổi tác; gây hội chứng chuyển hóa (tăng huyết áp, béo phì, tăng cholesterol) bằng chế độ ăn giàu chất béo.

* Nghiên cứu tác dụng của thuốc trên khả năng sinh sản

Thỏ là con vật nhỏ nhất có thể lấy tinh dịch bằng âm đạo giả. Do đó, nghiên cứu khả năng sinh sản trên thỏ sẽ thuận tiện cho việc lấy tinh và phân tích tinh dịch hơn so với chuột. Hơn nữa, trình tự gen của thỏ giống với trình tự gen của con người hơn so với của các loài gặm nhấm khác (chuột cống, chuột nhắt...). Nên có nhiều ưu điểm khi sử dụng thỏ là đối tượng nghiên cứu trên sinh sản. Khi đánh giá tác dụng của thuốc, hóa chất cũng như với chuột có thể thực hiện trên thỏ bình thường khỏe mạnh hoặc thỏ đã gây suy giảm sinh sản. Tuy nhiên khi nghiên cứu trên mô hình suy giảm sinh sản thì có thể nhận thấy tác dụng của thuốc, hóa chất rõ ràng hơn. Mô hình nghiên cứu tác dụng của thuốc trên sinh sản ở thỏ đã được sử dụng trên thế giới nhưng

vẫn còn áp dụng hạn chế tại Việt Nam. Các tác nhân đã được sử dụng để gây suy giảm sinh sản như: Gây stress bằng nhiệt [4]; gây rối loạn chuyển hóa, béo phì [5]; hay gây suy giảm sinh sản bằng kim loại nặng như cadmium (Cd), nickel clorid (NiCl_2).

IV. CÁC ĐIỂM CẦN QUAN TÂM KHI NGHIÊN CỨU TRÊN THỎ

4.1. Lựa chọn giống thỏ nghiên cứu, tuổi, cân nặng

Giống thỏ thường được sử dụng trong nghiên cứu là thỏ New Zealand [6]. Cũng có nghiên cứu sử dụng giống thỏ khác: Thỏ V-line [7].

Việc lựa chọn tuổi thỏ đưa vào nghiên cứu thường dựa vào đặc điểm của từng nghiên cứu cụ thể. Thỏ thường được đưa vào nghiên cứu trước khi chúng đạt đến độ chín về mặt sinh sản. Đây có thể là một lợi thế nếu mong muốn có được độ nhạy cảm tối đa đối với hợp chất thử nghiệm. Sự trưởng thành trong tình dục xảy ra khoảng 5 tháng (tùy thuộc vào chủng) và chất lượng tinh dịch thường giảm ở những con thỏ già hơn (> 2 năm tuổi) [8]. Do vậy, thường các nghiên cứu sử dụng thỏ được trưởng thành từ 7- 8 tháng tuổi [6]. Có thể sử dụng thỏ ít tuổi hơn: Từ 20 tuần tuổi với những nghiên cứu ảnh hưởng tới sự trưởng thành của thỏ [4], [7].

Cân nặng: Cân nặng của thỏ tùy thuộc vào độ tuổi và giống thỏ.

Đối với những nghiên cứu sử dụng thỏ đực trưởng thành, thường sử dụng thỏ có cân nặng từ 2,0- 3,0 kg [4], [6].

4.2. Chế độ chăm sóc

Chế độ ăn, uống và loại thức ăn, nước uống sử dụng có thể được dùng khác nhau tùy thuộc vào mục đích của nghiên cứu. Cũng không có hướng dẫn hay quy định về thức ăn hay nước uống sử dụng cho thỏ, tuy nhiên có một số gợi ý được đưa ra như sau.

