

MÔ HÌNH CHUỘT NHỒI MÁU CƠ TIM

ThS. PHẠM LÊ BỬU TRÚC

ThS. NGUYỄN THỊ PHƯƠNG DUNG

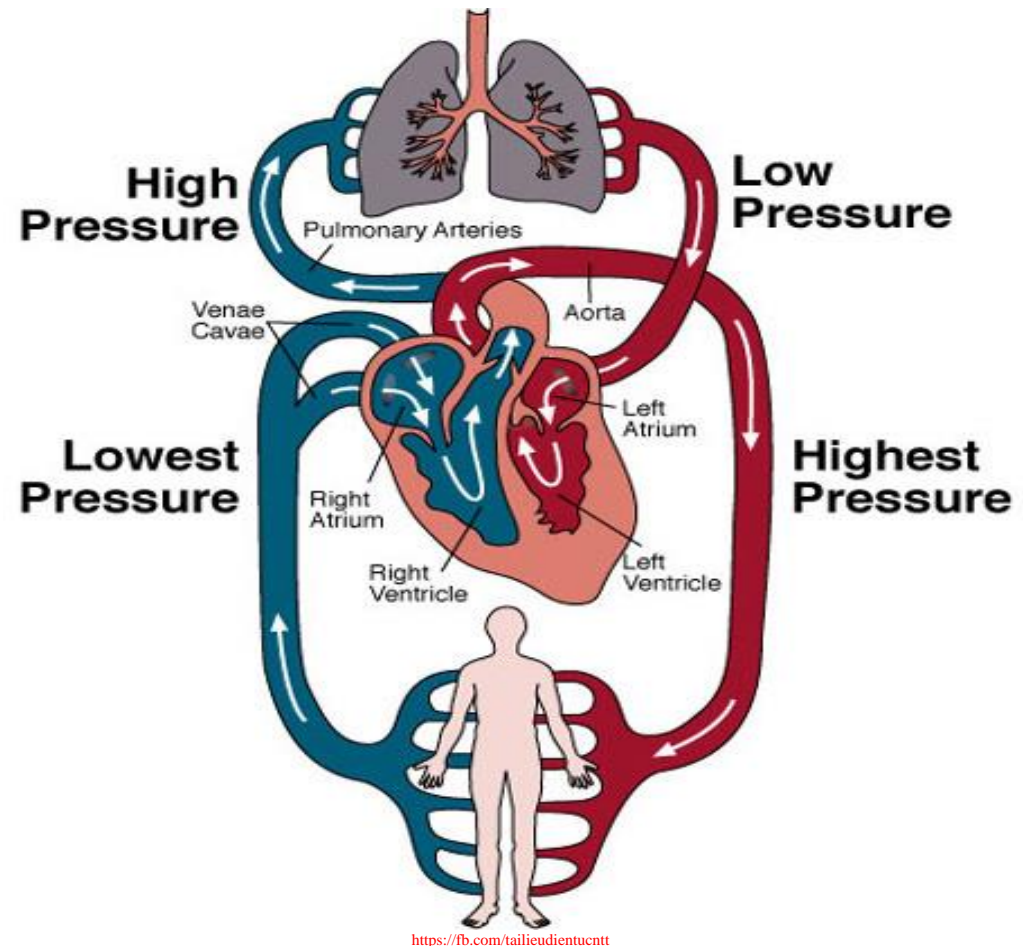
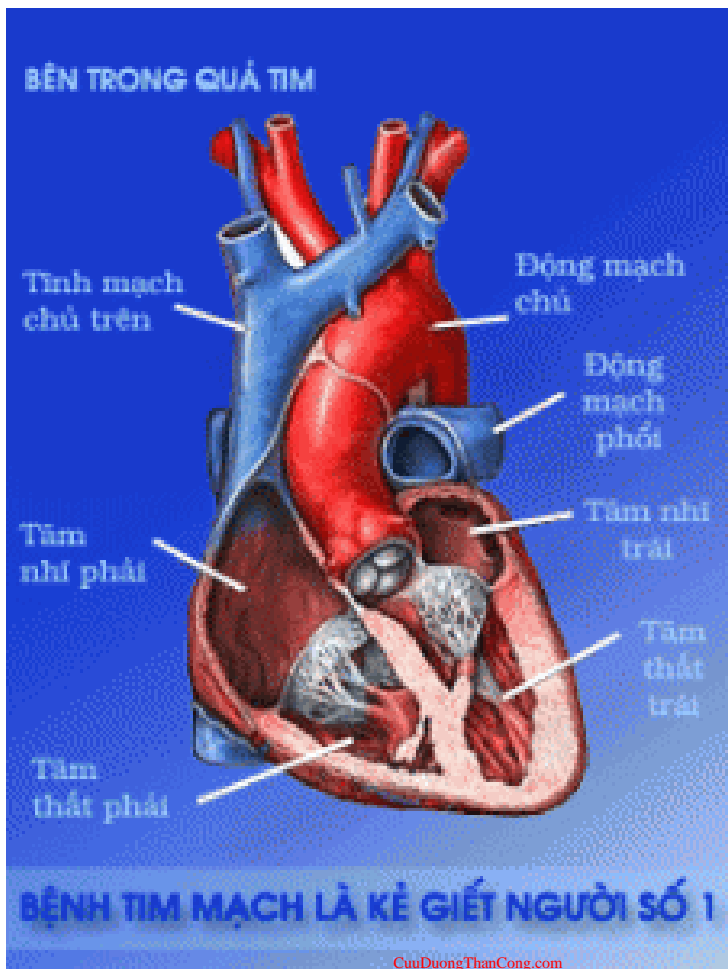


TP. HCM, 3-2015

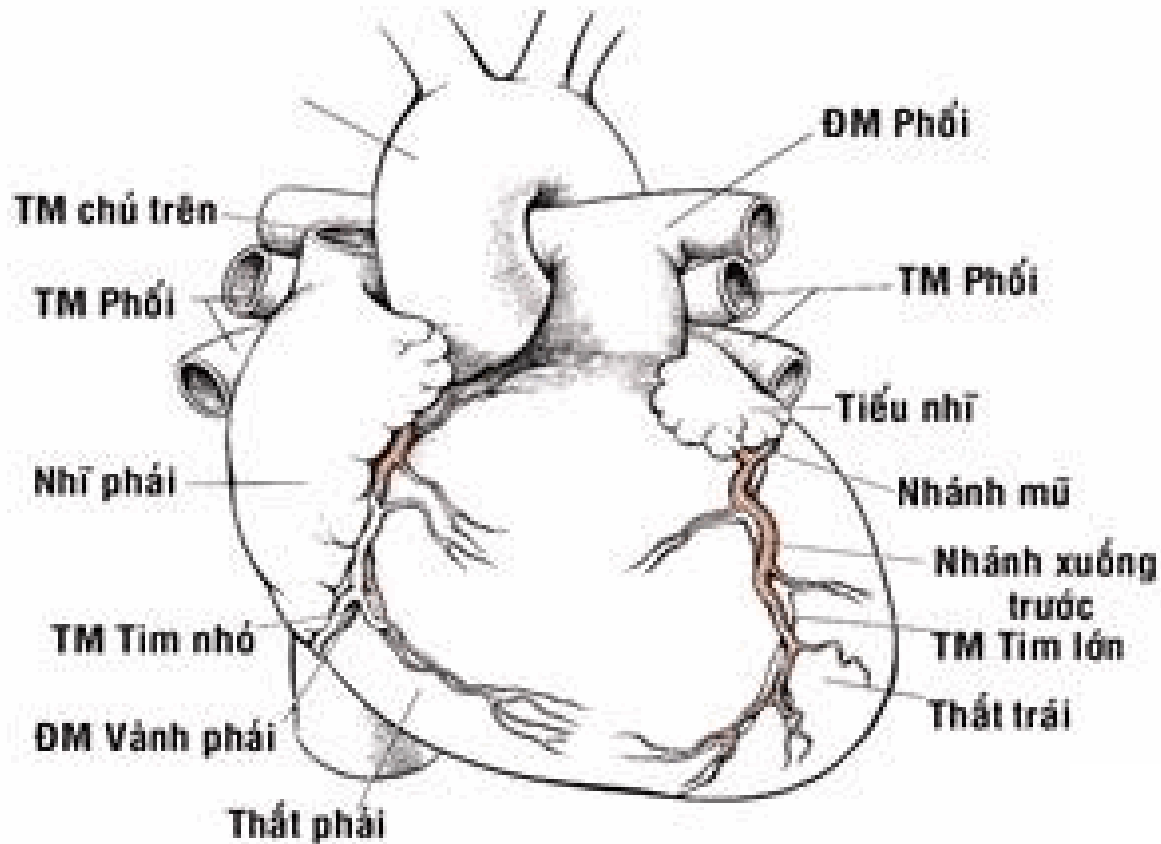
ÔN TẬP KIẾN THỨC CƠ BẢN

1. Cấu tạo và hoạt động của tim

2. Hệ tuần hoàn



ÔN TẬP KIẾN THỨC CƠ BẢN



Động mạch vành (Heart coronary artery- HCA)

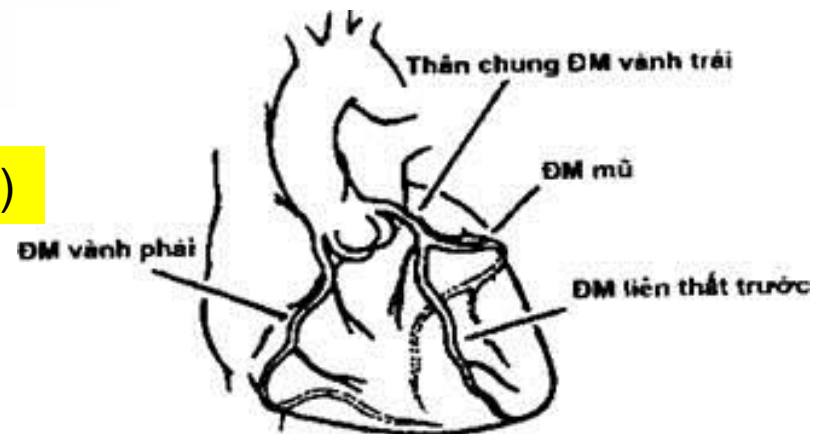
2 hệ thống mạch vành

động mạch vành phải

động mạch vành trái

nhánh động mạch mũ

động mạch liên thất trước



ÔN TẬP KIẾN THỨC CƠ BẢN

Chức năng

HCA có chức năng cung cấp máu nuôi tim, bảo đảm đáp ứng đầy đủ nhu cầu oxy của cơ tim ở tất cả các mức độ hoạt động của cơ tim. HCA phân nhánh thành hệ thống mạch dày đặc vào các lớp cơ tim nhằm phân phối oxy và các thành phần chuyển hóa khác một cách hiệu quả cho hoạt động sống của cơ tim đồng thời là con đường loại thải CO₂ và các sản phẩm sau quá trình trao đổi chất. Các nhánh của LAD đi vào trong các lớp cơ tim cung cấp máu cho 2/3 vách ngăn liên thất.

