

Received Feb. 18, 2013; revised Mar. 25, 2013; accepted Apr. 15, 2013

Stem cell therapy is a promising therapy that figure out a new approach to treat diabetes mellitus. In this study, adipose derived stem cells were differentiated in vitro into insulin-producing cells by using chemical agents such as retinoic acid, nicotinamide and exendin-4, glucose. Then, we evaluated this differentiation process by appropriate assays.

The results showed that the induced cells expressed some characteristics of insulin producing cells as forming clusters like islet cells, positive staining with dithizon dyes, expressing of specific genes that related to insulin secretion, regulating insulin secretion by the change of glucose concentration.

Key words: stem cell therapy, diabetes mellitus, mesenchymal stem cells, insulin, adipose derived stem cell.

CHUẨN HÓA QUY TRÌNH TẠO CHUỘT THIẾU MÁU CHI SUY GIẢM MIỄN DỊCH

Vũ Bích Ngọc¹, Trịnh Ngọc Lê Văn¹, Phí Thị Lan¹, Bùi Nguyễn Tú Anh¹,
Tạ Thành Văn², Phan Kim Ngọc¹, Phạm Văn Phúc¹

¹Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh
²Đại học Y Hà Nội

Nhận bài 29/3/2013; sửa bài 5/4/2013; chấp nhận đăng 25/4/2013

Mục tiêu của nghiên cứu này là chuẩn hóa quy trình tạo chuột thiếu máu chi suy giảm miễn dịch. Trong nghiên cứu này, mô hình chuột vừa thiếu máu chi, vừa suy giảm miễn dịch được tạo bằng cách kết hợp các phác đồ hiệu quả nhất ở từng mô hình riêng lẻ. Chuột thiếu máu chi được tạo ra bằng cách đốt động mạch đùi và khảo sát hiệu quả trên hai độ tuổi chuột khác nhau là 3-5 tháng và 6-12 tháng. Chuột ở độ tuổi cho hiệu quả tạo mô hình thiếu máu chi cao được sử dụng trong khảo sát phác đồ suy giảm miễn dịch. Ở thí nghiệm tạo mô hình chuột suy giảm miễn dịch ba phác đồ (liên tục 4 ngày với các liều lượng khác nhau) được khảo sát. (1) cyclophosphomide 50mg/kg, (2) busulfan 20mg/kg kết hợp với cyclophosphomide 50mg/kg, (3) busulfan 40mg/kg kết hợp với cyclophosphomide 50mg/kg. Từ đó chọn ra phác đồ cho hiệu quả ổn định nhất. Mô hình chuột vừa thiếu máu chi, vừa suy giảm miễn dịch được tạo từ việc chọn lựa phác đồ tốt nhất từ mỗi mô hình trên. Kết quả cho thấy. (1) 100% chuột ở độ tuổi 6-12 tháng thích hợp hơn cho việc gây thiếu máu chi, (2) liều tiêm busulfan 20mg/kg kết hợp cyclophosphomide 50mg/kg liên tục 4 ngày, sau đó tiêm duy trì cyclophosphomide 50mg/kg 3 ngày/lần cho hiệu quả suy giảm miễn dịch cao nhất và duy trì ổn định trong 15 ngày; (3) việc kết hợp hai phác đồ trên đã tạo được mô hình chuột vừa thiếu máu chi, vừa suy giảm miễn dịch ổn định trong ít nhất 15 ngày.

Từ khóa: thiếu máu chi, suy giảm miễn dịch

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thử nghiệm trên động vật đã tạo ra những phát triển đáng kể trong nghiên cứu, cải thiện chất lượng sống của con người. Phương pháp điều trị các bệnh như tiểu đường, bại liệt đã được thực hiện thông qua nghiên cứu trên động vật; hiện chúng cũng được dùng trong nghiên cứu viêm gan, HIV, tế bào gốc và một

số bệnh khác. Giống như các bệnh khác, bệnh đông mạch chi dưới đang ngày càng được quan tâm, số người mắc bệnh có xu hướng gia tăng không chỉ ở Việt Nam mà cả trên toàn thế giới. Bệnh ảnh hưởng khá nhiều đến hoạt động sống của bệnh nhân, dễ gây nên nhiều biến chứng nguy hiểm như hoại tử và là dấu hiệu báo trước những nguy cơ cao

về tim mạch. Đây còn là gánh nặng cho gia đình và xã hội do chi phí chăm sóc, điều trị tốn kém và điều trị bệnh gặp nhiều khó khăn. Tuy nhiên, hiệu quả của các phương pháp điều trị còn rất hạn chế. Phẫu thuật hoặc can thiệp nội mạch có tác dụng đối với một số bệnh nhân ở giai đoạn sớm, nhưng kết quả lâu dài chưa thực sự khả quan. Do đó, nhu cầu phát triển các liệu pháp mới để chữa trị căn bệnh này là tất yếu.

Việc cấy ghép mô hay tế bào nhằm chữa trị bệnh là một hướng đi mới trên thế giới hiện nay và đang được cân nhắc như một liệu pháp mang lại hiệu quả lâu dài và ổn định [7], [10]. Tuy nhiên việc thử nghiệm các liệu pháp này trên người lại gặp một số vấn đề về rào cản y đức. Mặt khác, các mô hoặc tế bào ghép thường không lấy tự thân, mà được lấy từ đồng loại, đòi hỏi động vật sử dụng để cấy ghép phải không sinh đáp ứng miễn dịch thải ghép. Do đó, mô hình động vật thường được sử dụng nhằm hạn chế rào cản này.