- Về thức ăn: Với thỏ đực, có thể được cho ăn tự do tuy nhiên có thể sử dụng chế độ ăn ít năng lượng để tránh béo quá mức; chế độ ăn có hơn 15% protein thô được khuyến nghị để đảm bảo sản xuất tinh trùng đầy đủ [8]. Thành phần acid béo cân bằng đường như quan trọng hơn tổng lượng chất béo. Cần có sự cân bằng giữa chất béo bão hòa so với chất béo không bão hòa và giữa các acid béo không bão hòa đa nối đôi với nhau trong chế độ ăn. Thức ăn thường được chế biến thành dạng pellet nhỏ, đường kính khoảng 2 mm và cung cấp khoảng 2500-2600 kcal/kg [4].

- Nước uống: Thông thường, khi không có yêu cầu đặc biệt, nước uống cho thỏ sử dụng là nước máy và cho thỏ uống tự do.

- Chu kỳ ánh sáng: Khoảng thời gian tiếp xúc với ánh sáng ảnh hưởng đến trục dưới đồi và tuyến yên và do đó ảnh hưởng tới sự giải phóng nội tiết tố và sản xuất tinh

trùng. Nên cố định chu kỳ ánh sáng, chu kỳ 16 giờ sáng- 8 giờ tối tương đối phù hợp với chu kỳ thời gian của ngày- đêm do đó thường được sử dụng trong nghiên cứu [5].

- Nhiệt độ, độ ẩm: Nhiệt độ là yếu tố quan trọng và ảnh hưởng trực tiếp đối với thỏ. Khi nhiệt độ môi trường thấp hơn 10°C thỏ cuộn mình để giảm diện tích chống lạnh, nhưng khi nhiệt độ từ 25- 30°C thì chúng sẽ nằm dài soài thân ra để thoát nhiệt. Nếu nhiệt độ môi trường trên 35°C thỏ sẽ bị stress do thân nhiệt tăng cao. Thỏ có ít tuyến mồ hôi dưới da, thải nhiệt chủ yếu qua đường hô hấp, trời nóng quá thì thỏ thở nhanh. Nếu nhiệt độ trên 45°C thì thỏ có thể chết nhanh. Do vậy, nhiệt độ phù hợp cho thỏ là từ 10°C- 27°C, tuy nhiên theo điều kiện thực tế có thể thỏ được nuôi ở nhiệt độ cao hơn đối với những nghiên cứu sử dụng mô hình gây suy giảm sinh sản bằng stress nhiệt. Thỏ rất nhạy cảm với độ ẩm thấp, nhưng độ ẩm quá cao cũng không thích hợp, độ ẩm quá cao và kéo dài thì thỏ dễ bị cảm lạnh và viêm mũi. Nói chung, độ ẩm không khí từ 55-80% là tương đối thích hợp đối với thỏ và thường được sử dụng [4].

4.3. Thời gian uống thuốc

Đối với các nghiên cứu độc tính thông thường, thời gian uống thuốc có thể được áp dụng theo hướng dẫn chung hoặc tùy thuộc vào thời gian sử dụng thực tế dự kiến trên người. Với các nghiên cứu

trên khả năng sinh sản (độc tính hoặc tác dụng trên khả năng sinh sản) thì chu kỳ của sự sinh tinh có ý nghĩa quan trọng trong việc thiết kế, lựa chọn thời gian uống thuốc. Vì thời gian cho một chu kỳ sinh tinh là khoảng 7- 8 tuần, nên thời gian sử dụng thuốc (hoặc tiếp xúc với tác nhân nghiên cứu) để đánh giá tác dụng của các chất ngoại sinh tối thiểu là 7 tuần. Thời gian này cho phép đủ để tác nhân tích lũy trong các mô, phát huy tác dụng và tạo ra những thay đổi trong tinh trùng, trong quá trình xuất tinh. Hiệu quả tối đa sẽ được tạo ra tại thời điểm này và các tổn thương mô học (nếu có) cũng sẽ được nhìn thấy tối đa. Thời gian dùng thuốc có thể dài hơn tùy thuộc vào tác dụng của thuốc và mục tiêu nghiên cứu nhưng thông thường từ 7- 12 tuần [6], [8].