Bệnh lý tắc nghẽn mạch vành

LAD là nhánh động mạch vành thường xảy ra tắc nghẽn nhất. Do có chức năng cung cấp máu cho một vùng rộng cơ tim nên sự tắc nghẽn xảy ra trên LAD có thể dẫn đến nhồi máu cơ tim diện rộng (Myocardial Infarction_MI) hay ngừng tim dẫn đến tử vong.

ÔN TẬP KIẾN THỨC CƠ BẢN

Nhồi máu cơ tim là một thuật ngữ chỉ tình trạng hoại tử cơ tim, do nguyên nhân thiếu máu cục bộ.

Nhồi máu cơ tim cấp tính là nguyên nhân gây chết cao nhất và phổ biến nhất trong tất cả các trường hợp chết liên quan đến tim mạch

Hậu quả của quá trình nhồi máu là người bệnh nếu sống sót sẽ phát triển suy tim do sự hoạt động bù quá mức trong một thời gian dài

Có nhiều phương pháp điều trị suy tim sau nhồi máu, tuy nhiên hiệu quả chưa cao và khả năng tái nhồi máu ở người bệnh rất cao

Việc nghiên cứu tạo mô hình động vật phù hợp là vô cùng cần thiết nhằm làm sáng tỏ hơn cơ chế phức tạp của bệnh đồng thời hỗ trợ đánh giá và thử nghiệm các phương pháp chữa trị mới, hiệu quả hơn cho các bệnh nhân suy tim sau nhồi máu

ÔN TẬP KIẾN THỨC CƠ BẢN

phân loại dựa theo bệnh sinh

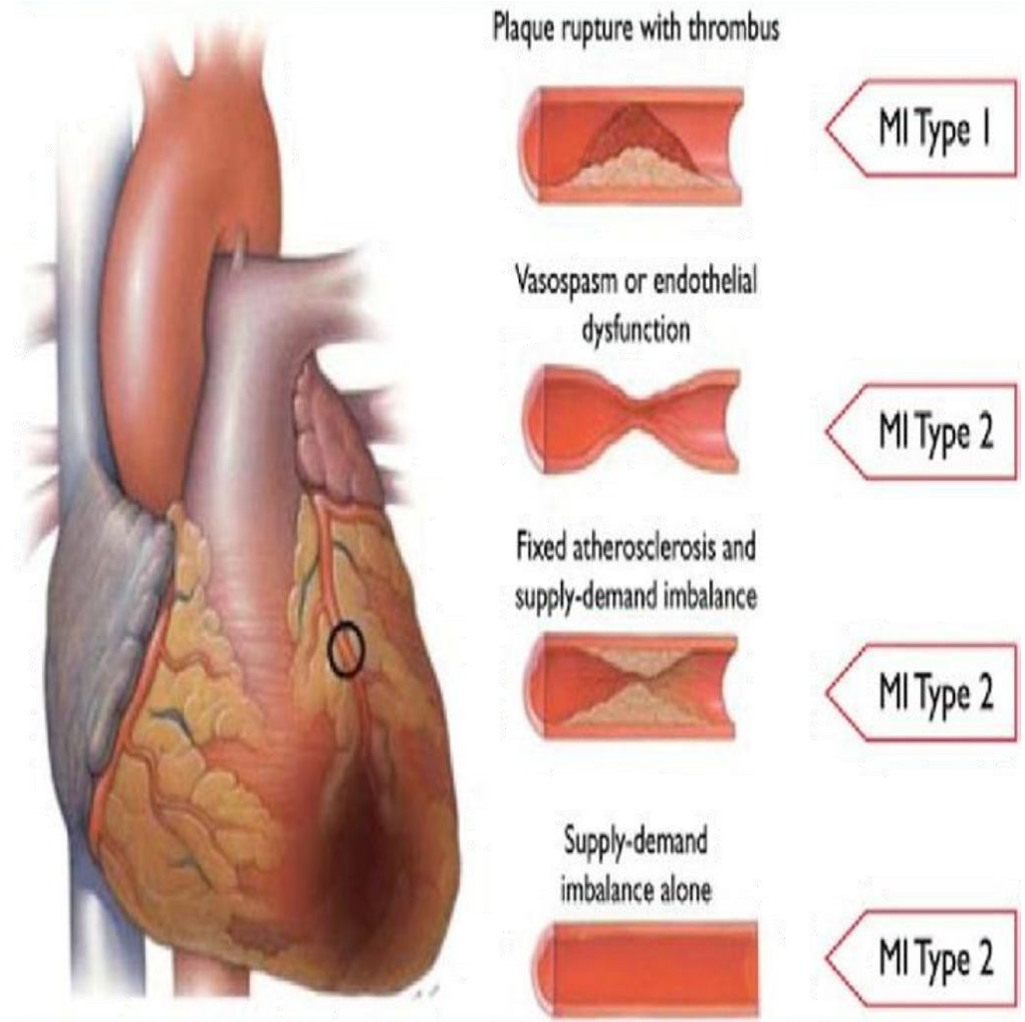
Nhồi máu nguyên phát

Nhồi máu thứ phát

rối loạn chức năng nội mạc mạch vành, co thắt mạch vành, loạn nhịp nhịp nhanh hoặc chậm, thiếu máu cục bộ cơ tim, suy hô hấp, tụt huyết áp, và tăng huyết áp có hoặc không kèm phì đại thất trái. Co thắt mạch vành và rối loạn chức năng nội mô cũng có khả năng gây ra MI

Nhồi máu cơ tim dẫn tới tử vong trong trường hợp không thay đổi men tim

Nhồi máu cơ tim liên quan đến can thiệp mạch vành



Các loại MI do mạch vành (loại I và II)

BỆNH TIM MẠCH

Nhồi máu cơ tim được định nghĩa trong bệnh học là sự chết tế bào cơ tim do tắc nghẽn nhánh HCA dẫn đến thiếu máu cục bộ kéo dài. Tính đến năm 2012, MI vẫn được thống kê là một bệnh rất phổ biến và là nguyên nhân gây chết và mất sức lao động hàng đầu trên thế giới . Thiếu máu cục bộ cấp hay mãn tính liên quan đến tắc nghẽn các nhánh của HCA có thể tác động tiêu cực đến hoạt động cơ và hoạt động điện của tim cuối cùng dẫn đến rối loạn nhịp tim và suy tim (Heart failure_HF).

BỆNH TIM MẠCH

Đặc điểm lâm sàng

Không giống các bệnh tim khác, **điểm đặc biệt trong MI là tình trạng rối loạn chức năng vùng**. Chính chức năng của từng vùng thành tim là yếu tố quyết định quan trọng đến chức năng co bóp chung của toàn bộ thất trái

Các nghiên cứu thực nghiệm và lâm sàng cho thấy, chức năng tim, nhất là **chức năng thất trái ở bệnh nhân MI thường bị suy giảm nghiêm trọng** và đây là yếu tố quan trọng trong tiên lượng bệnh. Về kích thước thất trái ở các bệnh nhân sau MI, **đường kính thất trái cuối tâm trương và cuối tâm thu ở các bệnh nhân sau MI lớn hơn** rõ so với người bình thường.

Hiện tượng giãn thất này xảy ra ngay sau nhồi máu cơ tim và tăng dần theo tháng năm. Sự giãn ra của vùng cơ thất bị tổn thương đã làm giảm thể tích tổng máu của tim có thể gây giãn cơ tim vùng không MI kết quả dẫn đến **giãn tâm thất không hồi phục**

Sinh lý bệnh

Cơ chế tổn thương tế bào cơ tim

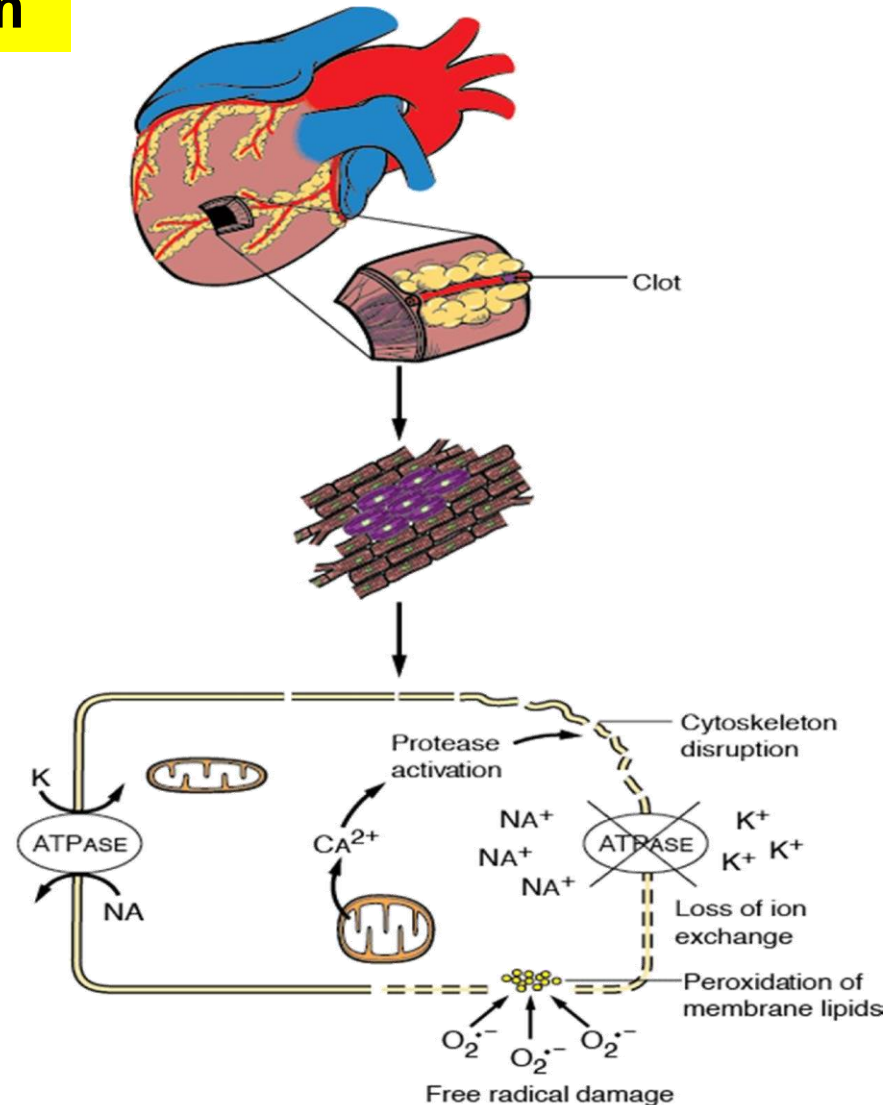
các tổn thương thành tế bào dẫn đến

mất chức năng của các bơm trao đổi ion

mất chức năng của ty thể dẫn đến sự
phồng lên và phóng thích canxi dự trữ

canxi hoạt hóa các protease sẽ phá
hủy các cấu trúc khung xương tế bào

Các sản phẩm chuyển hóa trong quá
trình apoptosis, necrosis như **acid
lactic, acid pyruvic và các gốc tự do**
làm thay đổi tính thấm của màng tế
bào gây rối loạn sự trao đổi ion qua
màng dẫn đến suy giảm chức năng tế
bào cơ tim.