Việc tạo thành công mô hình động vật vừa thiếu máu chi cục bộ vừa suy giảm miễn dịch nhằm đáp ứng cho các thí nghiệm về cấy ghép mô và tế bào trước khi liệu pháp này được ứng dụng thực sự trên người là một bước quan trọng. Kết quả của nghiên cứu sẽ là tiền đề và nền tảng quan trọng cho việc thiết lập các quy trình xây dựng mô hình chuột nhất trắng vừa thiếu máu chi vừa suy giảm miễn dịch mang tính ổn định cao.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mô hình chuột thiếu máu chi

Hiệu quả tạo mô hình chuột thiếu máu chi được so sánh giữa hai độ tuổi khác nhau: 3-5 tháng (lô 1), 6-12 tháng (lô 2). Chuột được gây tắc nghẽn mạch máu chi sau thông qua việc đốt điện đóng mạch đùi theo Higashi [7]. Để giảm khả năng gây tổn thương các vùng xung quanh, động mạch chi được thắt ở hai vị trí: phía trên và phía dưới ngã ba động mạch chi sau, điểm đốt điện nằm giữa hai vị trí thắt. Ở lô đối chứng (lô ĐC), mỗi đường nhỏ dài

1cm được rạch trên da chuột. Các vết thương sau đó được khâu lại. Chuột được chăm sóc ở điều kiện sạch. Các chỉ tiêu đánh giá được tổng hợp để xác định độ tuổi chuột cho hiệu quả tạo mô hình bệnh lý tốt nhất, là cơ sở để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Mô hình chuột suy giảm miễn dịch

Sau khi chọn được độ tuổi thích hợp cho việc tạo mô hình thiếu máu chi, chuột ở độ tuổi này được sử dụng để gây suy giảm miễn dịch. Phác đồ gây suy giảm miễn dịch được khảo sát như sau: lô I tiêm cyclophosphomide (CY) liều 250 mg/kg; lô II tiêm busulfan (BU) liều 20 mg/kg kết hợp với CY liều 50 mg/kg liên tục trong 4 ngày; lô III tiêm BU liều 40 mg/kg kết hợp với CY liều 50 mg/kg liên tục trong 4 ngày. Các chỉ tiêu đánh giá được tổng hợp để xác định phác đồ tạo mô hình chuột suy giảm miễn dịch hiệu quả nhất. Phác đồ này tiếp tục được sử dụng để khảo sát tần suất tiêm bổ sung CY liều 25 mg/kg nhằm duy trì sự ổn định tình trạng suy giảm miễn dịch trong một thời gian dài. Tần suất tiêm liều bổ sung được khảo sát như sau: (1) tiêm 2 ngày/lần; (2) tiêm 3 ngày/lần và (3) tiêm 4 ngày/lần.

2.3. Mô hình chuột vừa thiếu máu chi vừa suy giảm miễn dịch

Mô hình chuột thiếu máu chi với hiệu quả cao nhất được sử dụng kết hợp với mô hình chuột suy giảm miễn dịch ổn định trong thời gian dài trên cùng một cá thể với quy trình tương ứng để tạo chuột vừa thiếu máu chi, vừa suy giảm miễn dịch. Trong mô hình này, quy trình tạo chuột suy giảm miễn dịch được thực hiện trước khi tiến hành gây thiếu máu chi chuột.

2.4. Xác định số lượng bạch cầu tổng

Máu tĩnh mạch đuôi chuột được thu nhận vào ống mao quản. Tế bào hồng cầu được loại bỏ bằng dung dịch Red Blood Cell Lysis buffer 1X (Geneword, Việt Nam), sau đó đưa dung dịch vào buồng đếm Neubauer, chờ 3 phút để bạch cầu lắng và đếm dưới kính hiển vi so: ngược ở 4 khu vực góc.

2.5. Khảo sát công thức bạch cầu

Một giọt máu được thu nhận từ tĩnh mạch đuôi, trải đều trên lam kính và nhuộm với thuốc nhuộm Giemsa (Merck) trong 3 phút. Dựa vào hình dạng, kích thước và cấu tạo của nhân, màu sắc và kích thước các hạt bất màu thuốc nhuộm trong tế bào chất để phân loại và xác định tỷ lệ của các loại tế bào bạch cầu đa nhân trung tính, bạch cầu ưa acid, bạch cầu ưa base, bạch cầu lympho và bạch cầu đơn nhân.

2.6. Đánh giá tỷ lệ tế bào T_{CD4} .

Máu tĩnh mạch đuôi chuột được thu nhận vào ống lấy máu chứa sẵn chất chống đông, sau đó, bổ sung 2 ml dung dịch Red Blood Cell Lysis buffer 1X (Geneworld, Việt Nam), ly tâm 2 500 vòng/phút trong 5 phút, thu cận tế bào. Tiếp tục bổ sung 100 microlit PBS vào cận tế bào và huyền phù đều, sau đó thêm 10 microlit FITC Rat anti-mouse CD4 vào huyền phù tế bào, ủ trong tối 20 phút. Sau cùng, bổ sung thêm 300 microlit dung dịch FACS flow và tiến hành phân tích sự biểu hiện phát huỳnh quang của tế bào được đánh dấu bằng hệ thống Flow cytometry.