4.4. Lấy tinh

- Dụng cụ lấy tinh: Dụng cụ lấy tinh được sử dụng là âm đạo giả. Âm đạo giả dùng để lấy tinh dịch thỏ được Macirone và Walton giới thiệu lần đầu tiên vào năm 1938. Sau đó cũng đã trải qua quá trình cải tiến, thay đổi để nâng cao hiệu quả lấy tinh, tăng độ bền của dụng cụ và hạn chế những tác động của dụng cụ lấy tinh lên tinh dịch.

Cấu tạo của âm đạo giả gồm: Thân âm đạo giả: 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 ẩm âm đạo giả.

Quả bóng cao su cắt thủng đáy, lót mặt trong của thân âm đạo giả; khi lót mặt trong thân âm đạo giả có tác dụng giữ nước đã làm ẩm. Ống thu tinh: Là ống thủy tinh đường kính khoảng 2 cm, được chia vạch.

Tần suất lấy tinh: Tần suất lấy tinh phụ thuộc vào mục đích lấy tinh. Với đa số các nghiên cứu đánh giá tác dụng trên tinh dịch thỏ thì các thời điểm lấy tinh có thể là: Trước khi nghiên cứu, trong quá trình nghiên cứu và thời điểm kết thúc của nghiên cứu.

Thời gian lấy tinh: Trong đa số các trường hợp, thời gian lấy tinh là vào buổi sáng. Đối với những nghiên cứu lấy tinh theo chu kỳ (2 lần/tuần) thường lấy tinh vào buổi sáng 2 ngày cố định trong tuần, như thứ 2 và thứ 5 hoặc thứ 3 và thứ 6.

4.5. Các marker theo dõi trong quá trình nghiên cứu

Tùy theo mục đích, nội dung nghiên cứu mà các marker được lựa chọn để đánh giá độc tính cũng như tác dụng khác nhau. Ở thỏ, có thể có nhiều loại marker khác nhau được lựa chọn khi nghiên cứu độc tính và tác dụng trên sinh sản đực.

4.5.1. Các marker theo dõi trong máu

Trong các nghiên cứu độc tính nói chung, các chỉ số huyết học như: Hematocrit, nồng độ hemoglobin, số

lượng bạch cầu và công thức bạch cầu, số lượng tiểu cầu, thời gian đông máu thường được sử dụng trong nghiên cứu cứu [2], [9]. Cùng với đó là các chỉ số sinh hóa máu như: Protein tổng số, albumin, globulin, aspartat aminotransferase (AST), alanin aminotransferase (ALT), lipid tổng số, cholesterol tổng số, lipoprotein tỷ trọng thấp (low-density lipoprotein, LDL), lipoprotein tỷ trọng cao (high-density lipoprotein, HDL), lipoprotein tỷ trọng rất thấp (very low density lipoprotein, VLDL), creatinin, ure... [2], [9].

Ngoài ra, tùy theo yêu cầu của từng nghiên cứu mà có thể sử dụng những marker khác: Hoạt tính chống oxi hóa như: Total antioxidant capacity (TAC), lipid peroxidation (malondialdehyd, MDA), serum reduced glutathion (GSH); nồng độ nitric oxid (NO); các chỉ số hoạt động thực bào. Nồng độ testosterone; dihydrotestosterone trong máu.

4.5.2. Các marker theo dõi trong tinh dịch

Tinh trùng là marker quan trọng trong việc đánh giá độc tính của thuốc trên sinh sản cũng như tác dụng của thuốc trên sinh sản. Thuốc thể hiện độc tính trên sinh sản nói chung sẽ làm giảm số lượng và chất lượng tinh dịch, tác dụng của thuốc làm cải thiện khả năng sinh sản cũng sẽ được biểu hiện qua tinh dịch đồ. OECD trong các hướng

dẫn thử độc tính trên sinh sản đều yêu cầu cần có thông tin về tinh dịch đồ [10].