Sinh lý bệnh

Tiến triển sau nhồi máu

mất chức năng cơ cơ trong **60 giây**

mất khả năng sống còn cơ tim xuất hiện **20-40 phút** sau khi dòng máu tắc nghẽn hoàn toàn

Sau 40 phút, vùng nhồi máu bắt đầu lan rộng ra vùng thiếu máu cục bộ xung quanh

Ổ nhồi máu gồm **3 vùng** lồng vào nhau: ngoài cùng là vùng thiếu máu cục bộ, tiếp theo là vùng tổn thương và trong cùng là vùng hoại tử

Sau MI, mô liên kết, nguyên bào sợi bắt đầu xuất hiện và tiết collagen hình thành vùng sẹo mỏng có thể làm phình thành tâm thất

Vùng không hoại tử diễn ra quá trình tái cấu trúc cơ tim

Nếu qua cơn nhồi máu, vùng nhồi máu sau một thời gian sẽ hình thành **mô sẹo**

Thời gian tiến triển sang HF sớm hay muộn phụ thuộc vào kích thước vùng nhồi máu và các biến chứng xảy ra trong giai đoạn cấp tính

Sinh lý bệnh

Giải phẫu mô bệnh học MI

Tổn thương đại thể: Trong **12 giờ đầu** sau MI, vùng tim thiếu máu sẽ có biểu hiện nhạt màu. Vào **ngày 2-3**, vùng hoại tử sẽ chuyển sang màu vàng nhạt và phân biệt rõ hơn vào **ngày 5-6** khi có sự xung huyết nhẹ ở bờ vùng quanh ổ nhồi máu. Quá trình liền sẹo ở bệnh nhân sau MI kéo dài 4-6 tuần đối với ổ nhồi máu nhỏ và **2-3 tháng** đối với ổ nhồi máu lớn. Lúc này, sẹo nhồi máu lớn và thành thất mỏng đi

Tổn thương vi thể: sau **24 giờ**, có hiện tượng xâm nhiễm của các tế bào bạch cầu đa nhân trung tính quanh vùng nhồi máu. **Sau 3-5 ngày**, các tế bào vùng hoại tử mất dần nhân và vỡ vụn. Các tế bào viêm tràn ngập tiết ra các cytokine nhằm thu hút các tế bào viêm khác nhằm ngăn chặn quá trình viêm tiến triển. Đồng thời với quá trình xâm lấn này, các đại thực bào và nguyên bào sợi cũng xuất hiện ở vùng rìa. **Sau 1 tuần**, bạch cầu đa nhân có xu hướng giảm, thay vào đó là mô hạt được hình thành với các mạch máu mới cùng sự thâm nhiễm của các lympho bào và tương bào. **Ở tuần thứ 2**, các nguyên bào sợi được tăng cường và thay dần tổ chức bị hoại tử đồng thời tăng tiết collagen hình thành mô sẹo. Quá trình liền sẹo **kéo dài 4-8 tuần** tùy thuộc vào kích thước vùng nhồi máu, chủ yếu là quá trình tăng tiết collagen của các nguyên bào sợi

Ý nghĩa, vai trò

Mô hình động vật trong nghiên cứu tim mạch

Các mô hình động vật MI và HF hiện nay dựa chủ yếu trên cơ chế của bệnh mạch vành: sự hẹp, tắc nghẽn HCA dẫn đến tình trạng giảm hoặc ngưng tưới máu đến một phần cơ tim, vùng tế bào cơ tim này sau đó hình thành ổ hoại tử và mất chức năng dẫn đến các vùng khác của tim phải hoạt động bù, quá tải và suy kiệt chức năng tim.

Theo đó, nhiều chiến lược và nghiên cứu khác nhau được thực hiện với mục tiêu làm hẹp hay tắc nghẽn động mạch vành trên động vật phòng thí nghiệm. Ít nhất 30 mô hình suy tim khác nhau được thực hiện trên hơn 11 loài bằng nhiều phương pháp khác nhau: áp dụng chế độ dinh dưỡng, thao tác gene, sử dụng các loại thuốc gây độc và các phương pháp phẫu thuật.

Ý nghĩa, vai trò

Mô hình chuột trong nghiên cứu tim mạch

giá thành thấp, tăng sinh nhanh chóng, nhiều đặc điểm sinh lý tương đồng với người, sự hiểu biết sâu sắc và chi tiết về bộ gene, khả năng thao tác trên bộ gene chuột để tạo ra các con chuột biến đổi di truyền, chuột đã trở thành loài động vật nhỏ được ưa chuộng nhất trong các nghiên cứu tạo mô hình

tim chuột được xem là có **tính tương đồng cao** với tim người cả về giải phẫu lẫn sinh lý so với các loài động vật thí nghiệm khác

sự phát triển của các kỹ thuật như ghi điện tâm đồ có độ phân giải cao trên chuột, các thiết bị xác định huyết áp chuột không xâm lấn cho phép đánh giá chính xác chức năng tim, xác định kích thước vùng nhồi máu và định lượng tính chất của MI đã tăng sự thu hút của các con vật này trong nghiên cứu bệnh tim mạch trong đó có suy tim sau nhồi máu

Các phương pháp tạo mô hình

Tạo mô hình bệnh suy tim bằng hóa chất

Doxorubicin (DOX) là một tác nhân kháng khối u được sử dụng cho những bệnh nhân có khối u ác tính. Tuy nhiên nó cũng đồng thời có những tác dụng phụ trong đó có gây tổn thương cơ tim và phát động gây HF

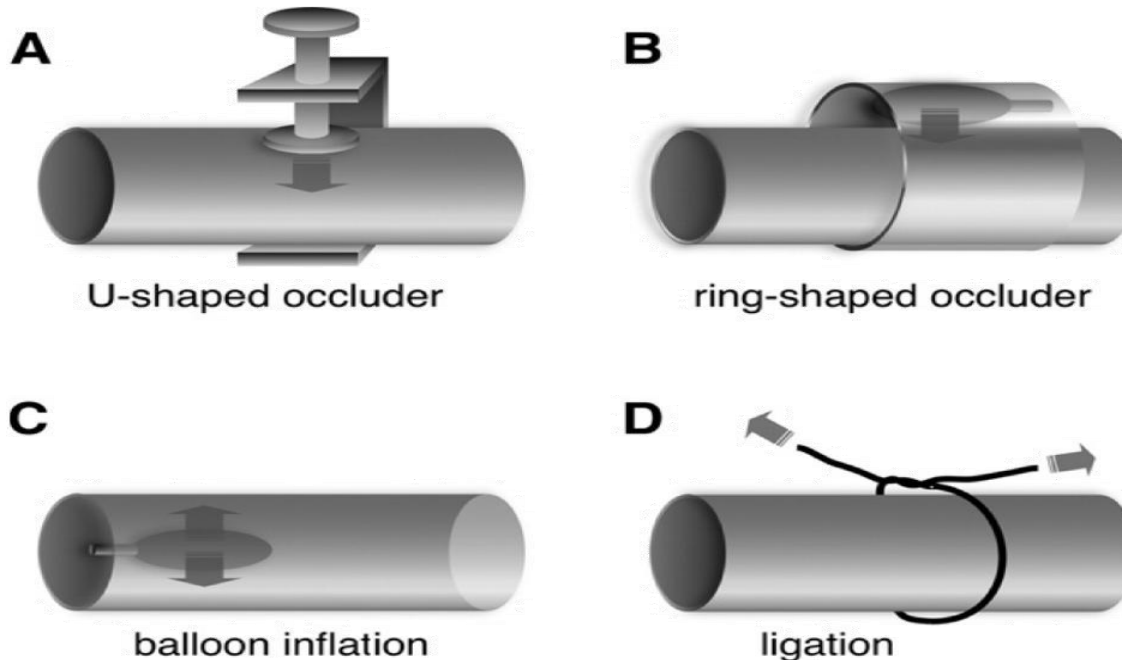
DOX gây ra tổn thương cơ tim thông qua một số cơ chế như làm rối loạn nghiêm trọng chức năng của ty thể, rối loạn chuyển hóa năng lượng, tích tụ chất béo và làm tổn thương DNA phá vỡ tín hiệu dẫn truyền liên quan đến sự tổng hợp các phân tử apoB

một số hóa chất khác như **Ethanolm, Homocysteine**

đơn giản, tuy nhiên khả năng **ứng dụng không cao** do không biết trước thời gian và tần số xuất hiện bệnh

Các phương pháp tạo mô hình

Kỹ thuật làm thuyên tắc hoặc co khít mạch máu



(A) Tắc nghẽn động mạch vành sử dụng thiết bị hình chữ U; (B) Thiết bị gây tắc mạch máu dạng vòng; (C) Bóng trong mạch gây tắc nghẽn (D) Thắt mạch máu bằng chỉ phẫu thuật

Các phương pháp tạo mô hình

Tạo mô hình bằng phương pháp gây tổn thương lạnh

một mẫu kim loại đường kính 3mm được làm lạnh đến -196°C trong Nitơ lỏng và được chạm trực tiếp vào thành tâm thất trái 10 giây.

Quá trình này được thực hiện **2 lần** trên cùng **một vị trí** tim chuột

Kết quả quá trình tạo tổn thương này dẫn đến đáp ứng viêm, tăng cường quá trình lành vết thương tuy nhiên sự tái cấu trúc cơ tim rất thấp dẫn **đến ít ảnh hưởng đến chức năng tim**

Các phương pháp tạo mô hình

Biến đổi và knockout một số gen liên quan đến sự sinh bệnh

Connexin 43

metalloproteinase 7 (MMP-7)

S100A1

sự phát triển bệnh khá **chậm**

sự biến đổi di truyền **tác động không chuyên biệt** vào một nhóm tế bào nào cũng gây khó khăn không nhỏ trong nhận định hiệu quả tác động trên một nhóm tế bào liên quan trực tiếp đến bệnh cần nghiên cứu

khả năng **chết** sau sinh rất cao

Các phương pháp tạo mô hình

Phương pháp tạo mô hình bằng thắt động mạch vành

Nguyên tắc

LAD là nhánh mạch vành dễ xảy ra tắc nghẽn nhất và là vị trí tắc nghẽn gây tổn thương nặng nề nhất gây MI cấp tính và HF

Khi LAD tắc nghẽn, tại vùng tim được cung cấp máu phía sau đoạn mạch thủ phạm sẽ diễn ra quá trình MI cấp tính và hình thành ổ nhồi máu

Nếu đối tượng **sống sót** qua cơn nhồi máu, các tế bào hoại tử ở vùng cơ tim này sẽ kích thích quá trình viêm và tái cấu trúc mô cơ vùng nhồi máu. Các hoạt động tăng cường của cơ tim được diễn ra ban đầu có chức năng hỗ trợ hoạt động của tim nhưng theo thời gian sẽ làm suy yếu chức năng tim dẫn đến HF.