2.7. Đánh giá sự lưu thông máu qua mạch

Tiêm 0,1 ml thuốc nhuộm Trypan blue vào tĩnh mạch đuôi chuột. Theo dòng máu, thuốc nhuộm đi tới các cơ quan trong cơ thể ngoại trừ những vị trí phía sau vùng mạch bị tắc nghẽn. Như vậy, nơi dòng máu không đến được chính là nơi không quan sát thấy màu thuốc nhuộm.

2.8. Đánh giá hình thái chi

Sự thay đổi hình thái chi được đánh giá theo thang đo cấp độ tổn thương từ I đến IV do Takako [10] đề xuất. Đây là các đánh giá cảm quan bao gồm sự thay đổi màu sắc da, sự hoại tử mô dẫn đến rụng, mất móng và mất cơ. Theo thang cấp độ này, tổn thương được đánh giá cấp độ I khi chi có hiện tượng hoại tử hoặc teo tóp, khô đen từ phần móng đến hết ngón chân; cấp độ II khi tổn thương đến hết bàn chân; cấp độ III khi tác động đến khớp gối và cấp độ IV khi tổn thương dẫn đến

toàn bộ chi sau bị mất. Các chỉ tiêu này được quan sát tại các thời điểm: ngay sau khi thắt, sau 2, 4, 6, 12 giờ, sau 3,5,7 ngày và sau 2, 3, 4 tuần trên cả mô hình chuột thiếu máu chi lẫn mô hình chuột vừa thiếu máu chi vừa suy giảm miễn dịch.

2.9. Đánh giá cử động chi

Khả năng cử động của chi được đánh giá thông qua vận tốc di chuyển của chuột trên mặt đất cũng như khả năng đạp của chi sau khi đất trong bể nước.

2.10. Đánh giá độ phù nề của mô

Chỉ tiêu này được đánh giá thông qua tỷ lệ trọng lượng mô tươi so với mô sau khi sấy khô. Quy trình được tiến hành như sau: mô cơ đùi được thu nhận, sau đó cân để xác định trọng lượng mô ở trạng thái tươi và trạng thái mà trọng lượng mô không thay đổi sau khi sấy ở 78°C.

2.11. Nhuộm hóa mô

Mô cơ đùi được thu nhận trong khoảng từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 5 sau khi đốt động mạch. Mẫu mô được đông lạnh bằng dung dịch đông lạnh mô và cắt ngang với độ dày mỗi lát cắt là 5 μ m. Tiêu bản mô được nhuộm với thuốc nhuộm Hematoxylin và Eosin (Geneworld, Việt Nam) và đánh giá khi quan sát trên kính hiển vi điện tử.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát mô hình chuột thiếu máu chi (TMC)

Khả năng lưu thông máu sau tổn thương. Một giờ sau khi tiêm Trypan blue, trong khi chi không bị đốt mạch máu nhuộm có màu xanh (hình 1A) thì ngược lại, chi bị đốt mạch máu không nhuộm màu xanh mà có hiện tượng thâm tím trong vòng 1-2 giờ. Hiện tượng này là do động mạch đùi được đốt ở phía trên ngã ba động mạch - nơi phân phối máu chính cho toàn bộ chi sau - nên đã gây tắc nghẽn sự lưu thông của dòng máu đến các mô phía sau vị trí cắt. Do đó, thuốc nhuộm Trypan blue, cùng với sự tuần hoàn của các mạch máu không thể đến được những vị trí sau vùng mạch bị đốt, làm cho

các mô ở đây không bắt màu xanh của thuốc nhuộm. Nói cách khác, việc không quan sát được màu xanh tại những vị trí này chứng tỏ quá trình đốt mạch đã diễn ra thành công.



Hình 1. (A) Sự bắt màu thuốc nhuộm ở chi bị đốt mạch máu so với chi không đốt mạch; (B) Chi bị tím tái, (C) Chi bị hoại tử dẫn đến mất da, để lộ xương bàn chân, (D) Biểu đồ thể hiện sự phù nề của mô ở chuột bị đốt mạch máu.

Ở lô 1, tỷ lệ chuột thiếu máu chi đạt 70%, trong đó 20% tổn thương cấp độ I, 10% cấp độ II, 10% cấp độ III và cấp độ IV chiếm 30%. Tuy nhiên, sau 10 ngày, vẫn còn 30% số chuột không có dấu hiệu tổn thương. Ở lô 2, 100% chuột có dấu hiệu tổn thương ở các cấp độ khác nhau sau 10 ngày. Trong đó sự tổn thương ở cấp độ III (hình 1C) và IV chiếm tỷ lệ cao. 50% chuột tổn thương ở cấp độ III; 40% chuột tổn thương ở cấp độ IV; chỉ có 10% chuột tổn thương ở cấp độ I. Điều này cho thấy, chuột ở độ tuổi càng cao càng khó có khả năng hồi phục tổn thương như ở chuột non.