Các đánh giá về tinh dịch phải cung cấp thông tin về khả năng thụ tinh của tinh trùng. Các thông số quan trọng nhất liên quan đến khả năng sinh sản là số lượng tinh trùng và khả năng vận động của chúng. Ngoài ra, những thông số khác về tinh trùng cũng có thể được đánh giá là: Màu sắc, thể tích, pH, độ nhớt, tỷ lệ chết, tỷ lệ hình thái bất thường ... [4], [6]. Hiện nay, với thiết bị hiện đại có thể đánh giá được sâu hơn về chất lượng tinh trùng với các thông số như: Sự toàn vẹn của ADN màng tinh trùng, động học của tinh trùng thông qua phần mềm phân tích tinh trùng CASA (Computer assisted sperm analysis) [11].

Các thông số động học của tinh trùng được đánh giá gồm có: Vận tốc đường cong (curvilinear velocity- VCL, $\mu\text{m/s}$); vận tốc đường thẳng (straight line velocity- VSL, $\mu\text{m/s}$); vận tốc đường trung bình (average velocity path- VAP, $\mu\text{m/s}$); biên độ dao động đầu tinh trùng (amplitude lateral head- ALH, μm); độ tuyến tính (linearity- LIN; VSL/VCL); độ lắc (wobble- WOB, % VAP/VCL); độ thẳng (straightness- STR; VSL/VAP).

Những đặc điểm của tinh dịch bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố (giống, thức ăn, tình trạng sức khỏe, điều kiện nuôi, mùa thu và tần số...)

do vậy trong nghiên cứu cần chuẩn hóa những điều kiện trên hoặc tiến hành song song với lô chứng sinh

lý. Giá trị bình thường của tinh dịch thô được trình bày trong bảng sau [8].

Bảng 1. Giá trị bình thường của tinh dịch thô

TT	Thông số	Giá trị bình thường
1	Mật độ tinh trùng ($\times 10^6/\text{ml}$)	250- 600
2	% di động tiến tới	30- 90
3	Thể tích (ml)	0,3- 0,9
4	pH	7,1
5	VCL	80- 100
6	VSL	30- 50
7	VAP	50- 70
8	LIN	35- 80
9	STR	40- 80
10	ALH	2,0- 6,0

Bên cạnh những marker là số lượng và chất lượng tinh trùng, một số marker khác cũng có thể được phân tích trong tinh dịch là: Khả năng chống oxi hóa của tinh dịch [11] nồng độ testosterone trong tinh dịch...

4.5.3. Các marker khác

Thời gian phản ứng (một dấu hiệu của ham muốn tình dục (libido)) được ước tính bằng cách sử dụng đồng hồ bấm giờ, là khoảng thời gian từ khi đưa con cái vào chuồng con đực cho đến khi xuất tinh [8]; hoặc cũng có thể được tính đến khi con đực nhảy lên con cái đẩy mạnh cơ thể để thực hiện hành vi giao phối [4].

Phân tích các cơ quan: Gan, lách, thận, tim, phổi, tuyến tiền liệt, thể hang; các thông số về tinh hoàn như: Mào tinh hoàn; định lượng các hormon (testosterone và estradiol 17β), kẽm và cholesterol trong tinh hoàn [6]; khối lượng, đường kính,

thể tích và chiều dài tinh hoàn cũng rất có giá trị trong một số trường hợp.

4.6. Thụ tinh cho thỏ cái

Qua thụ tinh cho thỏ cái sẽ đánh giá được tỷ lệ thụ thai của thỏ cái; số con sinh ra của một thỏ cái; sự bất thường (nếu có) của thỏ con sau sinh... Việc thụ thai phụ thuộc vào nhiều yếu tố ngoài yếu tố quan trọng về số lượng và chất lượng tinh trùng; do đó việc đánh giá khả năng thụ thai khi thụ tinh cho con cái sẽ đánh giá được kết quả hay hiệu quả cuối cùng của sự tác động lên quá trình sinh sản. Điều này có thể có ý nghĩa trong việc ngoại suy khi nghiên cứu trên động vật qua người.