Các phương pháp tạo mô hình

Phương pháp tạo mô hình bằng thắt động mạch vành

Các tiêu chuẩn đánh giá cơ bản

Các phương pháp đánh giá thường **tập trung vào sự thay đổi cấu trúc và chức năng tim** tiến triển qua các giai đoạn từ thiếu máu cục bộ đến HF

Đánh giá **huyết động** bằng phương pháp ghi nhận biến đổi huyết áp, nhịp tim, điện tâm đồ

Đánh giá **mức độ tổn thương cơ tim** và dấu hiệu suy tim bằng phương pháp enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) đo men tim (troponin I, troponin T) trong mẫu máu bệnh phẩm

Đánh giá quá trình **tái cấu trúc và biến đổi cấu trúc cơ tim** bằng phương pháp nhuộm lát cắt mô với thuốc nhuộm Hematoxylin và Eosin (H&E) hoặc nhuộm Trichrome

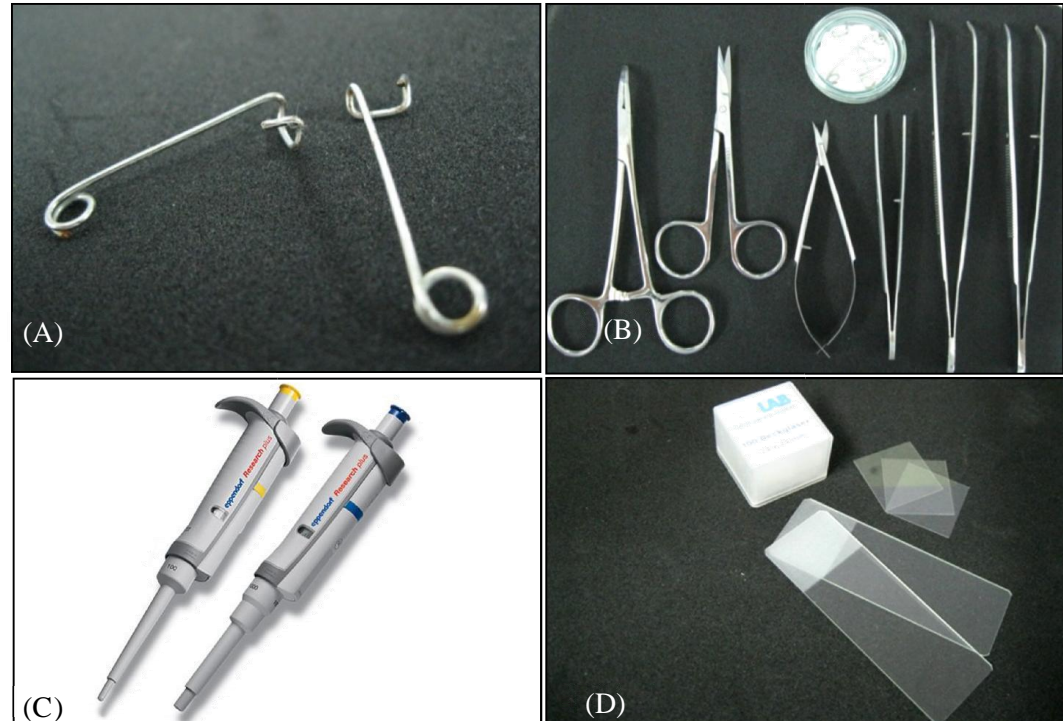
Đánh giá **phản ứng viêm và sự chết tế bào** bằng nhuộm hóa mô miễn dịch với kháng thể chuyên biệt hoặc định lượng bằng ELISA

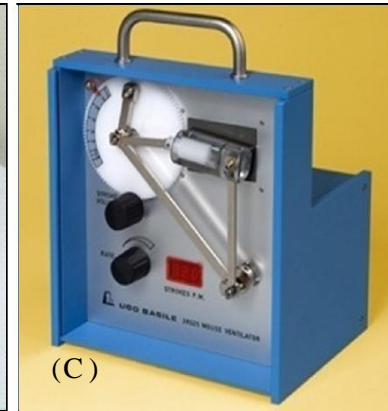
Vật liệu

Chuột nhắt trắng *Mus musculus* Var. Albino 10-14 tuần tuổi; 23-28g



(A) Dụng cụ mổ lồng ngực; (B) Bộ dụng cụ giải phẫu; (C) Micropipette; (D) Lame và lamelle





Chất gây tê: Lidocain 0,02 g/ml

Chất gây mê: Ketamin 0,022g/ml

Paraformaldehyde (PFA) 4%

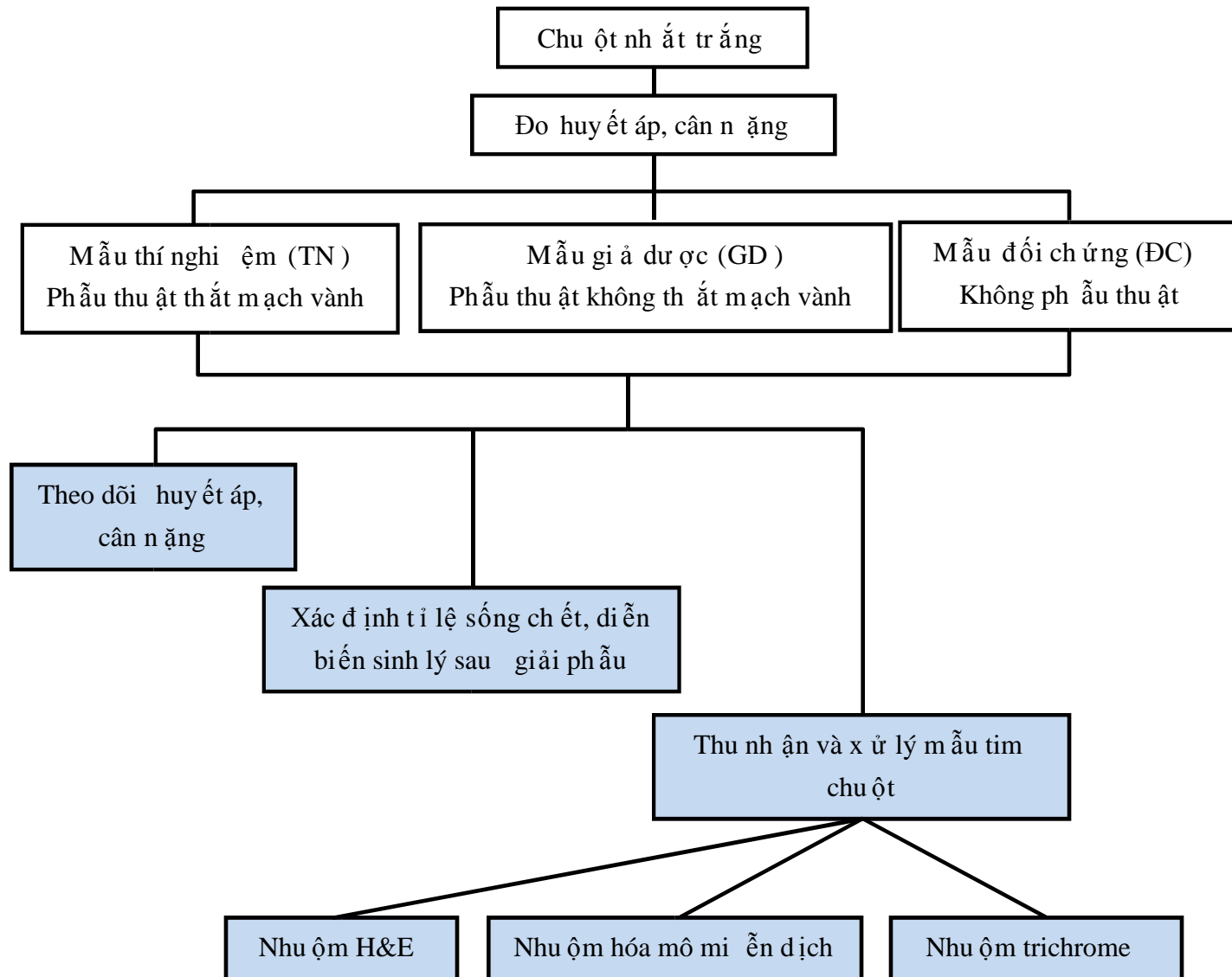
Hóa chất nhuộm H&E

Hóa chất nhuộm hóa mô miễn dịch

Annexin V-FITC (fluorescein isothiocyanate) -Abcam

Hóa chất nhuộm Trichrome

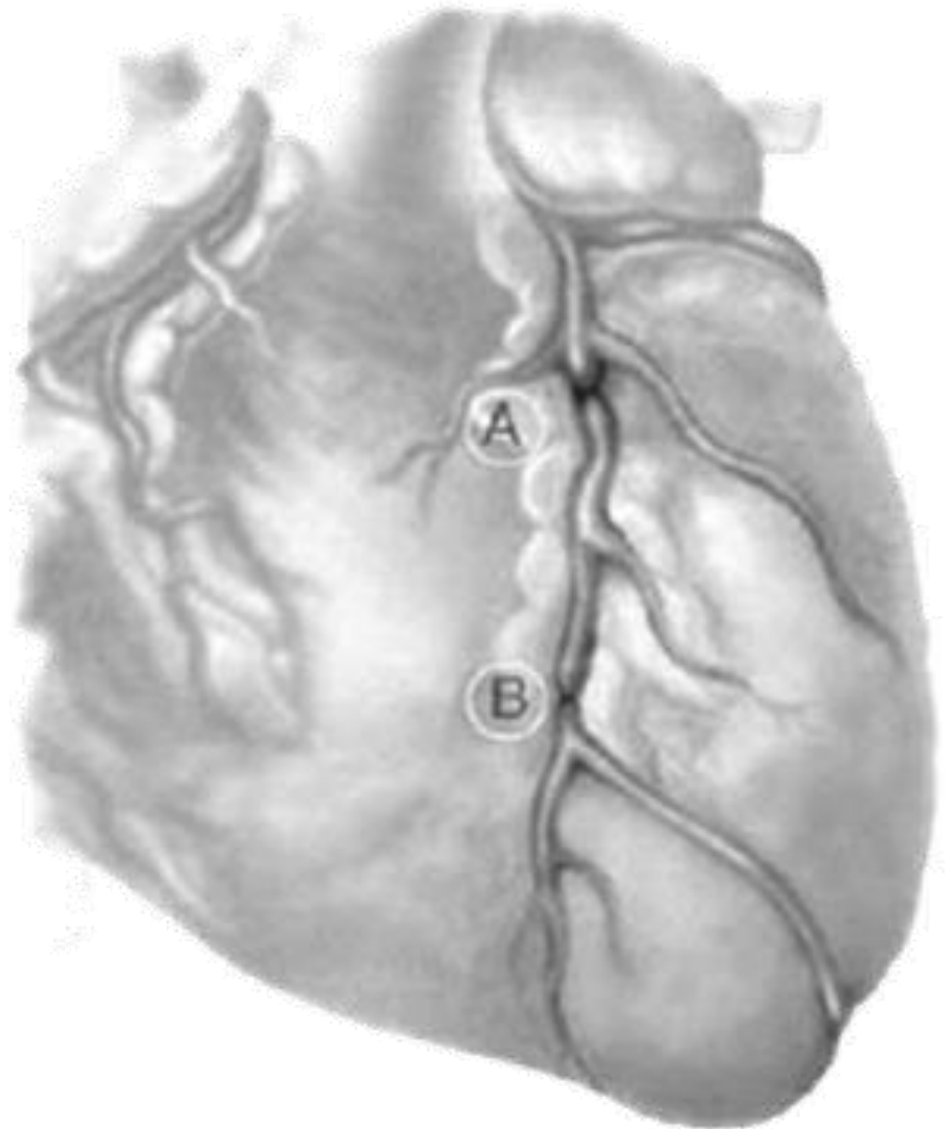
Tóm tắt phương pháp thực hiện



Phương pháp

Thắt mạch vành

Thắt mạch vành được thực hiện nhằm **gây tắc nghẽn đột ngột** mạch máu nuôi tim. Phương pháp này dựa trên bệnh sinh của bệnh lý nhồi máu cơ tim và suy tim cấp là **sự tắc nghẽn mạch vành do sự dày lên của các mảng xơ vữa hay sự tắc nghẽn bởi mảng xơ vữa lưu thông trong mạch máu đến vị trí hẹp**. Sau khi lồng ngực được mở, LAD được **thắt không phục hồi tạo điều kiện cho quá trình nhồi máu xảy ra** ở vùng cơ tim không được cung cấp máu.