Việc cắt đứt nguồn cung cấp máu đã gây ra tình trạng thiếu oxy máu và thiếu máu mô ở vị trí sau vùng cắt. Để chống lại các tổn thương này, cơ thể luôn có xu hướng tiết ra các chất nhằm kích hoạt sự tăng sinh mạch máu và hình thành cấu trúc ống nhằm bù đắp lại nguồn máu bị mất. Sự phát triển của hệ thống mạch bàng hệ trong tình trạng thiếu máu cục bộ là một trong những quá trình xảy ra đầu tiên. Tùy theo sự phát triển của hệ thống mạch bàng hệ này mà khả năng cứu chữa mô tổn thương được tăng cường với cấp độ khác nhau. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy sự tái tạo mạch máu thật sự phải tạo ra các mạch máu có đủ 3 lớp lại thường không xảy ra ở hệ tim mạch của cơ thể trưởng thành. Trong khi đó, các nghiên

Sự thay đổi hình thái chi. Sau ba giờ đốt mạch máu, chuột ở cả lô 1 và lô 2 đều có hiện tượng tổn thương cấp độ I với các biểu hiện như chi bị sưng và tím tái (hình 1B).

cứu có liên quan đến việc đánh giá các tác động tân tạo mạch, sửa chữa mô hoại tử lại bỏ qua tiêu chí tuổi tác [10]. Một nghiên cứu do Ingraham và cs. [8] đã chứng minh ở động vật cao tuổi có sự suy giảm đáng kể sự hình thành mao mạch trong tình trạng thiếu oxy so với động vật non. Điều này cực kỳ quan trọng trong xác định các mô hình bệnh lý liên quan đến hệ mạch và bị tác động bởi độ tuổi. Như vậy, sử dụng chuột 6-12 tháng tuổi tạo mô hình thiếu máu chi cho hiệu quả cao hơn.

Kết quả đánh giá mức độ phù nề. Ở mô bình thường, tỷ lệ khối lượng mô ướt/mô khô là $3,45 \pm 0,09$ lần. Trong khi đó, sau 3 ngày đốt mạch máu, tỷ lệ này ở lô 1 là $4,30 \pm 0,09$ lần và ở lô 2 là $4,59 \pm 0,18$ lần ($p < 0,05$). Cả hai lô đều có sự khác biệt đáng kể so với lô đối chứng (hình 1D). Như vậy, việc thắt mạch máu đùi đã gây phù nề cho cả hai lô chuột. Tuy nhiên, không có sự khác biệt về mức độ phù nề của chi đốt mạch máu ở lô 1 so với ở lô 2. Điều này chứng tỏ, việc thắt mạch máu đã gây rối loạn trong hoạt động tuần hoàn của dòng máu, làm thay đổi sinh lý của các vùng không nhận được máu ở cả hai lứa tuổi.

Khi có tổn thương, sự giải phóng các chất trung gian dẫn đến sự giãn mạch với lưu lượng máu tăng cục bộ, sự thay đổi tính thấm mạch và sự tăng kích thước các khe hở giữa

tế bào nội mạc cho phép các protein huyết lượng và các tế bào đến ở viêm. Sự xuất huyết lượng dẫn đến phù nề tổ chức mô [2].

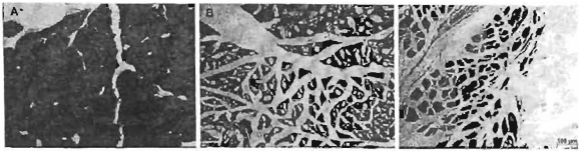
Khả năng cử động của chi trên mặt phẳng. Khả năng cử động của chi bị đứt mạch ở cả 2 ló chuột khảo sát đều giảm so với chuột bình thường. Từ 1 đến 3 giờ sau phẫu thuật, do ảnh hưởng của quá trình giải phẫu, các chi này cử động kém, chỉ lết theo sự di chuyển của cơ thể. Vì thế các đánh giá về khả năng cử động chi chỉ được tiến hành vào ngày thứ 2. Ở cấp độ tổn thương càng nặng, khả năng vận động của chi càng giảm. Hệ thống động mạch đùi, bao gồm động mạch, tiểu động mạch và các mao mạch chịu trách nhiệm phân phối máu với các chất dinh dưỡng và oxy cho các vùng cơ nhằm đảm bảo hoạt động bình thường của từng tế bào cơ nói riêng và hệ thống mô cơ ở những vị trí này nói chung. Khi tổn thương xảy ra làm gián đoạn một phần hay toàn bộ quá trình cung cấp máu, dẫn đến tình trạng thiếu máu cục bộ [6]. Mô không nhận được đầy đủ chất dinh dưỡng và oxy cho quá trình hô hấp và tồn tại làm cho hoạt động của mô giảm dần, các tế bào chết lan rộng dẫn đến tình trạng hoại tử. Mức độ hoại tử tăng dần theo thời gian, từ tổn thương và hoại tử ở móng, bàn chân, đến đầu gối và nặng nhất sẽ dẫn đến cụt chi. Tuy nhiên, do sự phân bố hệ thống mạch máu, đặc biệt là các mạch máu phụ không đồng nhất ở tất cả các cá thể khiến cho tình trạng hoại tử cũng diễn ra không đồng đều ở tất cả các chuột thí nghiệm. Đồng thời, quá trình thiếu máu cục bộ cũng khiến cho mô cơ dần dần không đảm bảo được chức năng của mình, dẫn đến khả năng cử động của chi cũng giảm dần theo mức độ tổn thương.

