

MÔ HÌNH GÂY VIÊM KHỚP GÚT CẢI TIẾN TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM

NGUYỄN VINH QUỐC, NGUYỄN MINH HÀ
Viện Y học cổ truyền Quân đội

TÓM TẮT

Nghiên cứu xây dựng hai mô hình viêm khớp gút do rối loạn chuyển hóa purine. Gây tăng acid uric (AU) máu bằng phương pháp tiêm tinh thể monosodium urat (MSU) vào ổ khớp kết hợp tiêm phức mạc dung dịch acid oxonic (Nhóm mô hình A) hoặc hypoxanthin (Nhóm mô hình B) cho chuột cống trắng. Quan sát, theo dõi, đánh giá động thái vận động của chuột theo tiêu chuẩn cải tiến; định lượng AU máu bằng máy phân tích sinh hoá tự động; xét nghiệm mô bệnh học khớp cổ chân chuột nhằm đánh giá tình trạng tổn thương tại chỗ. Kết quả: Toàn bộ chuột ở nhóm mô hình B chết sau 24 giờ. Mức độ hạn chế vận động của chuột ở nhóm mô hình A tại các thời điểm 1 giờ, 12 giờ, 24 giờ đều cao hơn nhóm đối chứng, với $p < 0,001$. Nồng độ AU máu ở chuột nhóm mô hình A ($338,00 \pm 80,54 \mu\text{mol/l}$) cao hơn nhóm đối chứng ($58,67 \pm 15,86 \mu\text{mol/l}$) tại thời điểm 1 giờ sau tiêm, với $p < 0,001$. Hình ảnh mô bệnh học khớp chuột ở nhóm mô hình A thể hiện rõ viêm khớp cấp, hoại tử.

Từ khóa: mô hình thực nghiệm động vật; gút.

SUMMARY

A study to build up two models of gouty arthritis due to purine metabolism disorder. In the models, hyperuricemia was caused by injecting MSU crystals into glenes combining with injecting oxonic acid into peritoneum (model A) or hypoxanthin (model B) in white rats. Observe, follow up and evaluate rats' movement according to advanced standards; quantify uricemia with automatic biochemical analyzer; examine histopathologically rats' ankle joints to assess local damage.

Results: All rats in group of model B died after 24 hours. The level of movement restriction in group of model A at 1 hour, 12 hours, 24 hours were higher than those in the control group, with $p < 0.001$. Blood uric acid concentration in rats of group of model A ($338.00 \pm 80.54 \mu\text{mol/l}$) was higher than those in the control group ($58.67 \pm 15.86 \mu\text{mol/l}$) at 1 hour after injection, with $p < 0.001$. Histopathological images of rats' joints in group of model A showed clearly acute arthritis, necrotics.

Keywords: experimental animal model; experimental gout.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Gút là bệnh lý gây ra do sự lắng đọng các tinh thể Monosodium urat (MSU) trong tổ chức quanh khớp gây triệu chứng viêm điển hình trên lâm sàng với các biểu hiện Sưng - Nóng - Đỏ - Đau tại các khớp. Viêm khớp gút cấp tính điển hình trên lâm sàng biểu hiện bằng hai triệu chứng đặc trưng là viêm khớp và tăng acid uric máu. Tăng acid uric (AU) máu và bệnh gút gặp ở tất cả các nước trên thế giới. Theo số liệu điều tra về dịch tễ học, căn bệnh này chiếm khoảng từ 2 - 13% dân số. Tỷ lệ mắc bệnh có xu hướng ngày càng tăng trong quần thể. Tăng AU máu và bệnh gút có thể

để lại hậu quả rất nặng nề: giảm khả năng lao động, có thể gây các biến chứng nguy hiểm đối với thận, tăng huyết áp, có thể bị tử vong vì các biến chứng suy thận, nhiễm khuẩn cơ hội, suy mòn. Điều trị bệnh lý này còn nhiều vấn đề cần giải quyết. Việc xây dựng mô hình động vật thực nghiệm nghiên cứu bệnh lý gút góp phần rất quan trọng giúp các nhà y học lâm sàng tìm hiểu nguyên nhân, cơ chế gây bệnh và thử nghiệm các phương pháp điều trị nhằm tìm ra những liệu pháp điều trị có hiệu quả nhất với bệnh lý này.