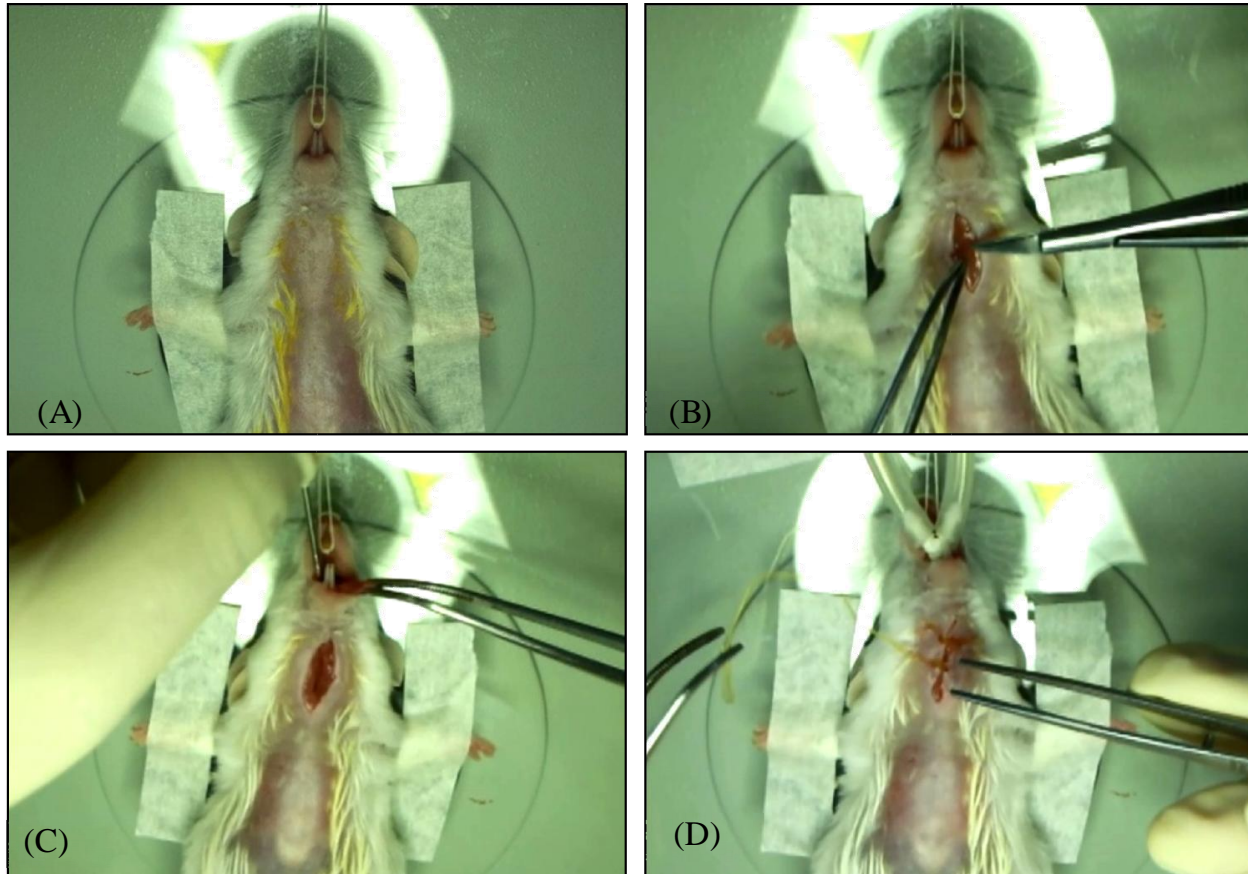
Phương pháp

* Chuẩn bị tiền phẫu

- Trước khi gây mê 24 tiếng, chuyển chuột vào chuồng sạch với nước sạch và loại bỏ thức ăn nhằm tránh trường hợp thức ăn chưa tiêu hóa kịp trong lúc giải phẫu sẽ ảnh hưởng đến khả năng hồi phục sau giải phẫu
- Cân chuột và tiến hành đo huyết áp, ghi nhận số liệu
- Gây mê chuột
- Cố định cơ thể chuột ngửa trên tấm ổn nhiệt
- Làm sạch lông vùng cổ và vùng sườn trái của chuột
- Sát trùng một lần với cồn 70% và 2 lần bằng dung dịch Povidine

Phương pháp

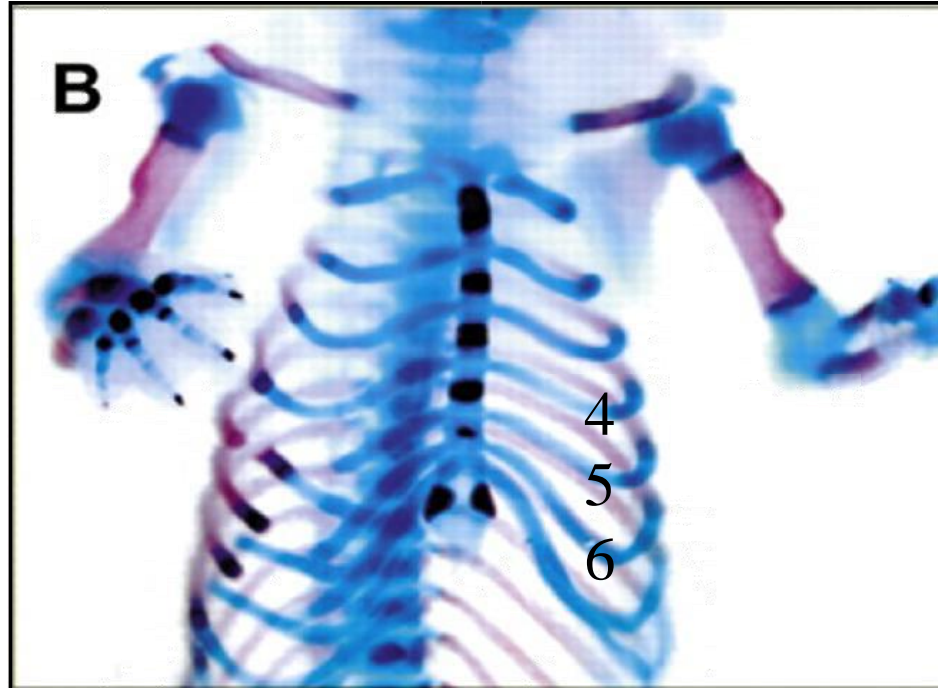
* Đặt nội khí quản



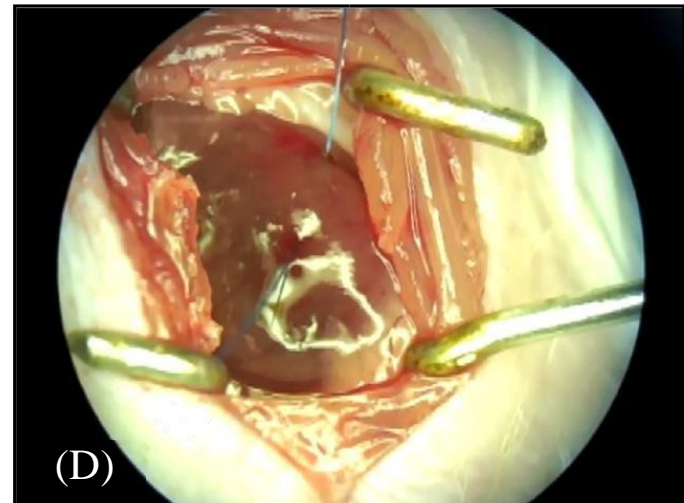
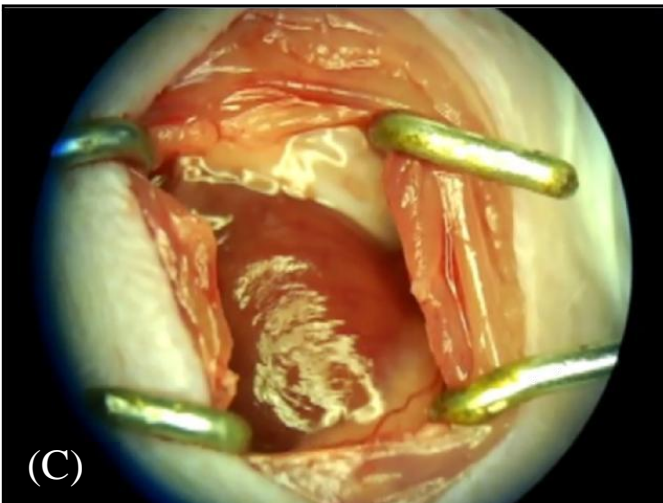
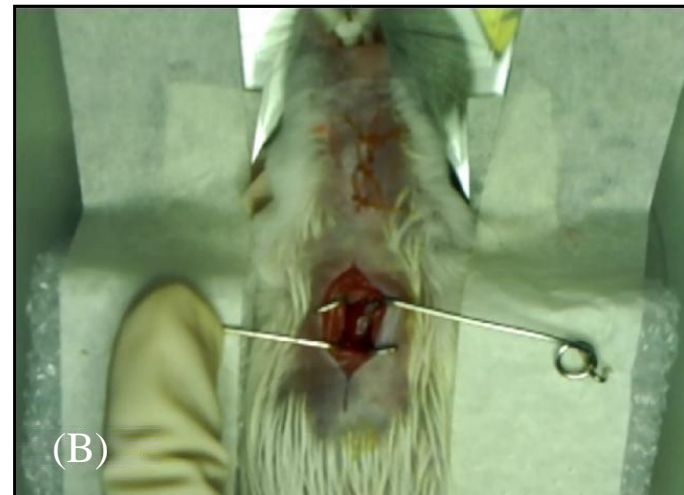
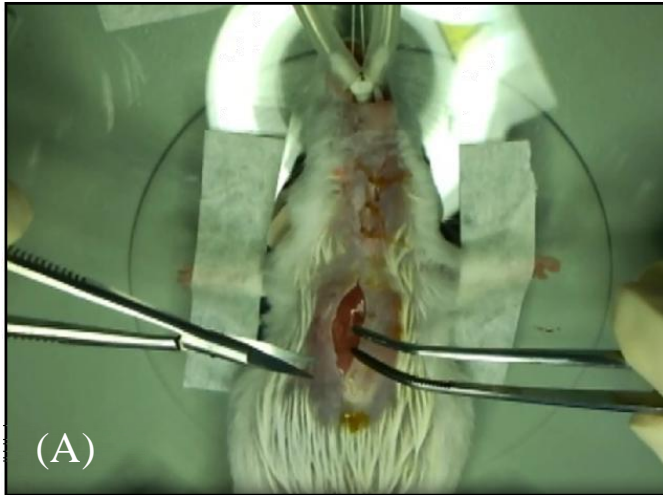
Hình 3.6: Phương pháp đặt nội khí quản. (A) Cố định đầu chuột; (B) Tạo vết cắt để lộ khí quản; (C) Luồn ống trợ thở vào khí quản; (D) Đóng và sát trùng vùng giải phẫu