Thêm vào đó, quá trình phục hồi mạch ở chuột cũng rất phong phú và chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như tình trạng sinh lý, tình trạng sức khỏe, độ tuổi của từng cá thể. Trong đó, yếu tố độ tuổi chuột đóng vai trò quan trọng [3]. Chính vì điều này, thí nghiệm đã lựa chọn hai độ tuổi chuột khác nhau để

khảo sát mức độ thành công của quá trình tạo mô hình chuột thiếu máu chi. Chuột ở độ tuổi càng cao thì khả năng phục hồi mạch càng thấp. Ở cơ thể non trẻ, các tế bào đa số ở trạng thái khỏe mạnh để đáp ứng hữu hiệu với các kích thích của môi trường. Song song đó, lượng tế bào có khả năng sửa chữa tổn thương chiếm tỷ lệ cao. Khi xảy ra tổn thương bất kỳ, các tín hiệu nhằm kích hoạt quá trình sửa chữa và hàn gắn tổn thương nhanh chóng được giải phóng, huy động các yếu tố chuyên biệt hoạt động để đưa cơ thể trở về bình thường. Quá trình này diễn ra càng chậm khi cơ thể càng lão hóa. Khi quá trình lão hóa diễn ra, một số mô trong cơ thể như mô cơ, mô xương... bị thoái biến dần, trở nên lỏng lẻo và dễ tổn thương hơn. Do đó, ló chuột ở độ 6-12 tháng tuổi cho hiệu quả tạo mô hình tốt hơn với 100% số chuột tiến hành thí nghiệm đều có biểu hiện thiếu máu chi. Kết quả này cũng phù hợp khi các nghiên cứu khảo sát bệnh này trên người cho thấy, phần lớn bệnh về động mạch chi thường xuất hiện ở những người từ 50-60 tuổi [1].

Cấu trúc mô học. Ở mô cơ chuột bình thường, tế bào cơ được sắp xếp trật tự, quan sát rõ các bó cơ với lớp màng liên kết, cấu trúc mô khít, nhân tế bào nằm sát mặt trong màng sợi cơ với một hay nhiều nhân (hình 2A). Trong khi đó, ở cả 2 ló chuột thí nghiệm, với mỗi cấp độ tổn thương khác nhau, cấu trúc mô cũng có sự biến dạng khác nhau. Sau khi đứt mạch 2-3 ngày, cấu trúc sợi cơ không còn nguyên vẹn, màng tế bào vỡ làm nhân tế bào thoát ra ngoài, tế bào chết và nhân tiêu biến dần (hình 2B). Ở một số chuột bị hoại tử nặng, nhân tiến sâu vào tế bào chết, không nằm ở vùng rìa như ở các tế bào bình thường, tế bào co lại để lộ các khoảng trống giữa các tế bào liền kề (hình 2C).

Tóm lại, các kết quả nêu trên cho thấy, chuột 6-12 tháng tuổi có hiệu quả tạo mô hình cao hơn. Do đó, chuột ở độ tuổi này được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2. (A) Cấu trúc mô cơ bình thường; (B) Sợi cơ mất cấu trúc, tế bào chất và nhân tiêu biến; (C) Nhân tiến sâu vào tế bào chất.

3.2. Kết quả khảo sát mô hình chuột suy giảm miễn dịch (SGMD)

Liều lượng thuốc. Ở lô III 60% số chuột tử vong sau khi tiêm, trong khi ở các lô khác không có chuột tử vong. Do đó tiêm liều 40 mg/kg BU kết hợp với 50 mg/kg CY liên tục trong 4 ngày không tiếp tục sử dụng trong các

thí nghiệm tiếp theo. Ở 2 lô thí nghiệm còn lại, lượng bạch cầu tổng đều giảm tới mức thấp nhất vào ngày thứ 7 (N7/N0) nhưng có xu hướng phục hồi lại sau đó. Trong đó, tỷ lệ giảm bạch cầu ở lô II thấp hơn và khả năng phục hồi chậm hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với lô I (bảng 1).

Bảng 1. Sự biến đổi lượng bạch cầu tổng sau khi xử lý thuốc (%).

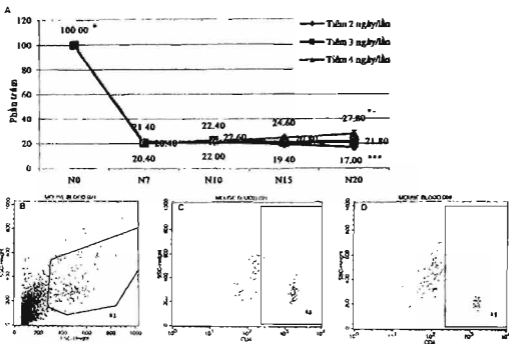
Lô thí nghiệm	Ngày N7/N0 (n = 5)	Ngày N20/N0 (n = 5)
Chuột bình thường	102,97 ± 6,3	106,08 ± 6,96
Lô 1	34,98 ± 2,53	91,12 ± 1,22
Lô 2	21,1 ± 2,98	51,33 ± 4,89

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,01$; ****, $p < 0,001$.