Hai phương pháp thụ tinh cho thỏ cái đều được áp dụng là thụ tinh (phối giống) tự nhiên [6], [7] và thụ tinh nhân tạo (Artificial insemination- AI). Tuy nhiên, thụ tinh nhân tạo giúp nhà nghiên cứu có thể dễ dàng chủ động và chuẩn

hóa được các yếu tố ảnh hưởng đến việc thụ tinh. Thụ tinh nhân tạo đã được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp nuôi thú thịt và trong nghiên cứu ở các nước Châu Âu từ những năm 80 của thế kỷ XX; nhưng tại Việt Nam, việc sử dụng AI còn rất hạn chế.

Trước khi thụ tinh (kể cả tự nhiên và nhân tạo) phải đảm bảo thú cái đang trong thời kỳ động dục. Thú cái có thể động dục tự nhiên hoặc được gây động dục. Mỗi thú cái có chu kỳ động dục khác nhau, không đồng thời cùng một thời điểm. Do đó, nếu để thú cái động dục tự nhiên thì trong trường hợp muốn thú cái sinh sản hàng loạt hoặc trong trường hợp nghiên cứu cần sử dụng cùng một lúc một số lượng thú cái đã động dục thì có thể

khó chọn đủ số lượng thú cái đáp ứng được yêu cầu. Có thể gây động dục cho thú cái bằng cách tiêm dưới da 20 đơn vị huyết thanh ngựa chữa (PMSG) 48- 56 giờ trước khi thụ tinh [11]. Để đảm bảo thú cái đã động dục, trước khi thụ tinh có thể kiểm tra sự chấp nhận của thú cái bằng thú đực đã cắt bỏ ống dẫn tinh.

Ngay sau khi thụ tinh (thường với thụ tinh nhân tạo) thú cái được gây rụng trứng bằng cách tiêm bắp 0,02 mg of GnRH [11] hoặc tiêm bắp 0,2 ml receptal (buserelin 0,004 mg/mL) [5].

Khi thụ tinh có thể sử dụng tinh dịch đông lạnh hoặc tinh dịch tươi đã pha loãng với dung dịch nuôi dưỡng, thường là dung dịch đệm Tris có thành phần như sau [8].

Bảng 2. Thành phần của dung dịch đệm Tris

Tris	3,029 g
Acid citric. H ₂ O	1,676 g
D-Glucose khan	1,250 g
Streptomycin	75,000 IU
Penicillin G	166,200 IU
Nước vô khuẩn	Vừa đủ 100 ml
pH	7,14
Áp suất thẩm thấu	299 mOsm/kg

Hoặc

NaCl	5,690 g
KCl	0,231 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,294 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,081 g
Na ₂ HPO ₄	0,040 g
NaHCO ₃	2,090 g
Na pyruvate	0,022 g
D-Glucose khan	0,900 g
Acid lactic	3,680 mL
HEPES	2,380 g
Streptomycin	75,000 IU
Penicillin G	166,200 IU
Nước vô khuẩn	Vừa đủ 1l
pH	7,40
Áp suất thẩm thấu	296 mOsm/kg

Đề thụ tinh nhân tạo, tinh dịch có thể được pha loãng 10 lần (1: 9) [11] hoặc pha loãng tới mật độ tinh trùng khoảng 20×10^6 tinh trùng/ml [5], hoặc 15×10^6 tinh trùng/ml. Thể tích tinh dịch đã pha loãng được thụ tinh cho con cái thường là 0,5 ml [5]. Sau khi thụ tinh, thỏ cái có thai có thể được xác định sau 12 ngày. Những thỏ cái chưa có thai có thể được thụ tinh lại sau 21 ngày. Tinh dịch sau khi pha loãng với môi trường có thể bảo quản ở nhiệt độ 18- 20°C từ 2- 4 giờ sau khi lấy tinh. Hoặc bảo quản ở 15°C trong thời gian tới 72 giờ [11].