Trước mắt do mô hình nghiên cứu gút trên thực nghiệm còn tồn tại những bất cập (mô hình gây tổn thương lắng đọng tinh thể urat tại khớp kiểu gút lại không làm tăng AU máu hoặc ngược lại), mô hình thực nghiệm cải tiến đã sử dụng phương pháp của Coderre có cải tiến kết hợp với hypoxanthin và/hoặc acid oxonic nhằm mục đích đồng thời trên động vật thực nghiệm xuất hiện cả hai triệu chứng đặc hiệu thường gặp của bệnh lý gút trên lâm sàng là viêm khớp gút và tăng AU máu.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Động vật thực nghiệm.

Chuột cống trắng Wistar 36 con, toàn đực, trọng lượng trung bình $200 \pm 20\text{g}$. Được cung cấp bởi Trung tâm nghiên cứu thực nghiệm động vật - Trường Đại học trung y dược Quảng châu - Trung Quốc. Sau khi được nuôi trong điều kiện chuẩn 1 tuần phân ngẫu nhiên thành 3 nhóm: Nhóm đối chứng, Nhóm mô hình A (nhóm acid oxonic), Nhóm mô hình B (nhóm hypoxanthin).

2. Hoá chất.

- Dung dịch Mono Sodium Urate (MSU): pha 6 ml NaOH 1M với 196 ml nước cất, đun nóng sau đó hoà tan 1g acid uric, dùng dung dịch HCl 1N chỉnh cho dung dịch có pH = 7,2. Giữ ở nhiệt độ 4°C trong 24 giờ, rửa và sấy khô ở nhiệt độ 70°C , nghiền tinh thể thu được thành dạng bột mịn, sàng qua rây cỡ lỗ 250 μm . Thu được tinh thể MSU.

Lấy 250 mg tinh thể MSU pha trong 9 ml dung dịch nước muối sinh lý, 1 ml Polysorbate 80. Đun nóng được 10 ml dung dịch MSU.

- Dung dịch acid oxonic 3%.

- Dung dịch hypoxanthin: Pha 2g hypoxanthin với 2 ml nước cất thu được dung dịch hypoxanthin 1g/ml.

3. Phương pháp tiến hành.

Các chuột ở nhóm mô hình A tiêm phức mạc dung dịch acid oxonic 3% liều 0,3 ml/100g thể trọng. Nhóm mô hình B tiêm phức mạc dung dịch hypoxanthin 1g/ml liều 1000 mg/Kg thể trọng. Cả hai nhóm sau tiêm 15 phút dùng bơm tiêm có kim cỡ số 4 tiêm 0,2 ml dung dịch MSU vào vị trí khớp cổ chân. Nhóm chuột đối chứng tiêm 0,2 ml nước muối sinh lý vào vị trí tương tự.

Chuột ở cả 3 nhóm sau 1 giờ và 24 giờ được lấy 1,5 ml máu hock mắt làm XN sinh hoá, đồng thời quan

sát các dấu hiệu lâm sàng của chuột. Ghi nhận đánh giá động thái vận động của chuột vào các thời điểm sau tiêm 1; 12 và 24 giờ.

4. Chỉ tiêu quan sát và đánh giá [1, 2].

4.1. Đánh giá động thái vận động của chuột theo tiêu chuẩn cải tiến:

- Cấp 0: Vận động hoàn toàn bình thường: 0 điểm
- Cấp 1: Đi lại tập tễnh, có lúc chuột biểu hiện co chân bị tiêm thuốc: 2 điểm
- Cấp 2: Vận động đi lại hạn chế, chân bị tiếp xúc thường xuyên co lên: 4 điểm
- Cấp 3: ảnh hưởng nghiêm trọng tới vận động của chuột, chuột đi bằng 3 chân, chân bị tiêm thuốc không bao giờ tiếp xúc với mặt đất: 6 điểm

4.2. Định lượng Acid Uric máu bằng máy phân tích sinh hoá tự động.

4.3. Xét nghiệm mô bệnh học khớp cổ chân chuột nhằm đánh giá tình trạng tổn thương tại chỗ.

5. Phương pháp thống kê.

Theo thuật toán thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0 for Windows.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Trọng lượng chuột các nhóm.