Sự giảm bạch cầu này cho thấy đã có tác động đáng kể của BU và CY tới sinh lý cơ thể. BU và CY là những hóa chất thường được phối hợp sử dụng để gây suy giảm miễn dịch không chỉ trên mô hình động vật mà còn cả trên người. Đây đều là những tác nhân alkyl hóa, tác động trực tiếp lên DNA, tạo ra các liên kết chéo bất thường giữa các phân tử DNA, từ đó kiểm hãm và gây rối loạn quá trình tổng hợp DNA [9]. Bình thường, CY ở trạng thái bất hoạt, khi được hấp thu vào gan CY biến đổi thành hợp chất có hoạt tính là acrolein và phosphoramidate còn BU lại có tác động trực tiếp [9]. Đặc biệt trong tủy xương, sự tác động của hai chất

này khiến các tế bào miễn dịch không tăng sinh đủ nhu cầu cơ thể dẫn đến hiện tượng suy giảm miễn dịch. Không chỉ ức chế các tế bào miễn dịch, BU và CY còn ảnh hưởng chung đến quá trình tăng sinh và phát triển của các tế bào khác trong cơ thể. Vì vậy, việc lựa chọn liều lượng thuốc phù hợp với thể trạng chuột đồng thời vẫn tạo được hiệu quả suy giảm miễn dịch đáp ứng yêu cầu cho các thí nghiệm cấy ghép cùng và khác loài là vấn đề quan trọng.

Với kết quả như trên, chuột được gây suy giảm miễn dịch với liều lượng thuốc như ở lô II cho hiệu quả tốt hơn và phác đồ này được sử dụng cho các đánh giá tiếp theo.



Hình 3. Sự biến đổi tỷ lệ (%) bạch cầu tổng sau khi tiêm tiêu duy trì (A) và sự thay đổi tỷ lệ tế bào T_{CD4}⁺ trong (B) máu ngoại vi, (C) trước khi tiêm thuốc suy giảm, (D) sau 15 ngày tiêm thuốc.

Khảo sát thời gian tiêm duy trì. Ở phác đồ tiêm 2 ngày/liều, số lượng bạch cầu tổng tiếp tục giảm đáng kể, còn 17,0% ± 1,05% (n = 5) trong khi việc tiêm 4 ngày/liều lại khiến bạch cầu có xu hướng tăng đáng kể 27,8% ± 2,35% (n = 5) (p < 0,05). Chỉ có phác đồ tiêm 3 ngày/liều giúp ổn định tình trạng suy giảm miễn dịch kéo dài đến ngày 20. Như vậy, phác đồ này được lựa chọn (hình 3A) cho các thử nghiệm tiếp theo.

Sự thay đổi công thức bạch cầu. Sau khi kết thúc quá trình tiêm thuốc, công thức bạch cầu có nhiều thay đổi. Ở ngày 15, bạch cầu lympho giảm 11,46%, tế bào mono tăng nhanh với tỷ lệ tăng 63,2% so với ban đầu. Tỷ lệ các loại bạch cầu khác không có sự thay đổi đáng kể. Điều này cho thấy, các thuốc gây suy giảm miễn dịch có tác động làm thay đổi tỷ lệ bạch cầu lympho và bạch cầu đơn nhân trong máu ngoại vi.

Tỷ lệ tế bào T_{CD4}⁺. Sau khi tiêm thuốc, tỷ lệ tế bào T_{CD4}⁺ giảm mạnh, từ 44,27 ± 0,83 %

ngày N0 xuống còn 15,65 ± 0,42 % vào ngày N15 (giảm 2,8 lần), p < 0,05 (hình 3).

Tế bào lympho là một quần thể bao gồm cả tế bào T và tế bào B trưởng thành lẫn chưa trưởng thành. Có thể phân biệt hai quần thể này thông qua sự biểu hiện của phân tử CD4 và CD8. Ở tế bào lympho T, sẽ có sự hiện diện một trong hai phân tử này, trong khi cả hai phân tử đều không biểu hiện ở tế bào lympho B. Tế bào với sự hiện diện của phân tử CD4 sẽ nhận diện các kháng nguyên được trình diện bởi phân tử MHC lớp II. Nếu quá trình gây suy giảm miễn dịch làm giảm số lượng bạch cầu, đặc biệt là tế bào T_{CD4}⁺ trong máu ngoại vi thì sẽ giúp việc cấy ghép tế bào trong quá trình điều trị bệnh thiếu máu chi diễn ra thuận lợi hơn. Bởi vì các tế bào không phải tự thân khi cấy ghép vào cơ thể được coi là kháng nguyên lạ, chúng sẽ được phân cắt và trình diện bởi phân tử MHC lớp II trên tế bào trình diện kháng nguyên và được nhận

diên bởi tế bào T_{CD4+} . Do vậy việc suy giảm số lượng tế bào T_{CD4+} giúp cơ thể giảm thiểu phản ứng thải loại trong quá trình cấy ghép.

Tổng hợp các kết quả về sự suy giảm bạch cầu tổng, sự thay đổi công thức bạch cầu, cũng như sự giảm tỷ lệ tế bào T_{CD4+} , cho thấy việc tiêm BU 20 mg/kg kết hợp CY và tiêm duy trì 3 ngày/lần, cho hiệu quả tạo mô hình suy giảm miễn dịch cao. Chính vì vậy, phác đồ này được sử dụng để tạo mô hình chuột vừa thiếu máu chi, vừa suy giảm miễn dịch.

3.3. Kết quả tạo mô hình chuột thiếu máu chi suy giảm miễn dịch (TMC-SGMD)

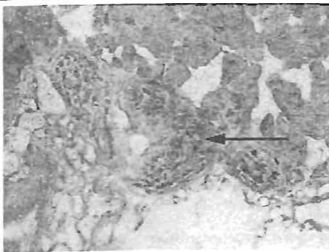
Sự thay đổi hình thái chi. Các biểu hiện tổn thương trên chuột TMC-SGMD diễn ra tương tự chuột TMC nhưng diễn tiến với tốc độ nhanh hơn và số lượng chuột tổn thương ở các cấp độ 3 và 4 cũng nhiều hơn (bảng 2). Mức độ phù nề giữa TMC-SGMD (tỷ lệ mô ướt/mô khô là $4,54 \pm 0,23$ lần) không khác biệt đáng kể khi so với chuột TMC ($p < 0,05$).