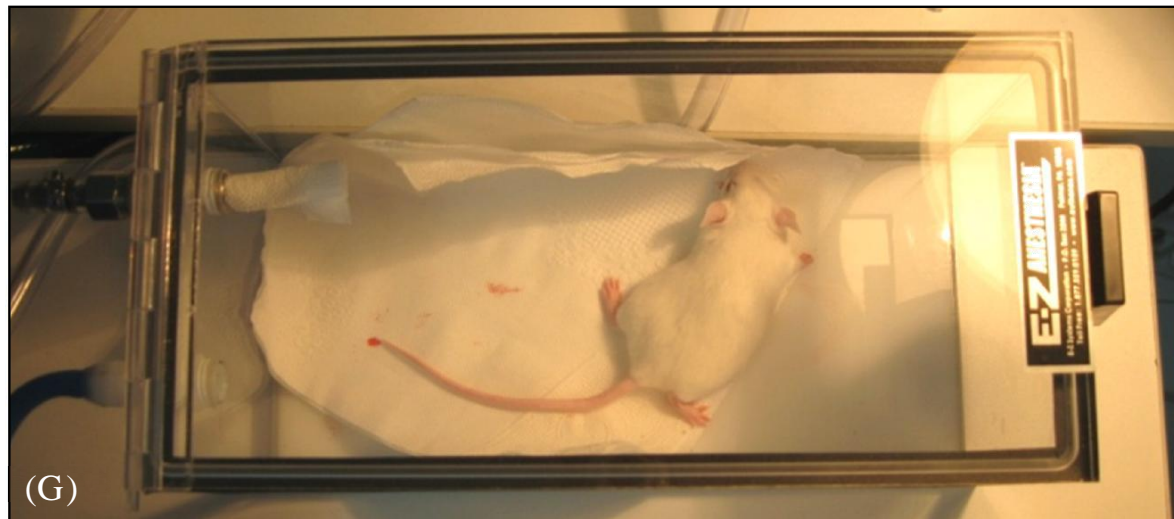
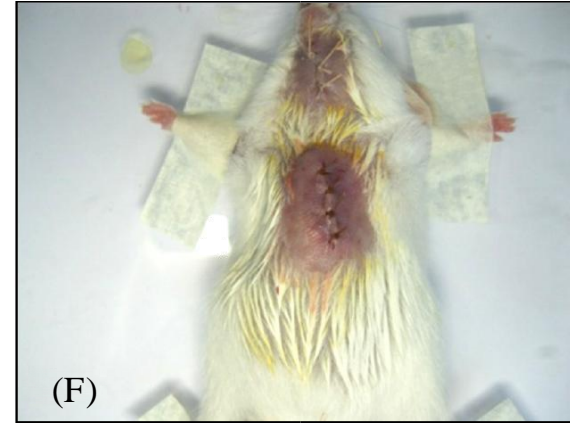
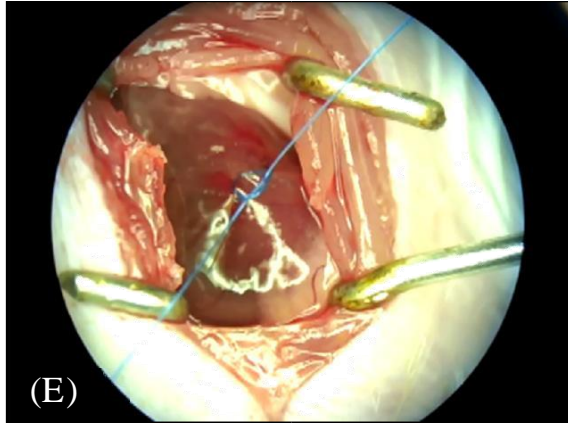
Phương pháp

* Giải phẫu lồng ngực, thắt LAD



Hình 3.7: Cấu trúc lồng ngực chụp.
Xương sườn 4,5,6 (được đánh số)





Phương pháp

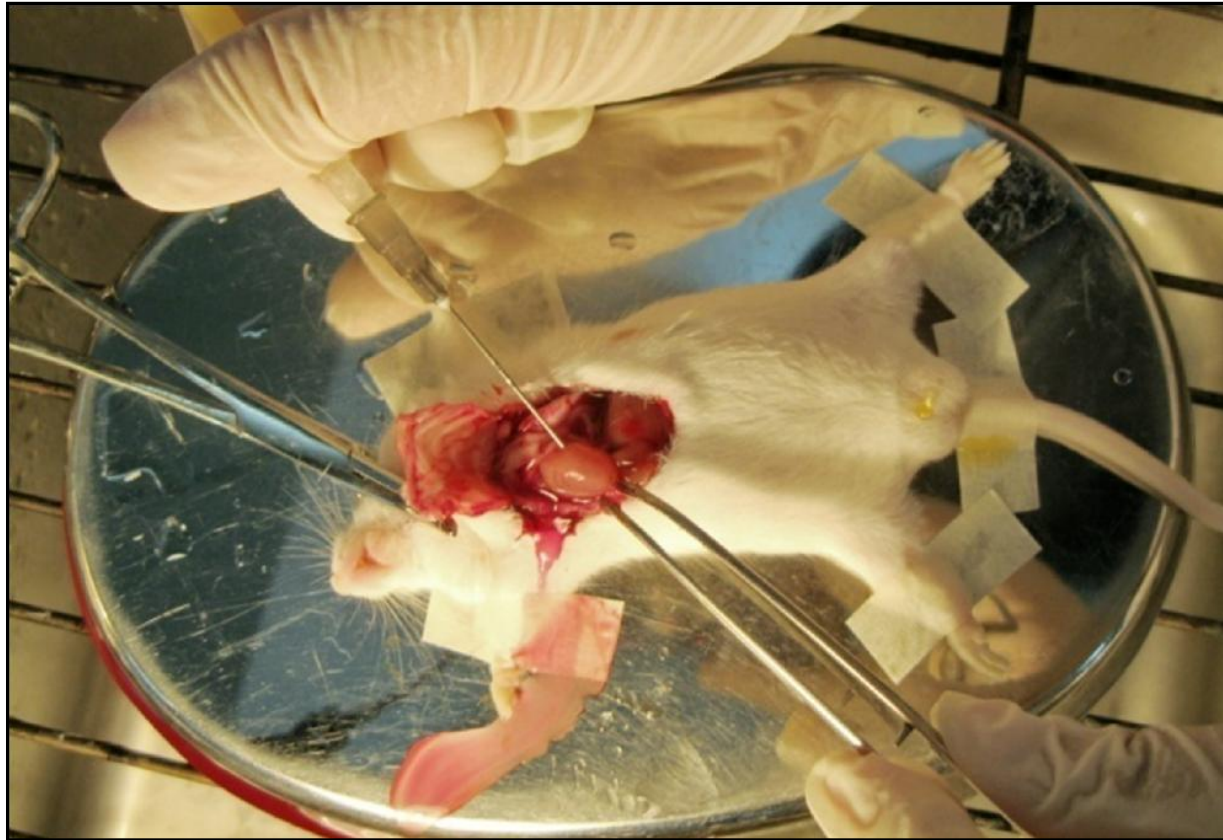
* Chăm sóc chuột sau giải phẫu

- Đặt chuột trong buồng được bơm oxi nguyên chất đến khi chuột có thể di động
- Chuyển chuột vào chuồng sạch, cung cấp nước sạch, không thức ăn trong 24 giờ
- Thay chuồng sạch sau mỗi 3 ngày
- Sát trùng vết mổ một lần/ ngày trong 3 ngày đầu sau giải phẫu