V. ƯU ĐIỂM KHI SỬ DỤNG THỎ LÀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Có một số lợi thế khiến thỏ trở thành động vật rất phù hợp cho các nghiên cứu về độc tính và sinh sản được như: Trình tự gen của thỏ giống với trình tự gen của con người hơn so với của các loài gặm nhấm khác (chuột cống, chuột nhắt...). Thỏ là động vật nhỏ nhất và rẻ tiền nhất trong số các loại động vật có thể lấy tinh được bằng âm đạo giả, nên cho phép có thể phân tích, đánh giá tinh dịch ở nhiều thời điểm nghiên cứu (so sánh trước sau trong nghiên cứu). Với các nghiên cứu tiến hành trên chuột, chỉ lấy được tinh dịch ở thời điểm cuối cùng và phải giết chuột. Điều này cũng làm cho nghiên cứu trên chuột gặp bất lợi hơn về mặt y đức. Các quá trình sinh sản bình thường của thỏ, chu

kỳ của sự sinh tinh, sự chín (trưởng thành) của tinh hoàn đều đã được biết rõ. Con cái có thể được thụ tinh nhân tạo bằng tinh dịch lấy từ con đực để đánh giá tác động lên khả năng thụ thai, số lượng con trong một lứa đẻ, khả năng sống sót của con cái... Việc lấy máu đối với thỏ cũng dễ dàng và thuận lợi hơn so với chuột. Ngoài ra, thỏ là động vật khá dễ nuôi và chăm sóc.

VI. KẾT LUẬN

Tóm lại, thỏ là động vật phù hợp với nhiều nghiên cứu về độc tính và đánh giá tác dụng trên sinh sản đực. So với việc dùng chuột, sử dụng thỏ có một số ưu điểm vượt trội, đặc biệt: Thỏ là động vật nhỏ nhất và rẻ tiền nhất trong số các loại động vật có thể lấy tinh được bằng âm đạo giả; từ đó có thể thụ tinh nhân tạo cho thỏ cái để đánh giá tác động lên khả năng thụ thai, số lượng con trong một lứa đẻ, khả năng sống sót của thỏ con. Tuy nhiên trong quá trình thiết kế nghiên cứu cần chú ý lựa chọn đúng tuổi của thỏ; thời gian uống thuốc; các marker cần theo dõi, đánh giá đồng thời cần chuẩn hóa quy trình chăm sóc để hạn chế sự ảnh hưởng bởi điều kiện tiến hành thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bernd F., Pascale C. P., Christopher V., et al. (2012) Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144(1): 1-10.

2. **OECD (2018)** *Test No. 452: Chronic Toxicity Studies*.
3. **Đinh Quốc Hưng, Phạm Xuân Phong, Hà Xuân Minh và cs. (2023)** "Nghiên cứu độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của viên nang nhất gan linh trên động vật thực nghiệm". *Tạp chí Y học Việt Nam*, 532(2): 308-313.
4. **Khalifa A. W. H., El-Sisy G. A., El-Nattat W. S., et al. (2018)** Effect of water extract of dates palm (*Phoenix dactylifera*) on semen characteristics and oxidative status in serum of male New Zealand rabbits under heat stress. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 7(1): 22-26.
5. **Marco-Jiménez F. and Vicente J. S. (2017)** Overweight in young males reduce fertility in rabbit model. *PLoS One*, 12(7): e0180679.
6. **Zakaria A., Aida E. B., Sherief M. A. R., et al. (2017)** Effect of inhibition of estrogen synthesis or blocking its receptors on male rabbit reproduction *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 5(1): 34-41.
7. **Attia Y. A., Hamed R. S., Bovera F., et al. (2017)** Semen quality, antioxidant status and reproductive performance of rabbits bucks fed milk thistle seeds and rosemary leaves. *Animal Reproduction Science*, 184(178-186).
8. **International rabbit reproduction group (2005)** Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Science Journal*, 13(71-91).
9. **OECD (2018)** *Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents*.
10. **OECD (2011)** *Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study*.
11. **Johinke D., De Graaf S. P. and Bathgate R. (2014)** Investigation of *in vitro* parameters and *in vivo* fertility of rabbit spermatozoa after chilled storage. *Animal Reproduction Science*, 147(3): 135-143.