Bảng 2. Phần trăm chuột bị tổn thương ở các cấp độ khác nhau sau 10 ngày (%).

Cấp độ	0	1	2	3	4
Chuột TMC	0	10,00	0	50,00	40,00
Chuột TMC-SGMD	0	0	0	53,33	46,67

Đồng thời, kết quả nhuộm mô học cho thấy ở chuột TMC-SGMD xuất hiện nhiều ổ viêm hơn so với ở chuột TMC (hình 4) Điều này được lý giải như sau:

Thứ nhất, do trước khi gây thiếu máu chi, chuột đang ở tình trạng suy giảm miễn dịch. Ở trạng thái suy giảm miễn dịch, cơ thể sẽ không phản ứng hoặc phản ứng chậm với các tổn thương tác động nhằm tiêu diệt tác nhân có hại, phục hồi và sửa chữa tổn thương. Các dữ liệu lâm sàng liên quan tới khuyết tật trong hệ miễn dịch thực bào đã chứng minh hiện tượng này. Viêm là một đáp ứng miễn dịch tự nhiên của hệ miễn dịch trước sự tấn công của các tác nhân có hại như hoại tử do thiếu máu cục bộ và cho phép sự sửa chữa phục hồi tổn thương xảy ra. Cơ chế loại bỏ các vi sinh vật gồm đáp ứng miễn dịch tự nhiên xảy ra ngay lập tức sau khi vi sinh vật xâm nhập vào cơ thể. Những pha sớm này cho phép không chế nhiễm trùng trước khi tế bào lympho T của đáp ứng miễn dịch có khả năng can thiệp. Sự suy giảm lượng tế bào bạch cầu khiến tiến trình tiêu diệt tác nhân có hại bị rối loạn, kéo dài giai đoạn tồn tại của tế bào bạch cầu hạt trung tính tại ổ viêm hơn, tiến trình sửa chữa tổn thương chậm hơn so với thể trạng bình thường [2].



Hình 4. Cấu trúc mô của ổ viêm (mũi tên)

Thứ hai, tác động viêm gây ra những rối loạn chủ yếu về hóa tổ chức và tinh thẩm thành mạch, dẫn đến hiện tượng thoát huyết tương, cùng với nước được đẩy ra khỏi thành

mạch tạo thành dịch rỉ viêm, gây ra hiện tượng phù nề. Hiện tượng này không phụ thuộc hoặc phụ thuộc rất ít vào số lượng các tế bào miễn dịch trong cơ thể. Ví thể, mức độ phù nề trong thí nghiệm không có sự khác biệt đáng kể giữa chuột thiếu máu chi và chuột vừa thiếu máu chi vừa suy giảm miễn dịch [2].

Thứ ba, khi các hoạt động của hệ miễn dịch không diễn ra bình thường, khả năng sửa chữa mô hư hỏng cũng bị gián đoạn và rối loạn. Việc huy động các tế bào gốc đến vùng tổn thương để bù đắp những tế bào hoại tử giảm dần hoặc không đáp ứng đủ dẫn đến vùng mô hoại tử sẽ lan rộng theo thời gian khiến cấp độ tổn thương tăng dần từ hoại tử móng, ngón, bàn chân, cẳng chân và thậm chí mất toàn bộ chi [4]. Chính vì vậy, ở những mô phía sau vị trí bị tắc mạch, quá trình hoại tử diễn ra nhanh hơn so với chuột không SGMD. Mức độ tổn thương mô, tế bào, dẫn đến sự thay đổi, thoái hóa cấu trúc mô và tế bào tương tự chuột TMC.

Sự biến thiên các loại bạch cầu. Bạch cầu tổng trong các mô hình chuột TMC-SGMD có sự biến thiên giống như ở mô hình chuột SGMD. Tỷ lệ số lượng tế bào bạch cầu giảm nhanh đến ngày N7, còn $24,03 \pm 0,84\%$ và giữ ổn định đến ngày N20 ($23,09 \pm 0,39\%$). Đồng thời, so với chuột SGMD, công thức bạch cầu ở chuột TMC-SGMD cũng không có sự thay đổi đáng kể, đặc biệt là các tế bào lympho. Ngày N15, ở chuột TMC-SGMD tỷ lệ tế bào lympho đạt $56,78\% \pm 1,77\%$, giảm đáng kể so với ngày N0, trong khi tỷ lệ này ở chuột SGMD là $57,2\% \pm 1,85\%$. Khi phân tích tỷ lệ tế bào T_{CD4+} vào ngày thứ 15 cũng cho thấy có sự tương đồng trong sự thay đổi tỷ lệ tế bào lympho ở cả chuột TMC-SGMD ($19,96\% \pm 1,34\%$, giảm 2,2 lần so với ban đầu) và chuột SGMD.

Như vậy, việc tiến hành đối động mạch đùi sau khi kết thúc quá trình tiêm thuốc gây suy giảm miễn dịch nhằm tạo mô hình chuột vừa thiếu máu chi vừa suy giảm miễn dịch vẫn

đảm bảo được các tiêu chí đánh giá riêng biệt cho từng mô hình. Tình trạng suy giảm miễn dịch vẫn được duy trì ổn định với phác đồ đã lựa chọn, song song với các biểu hiện tổn thương của chuột thiếu máu chi diễn ra với tốc độ nhanh hơn.