Bảng 1: Trọng lượng chuột các nhóm (X±SD)

Nhóm	Số lượng	TL (gam)	P(1-2; 1-3; 2-3) > 0.01
Đối chứng (1)	12	199.67 ± 13.59	
Mô hình A (2)	12	195.83 ± 16.91	
Mô hình B (3)	12	203.58 ± 13.69	

Nhận xét: Trọng lượng chuột ở các nhóm nghiên cứu khác biệt không có ý nghĩa với p > 0.01.

2. Động thái vận động của chuột.

Các chuột ở nhóm mô hình B sau tiêm phúc mạc dung dịch hypoxanthin 30 phút có biểu hiện mệt mỏi, lười vận động, đuôi sờ lạnh. Sau 24 giờ toàn bộ bị chết nên không XN được nồng độ AU máu sau 24 giờ cũng như đánh giá động thái vận động của các chuột trong nhóm này. Chúng tôi đã mổ xác quan sát đại thể nội tạng chuột bị chết nhận thấy Gan - Lách chuột đều biểu hiện xung huyết rõ, các quai ruột chướng đầy hơi. Do chuột nhóm mô hình B chết trong vòng 24 giờ sau khi gây mô hình nên không đạt yêu cầu của nghiên cứu, không lấy bệnh phẩm làm mô bệnh học. Chuột nhóm mô hình A và nhóm đối chứng sau tiêm phúc mạc không thấy biểu hiện bất thường.

Cả hai nhóm mô hình A và B sau tiêm dung dịch MSU 2 phút thấy xuất hiện tình trạng khớp cổ chân

Sưng - Nóng - Đỏ rất rõ khi so sánh với nhóm đối chứng tiêm dung dịch nước muối sinh lý, chuột đi lại tập tễnh, co chân đau không tiếp xúc với mặt đất. Tình trạng này kéo dài sau 24 giờ vẫn còn biểu hiện rõ. Trong khi đó, nhóm đối chứng chuột vận động trở lại bình thường sau 12 giờ tiêm ổ khớp.

Bảng 2: Điểm đánh giá động thái vận động của chuột ở các nhóm (X±SD)

Nhóm	n	1 giờ	12 giờ	24 giờ
Đối chứng (1)	12	2.33 ± 1.15	1.17 ± 0.39	1.08 ± 0.99
Mô hình A (2)	12	5.33 ± 0.78	3.67 ± 0.65	2.08 ± 0.79
Mô hình B		P(1-2) < 0.001	P(1-2) < 0.001	P(1-2) < 0.001
P (đối chứng 1h-12h) < 0.001; P (đối chứng 12h-24h) > 0.01				
P (mô hình A 1h-12h) < 0.001; P (mô hình A 12h-24h) < 0.001				

Nhận xét: Mức độ hạn chế vận động của chuột của nhóm mô hình A tại các thời điểm 1 giờ, 12 giờ, 24 giờ đều cao hơn nhóm đối chứng với p < 0.001. Nhóm đối chứng mức độ vận động ở các thời điểm 12 và 24 giờ không khác biệt. Nhóm mô hình A tại thời điểm so sánh sau tiêm 1 giờ và 12 giờ; sau tiêm 12 giờ và 24 giờ sự khác biệt về mức độ hạn chế vận động có ý nghĩa với p < 0.001.

3. Kết quả định lượng AU máu.

Bảng 3: Nồng độ AUric máu ở chuột tại các thời điểm nghiên cứu (̄omol/l) (X±SD)

Nhóm	n	01 giờ	24 giờ
Đối chứng (1)	12	58.67 ± 15.86	54.33 ± 13.52
Mô hình A (2)	12	338.00 ± 80.54	53.92 ± 14.83
Mô hình B (3)	12	980.17 ± 667.18	
		p(1-2) < 0.001; p(1-3) < 0.001; p(2-3) < 0.01	P (1-2) > 0,01

Nhận xét: Nồng độ AU máu ở chuột nhóm mô hình B cao hơn hai nhóm đối chứng và nhóm mô hình A tại thời điểm 1 giờ sau tiêm phúc mạc, Nồng độ AU máu ở chuột nhóm mô hình A cao hơn nhóm đối chứng tại thời điểm 1 giờ sau tiêm phúc mạc. Nồng độ AU máu trở về bình thường ở cả hai nhóm đối chứng và nhóm mô hình A sau tiêm phúc mạc 24 giờ với p > 0.01.