Clip

Phương pháp

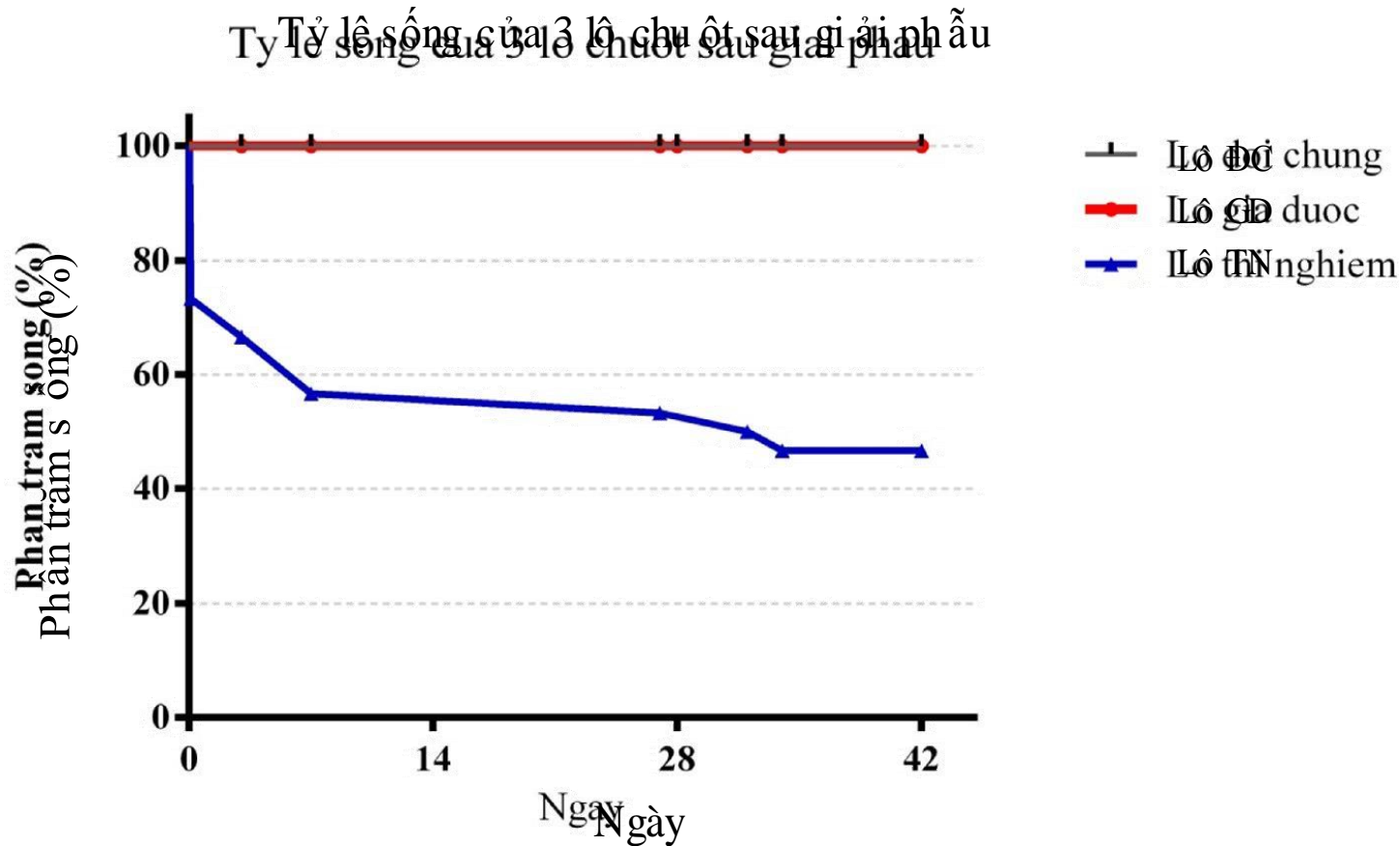
Đánh giá kết quả



Hình 3.9. Phương pháp thu nhận mẫu tim

Kết quả đánh giá

Biểu đồ ảnh hưởng của việc thắt LAD lên tỉ lệ sống



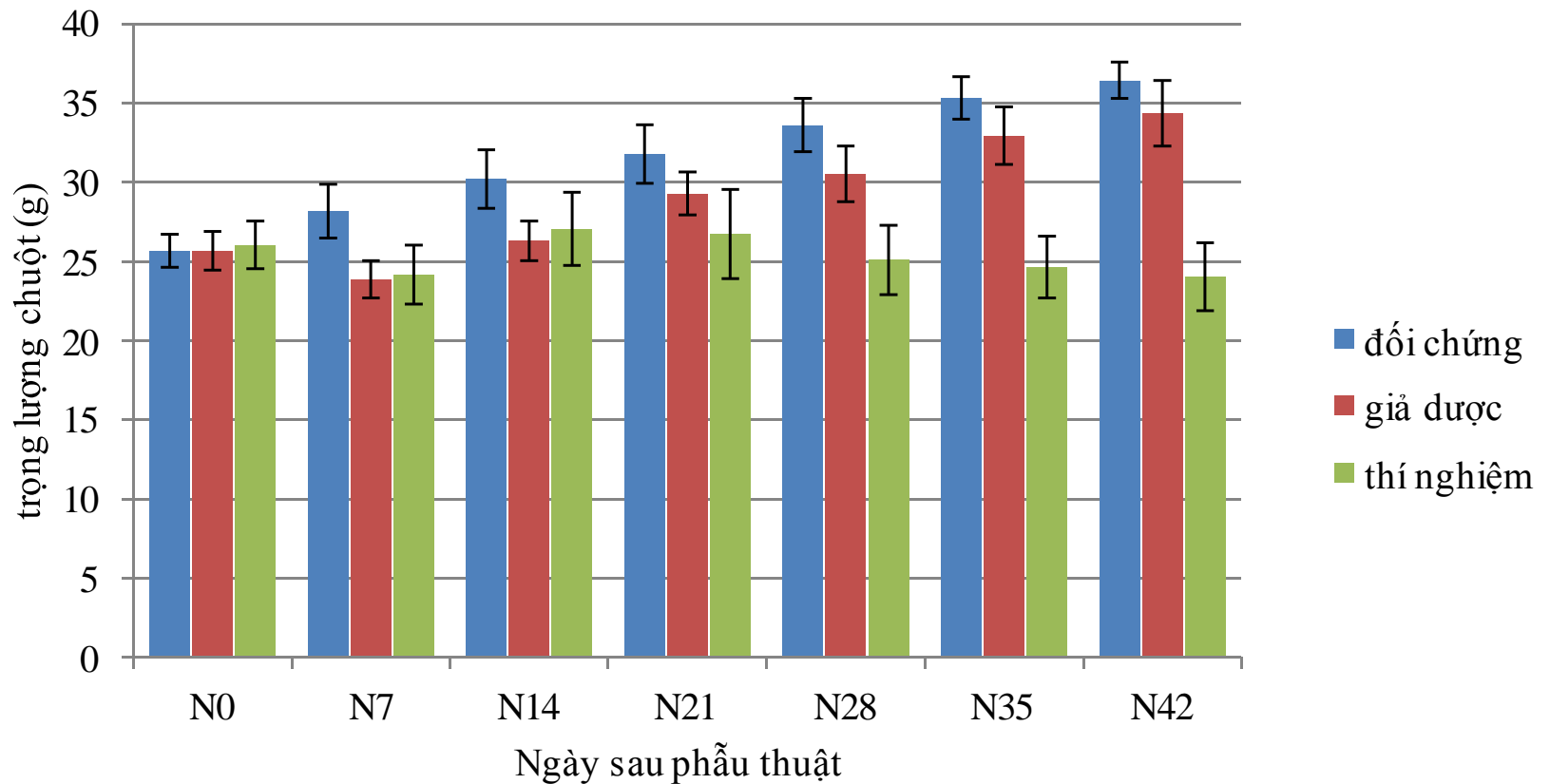
Kết quả đánh giá

Biểu hiện hình thái bất thường của chuột sau giải phẫu. (A) Chuột ĐC-khỏe; (B) Chuột ngay sau giải phẫu; (C) Chuột yếu ngày N6 sau giải phẫu thắt LAD; (D) Chuột khỏe ngày N7 sau giải phẫu thắt LAD; (E) Chuột cắn đuôi nhiều lần sau giải phẫu thắt LAD- hình chụp ngày N42; (F) Chuột yếu ngày N70 sau giải phẫu thắt LAD