4. KẾT LUẬN

Phác đồ tạo mô hình chuột 6-12 tháng tuổi bị thiếu máu chi sau khi tiêm BU liều 20 mg/kg kết hợp với CY liều 50 mg/kg liên tục trong 4 ngày, đồng thời tiêm liều duy trì CY 25 mg/kg với tần suất tiêm 3 ngày/liều đã tạo được mô hình chuột vừa thiếu máu chi, vừa suy giảm miễn dịch ổn định trong ít nhất 15 ngày

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Thắng (1999) Bệnh động mạch chi dưới. NXB Y học, Hà Nội
2. Phạm Hoàng Phiệt (2007), Miễn dịch-sinh lý bệnh. NXB Y học, tr 176–190.
3. Ashizuka S, Peranteau WH, Hayashi S, et al. (2006) Busulfan-conditioned bone marrow transplantation results in high-level allogeneic chimerism in mice made tolerant by in utero hematopoietic cell transplantation, *Exp Hematol.* 34(3):359–368.
4. Cooke JP (2008) Critical determinants of limb ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 52(5):394–396
5. Couffignal T, Silver M, Zheng LP, et al. (1998) Mouse model of angiogenesis *Am J Pathol.* 152(6):1667–1679.
6. Goto T, Fukuyama N, Aki A, et al. (2006) Search for appropriate experimental methods to create stable hind-limb ischemia in mouse. *Tokai J Exp Clin Med.* 31(3):128–132.
7. Higashi Y, Kimura M, Hara K, et al. (2004) Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 109(10):1215–1218.
8. Ingraham JP, Forbes ME, Riddle DR, et al. (2008) Aging reduces hypoxia-induced

microvascular growth in the rodent hippocampus. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 63(1):12–20.

9. Nelson DM, Ye X, Hall C, et al. (2002) Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity. *Mol Cell Biol.* 22(21):7459–7472.
10. Petcu EB, Smith RA, Miroiu RI, et al. (2010) Angiogenesis in old-aged subjects after ischemic stroke: a cautionary note for investigators. *J Angiogenesis Res* 2:26.

SUMMARY

Optimizing the procedure for preparing immune-deficient hind limb ischemia mouse model

Vu Bich Ngoc¹, Trinh Ngoc Le Van¹, Phi Thi Lan¹, Bui Nguyen Tu Anh¹, Ta Thanh Van², Phan Kim Ngoc¹, Pham Van Phuc¹

¹University of Science, Vietnam National University at Ho Chi Minh City

²Hanoi Medical University

Received Mar. 29, 2013; revised Apr. 5, 2013; accepted Apr. 25, 2013

The aim at optimizing the procedure for preparing an immune-deficient hindlimb ischemia mouse, a model of hindlimb in immunodeficient mouse is made by combining the most effective method for each model.

Hindlimb ischemia mouse model is made by burning the femoral artery and examined the effect on 3 to 5-month-old mouse and 6 to 12-month-old mouse. Mice with the best effective for hindlimb ischemia are used in the immunosuppression protocol. There were 3 groups set up in the study to create model of hindlimb ischemia, in which the dosages were as follows (injected for 4 days): (1) cyclophosphamide 50mg/kg, (2) busulfan 20mg/kg combined with cyclophosphamide 50mg/kg, (3) busulfan 40mg/kg combined with cyclophosphamide 50mg/kg, from which to select the most effective regimen for stability. The results showed (1) 100% of the mice in 6 to 12-month old mouse group showed more advantages when being used to make the hindlimb ischemia model; (2) busulfan 20mg/kg combined cyclophosphamide 50mg/kg for 4 days, then inject cyclophosphamide 50mg/kg 3 days/times for the highest efficiency immunodeficiency and effective immunosuppression was maintained stable for 15 days. (3) The combination of the two regimens have created a mouse model both hindlimb ischemic, immunodeficiency stable for at least 15 days.

Key words: limb ischemia, immune-deficiency

ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG CỦA KETAMIN LÊN CHỨC NĂNG VẬN ĐỘNG VÀ TƯƠNG TÁC XÃ HỘI CỦA KHỈ

Cần Văn Mão¹, Phạm Minh Đàm¹, Hisao Nishijo^{2,3}, Trần Hải Anh^{1,3}

¹Học viện Quân y

²Đại học Toyama, Nhật Bản

³Chương trình Asian Core, JSPS, Nhật Bản

Nhận bài 11/4/2013; sửa bài 15/4/2013, chấp nhận đăng 28/4/2013

Xây dựng mô hình bệnh tâm thần phân liệt trên động vật bằng sử dụng thuốc tác động lên hệ glutamatergic như phencyclidine, ketamin, MK801... là phương pháp được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng bán trường điển của ketamin lên hành vi xã hội của khỉ, làm cơ sở để xây dựng mô hình tâm thần phân liệt có rối loạn hành vi xã hội trên khỉ. Thử nghiệm thực hiện trên 8 khỉ (*macaca mulusta*) gồm 4 đực và 4 cái, cân nặng mỗi con từ 4 đến 6 kg, được chia ngẫu nhiên thành 4 cặp. Khỉ được tiêm ketamin (liều 0,3 mg/kg /ngày, tiêm bắp) trong