4. Kết quả xét nghiệm mô bệnh học.

Hình ảnh mô bệnh học khớp cổ chân chuột (HE x 400)	Kết quả mô bệnh học
 <p data-bbox="310 604 678 632">Hình 1. Hình ảnh khớp bình thường</p>	<p data-bbox="792 344 1365 527">Nhóm đối chứng thấy màng bao hoạt dịch mỏng chủ yếu là mô liên kết với nhiều bó sợi collagen chạy dọc, chéo. Mặt trong của bao sụn khớp được bao phủ bởi một lớp tế bào dạng biểu mô bề mặt rất trơn nhẵn. Mô sụn phía trong gồm nhiều hốc sụn nằm trên nền của sụn trong, mỗi hốc sụn gồm từ 2 - 8 tế bào sụn hình tròn hoặc bầu dục, bào tương bắt màu kiềm.</p>
 <p data-bbox="310 913 678 926">Hình 2. Hình ảnh viêm khớp cấp, hoại tử.</p>	<p data-bbox="792 653 1365 913">Nhóm mô hình A: nhận thấy màng bao hoạt dịch tăng sinh dày lên, khe khớp giãn rộng. Có những vị trí bao hoạt dịch bị phù nề, xung huyết, thậm chí hoại tử và tăng sinh mô liên kết, thâm nhiễm các tế bào viêm, trong đó gồm chủ yếu là các đại thực bào, bạch cầu đa nhân và có ít lympho bào. Lớp tế bào dạng biểu mô bề mặt phủ mặt trong của bao sụn khớp mất trơn nhẵn, có đoạn bị bong tróc. Mô sụn phía trong thấy các tổn thương thoái hoá hốc, đôi khi tổn thương cả tế bào sụn nằm trong hốc sụn.</p>

BÀN LUẬN VÀ KẾT LUẬN

Trong những năm gần đây, việc gây mô hình bệnh gút trên thực nghiệm chủ yếu là tiêm tinh thể MSU vào ổ khớp nhằm tạo mô hình viêm cấp tính hoặc tạo mô hình gây viêm nang khí vùng lưng chuột bằng MSU [3]. Các dạng mô hình này mặc dù có thể gây nên tình trạng bệnh lý tương tự cơn gút cấp, tuy nhiên lại không thể tạo nên tình trạng tăng AU máu - điều máu chốt trong cơ chế bệnh sinh của bệnh lý này. Như vậy không phù hợp với nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh bệnh gút, không thích hợp nghiên cứu cơ chế tác dụng của thuốc đối với bệnh lý. Trước mắt, đánh giá tác dụng của thuốc điều trị thông phong vẫn chủ yếu dựa trên mô hình thực nghiệm theo phương pháp Coderre [4]. Mô hình này kết hợp Carrageenin, lòng trắng trứng gà thực chất chỉ tạo ra phản ứng viêm không đặc hiệu và cũng không tương đồng với phản ứng viêm do rối loạn chuyển hóa trong bệnh thống phong ở người, các kết quả thu được qua nghiên cứu thuốc trên mô hình này chỉ phản ánh được thuốc có hay không tác dụng kháng viêm không đặc hiệu. Phương pháp thực nghiệm hay được sử dụng trong y học nhằm gây tăng AU máu chủ yếu là ức chế bài tiết hoặc cho động vật thực nghiệm ăn chế độ giàu Purine [5], các phương pháp này có nhược điểm là khó duy trì được tình trạng tăng AU máu, mặt khác lại không gây được viêm khớp gút. Tiêm phức mạc hypoxanthin cũng có thể tạo mô hình gây tăng AU máu trên thực nghiệm tuy nhiên thời gian duy trì ngắn, cao điểm lúc 1 giờ sau tiêm, sau 2 giờ giảm dần về mức bình thường. Tiêm phức mạc dung dịch MSU liều 1000 mg/kg thể trọng chuột nhất trắng sau 40 phút nồng độ AU máu có thể đạt tới giá trị $\pm 450 \text{ } \mu\text{mol/l}$. Acid oxonic có tác dụng làm tăng nồng độ AU trong máu nên được sử dụng để gây mô hình

tăng AU máu trên động vật thực nghiệm, thời gian duy trì nồng độ AU cao trong máu có thể kéo dài tới 5 giờ. Các mô hình này đều không thể đạt tới ngưỡng gây lắng đọng tinh thể urat tại tổ chức để tạo nên viêm khớp gút. Điều này được lý giải là do trong cơ thể động vật có vú đã có sẵn men urate oxydase có tác dụng thúc đẩy quá trình phân giải AU từ đó bài xuất ra khỏi cơ thể. Có thể thấy rằng hiện tại vẫn còn những bất cập trong xây dựng mô hình hội chứng tăng AU máu, bệnh gút cấp và rối loạn chuyển hóa AU. Do vậy, việc nghiên cứu xây dựng được mô hình viêm khớp gút trên cơ sở rối loạn chuyển hóa Purin gây tình trạng tăng AU máu là vấn đề hết sức cần thiết và có ý nghĩa khoa học.

Kết quả thu được từ mô hình thực nghiệm cải tiến thông qua đánh giá chức năng vận động, nồng độ AU máu được thực hiện tại trung tâm nghiên cứu thực nghiệm - trường ĐH Trung y dược Quảng châu theo chương trình hợp tác Quốc tế "Hợp tác nghiên cứu một số bài thuốc cổ phương để điều trị một số bệnh do rối loạn chuyển hoá trên thực nghiệm và lâm sàng" giữa Viện YHCT Quân đội - Bộ Quốc phòng và Trường Đại học Trung y dược Quảng Châu - Trung Quốc đã đồng thời đạt được cả hai tiêu chí cơ bản trong bệnh Gout là viêm khớp gút và tăng AU máu. Tuy nhiên nồng độ AU cao trong máu không tồn tại quá 24 giờ, điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây.

Nhóm mô hình B các chuột đều bị chết sau 24 giờ, điều này có thể giải thích do hypoxanthine rất khó hoà tan trong dung môi là nước cất, chỉ có thể hoà tan trong dung dịch HCl 0.5 N. Do vậy chúng tôi đã dùng dung dịch acid HCl 0.5N để hoà tan

hypoxanthine rồi tiêm phúc mạc, rất có khả năng chuột chết do đồng thời bị nhiễm toan chuyển hoá. Kết quả nhận xét đại thể cơ quan nội tạng chuột cũng đã phản ánh sơ bộ kết quả này.

Nhóm mô hình A sau khi tiêm dung dịch acid oxonic phúc mạc và MSU khớp cổ chân các chuột đều có biểu hiện lâm sàng và XN phù hợp với bệnh lý gút trên lâm sàng, mặt khác hình ảnh mô bệnh học đều có nhận xét các chuột khi tiêm MSU khớp cổ chân đều biểu hiện xung huyết mao mạch, xâm nhập tế bào viêm, phù nề bao hoạt dịch và hoại tử tổ chức ở các mức độ khác nhau, tuy nhiên chưa thấy hình ảnh tinh thể urat lắng đọng trong dịch ổ khớp. Qua kết quả thu được, chúng tôi mạnh dạn nhận định đã xây dựng mô hình thành công và đề nghị sử dụng mô hình này để đánh giá rối loạn chuyển hoá AU dẫn tới bệnh lý gút trên lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen SY, Chen CL, Shen ML et al. Clinical features of familial gout and effects of probable genecic association between gout and its related disorders [J]. *Metabolism*, 2001, Vol.50, No.5, Page 1203-1207.
2. Lý Nguyên Kiện. Phương pháp nghiên cứu trong y học [M]. Nhà xuất bản vệ sinh nhân dân - Bắc kinh. 2003, trang 226-228.
3. Thời Lạc, Từ Lập. Nghiên cứu hiện trạng và triển vọng xây dựng mô hình động vật thực nghiệm bệnh thống phong. *Tạp chí thực nghiệm động vật Trung Quốc*, 2006, Vol.14, No.1, Page 71-71.
4. Coderre TJ, Wall PD, Ankle joint Urat arthritis in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund adjuvant [J]. *Pain*. 1987; Vol.28, No.3; Page 379-393.
5. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction [J]. *Kidney Int*. 2005, 67: Page 1739-1742.