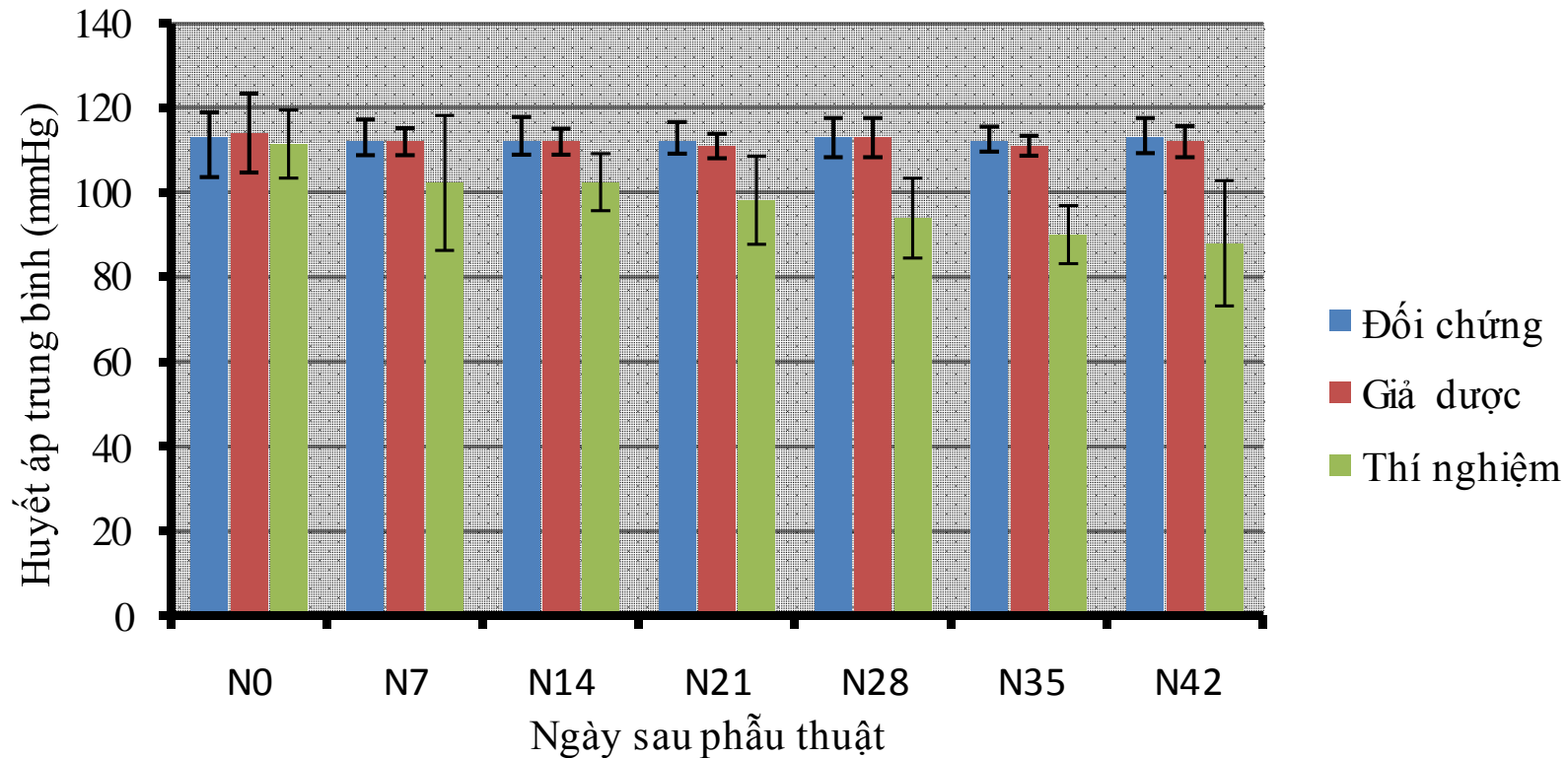
Kết quả đánh giá

Sự thay đổi trọng lượng



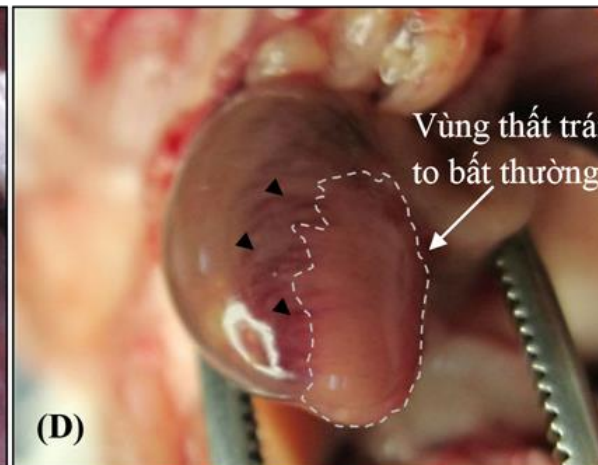
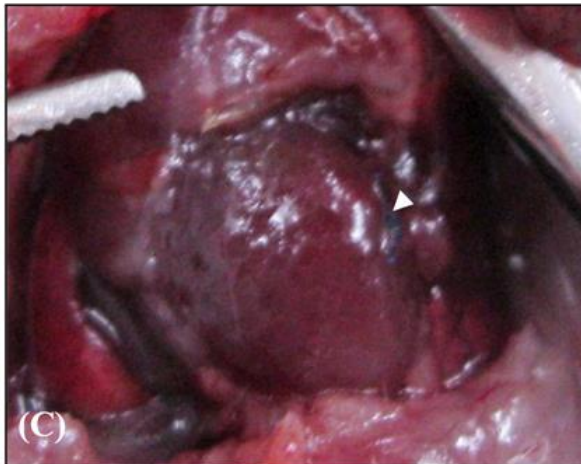
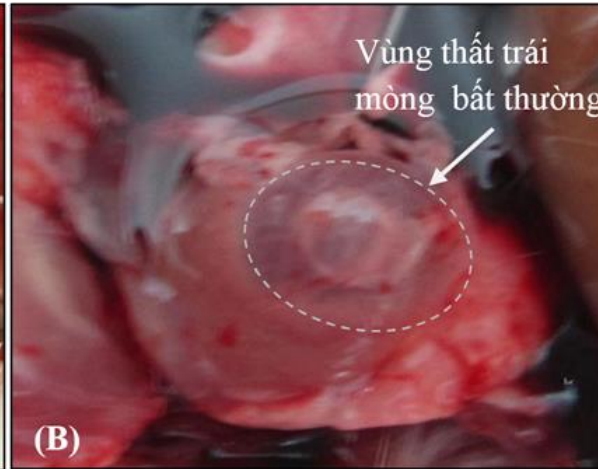
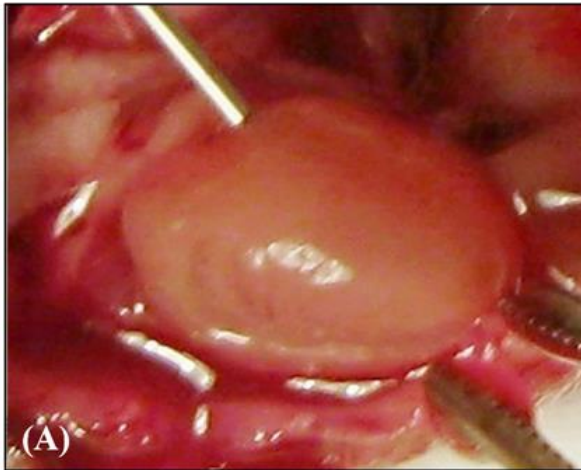
Kết quả đánh giá

Sự thay đổi huyết áp chuột



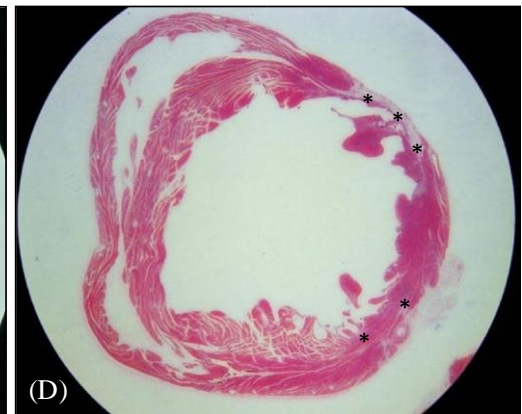
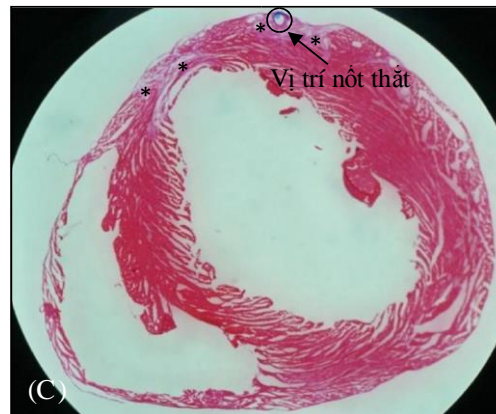
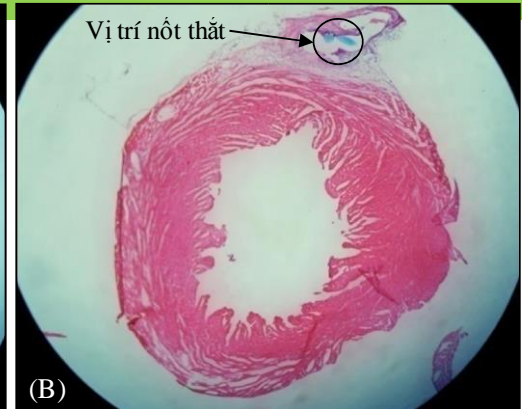
Kết quả đánh giá

Đặc điểm hình thái tim ở chuột mô hình



Kết quả đánh giá

Kết quả hình ảnh **nhộm H&E** lát cắt tim chuột. (A) Chuột ĐC; (B) Chuột GD, (C), (D), (E), (F) Chuột TN ngày N7; N21; N42 và N70. (Dấu * chỉ vùng mô sẹo)

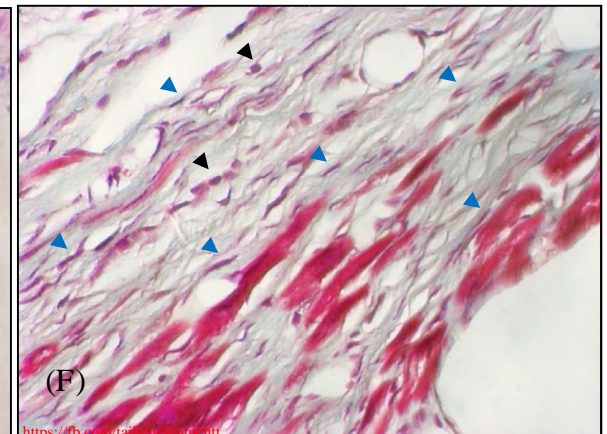
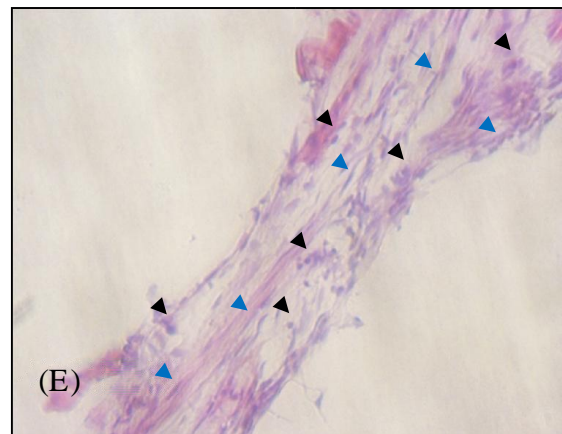
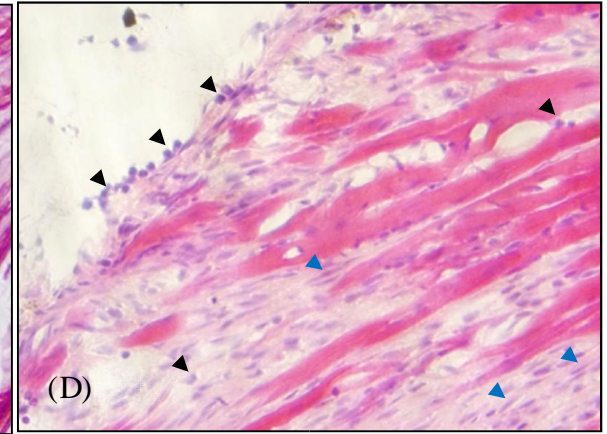
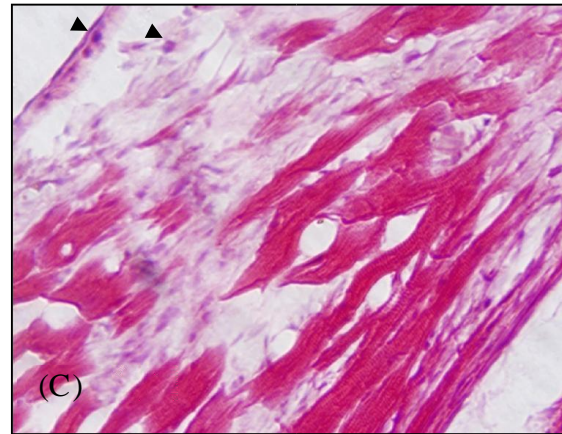
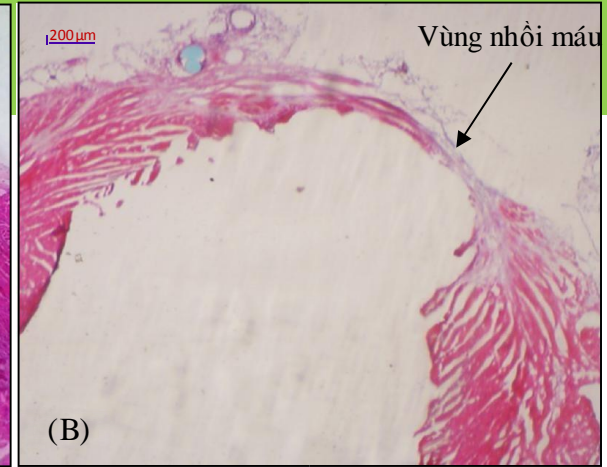
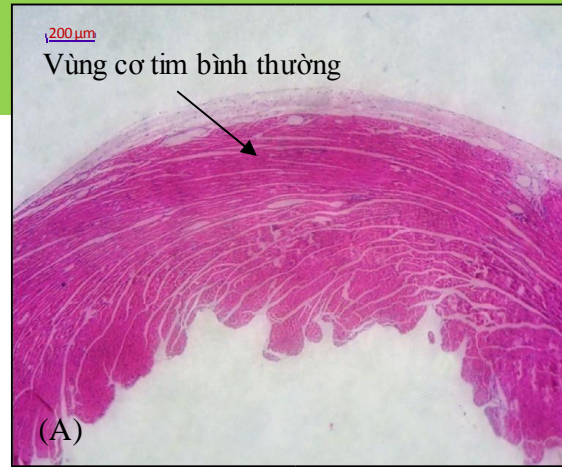


Kết quả đánh giá

Hình ảnh **nhuộm H&E**
mẫu mô tim vùng thất trái.

(A) Chuột ĐC (10x); (B)
Chuột mô hình 6 tuần sau
ngày thắt LAD (10x);

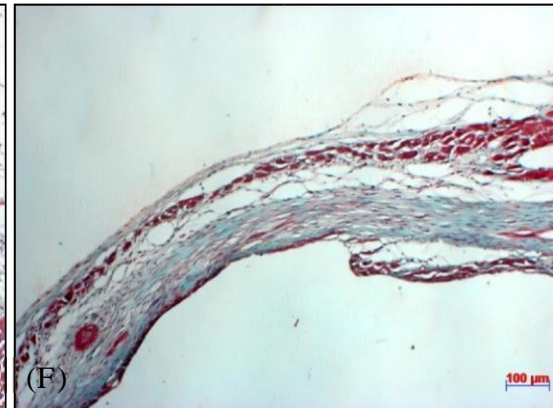
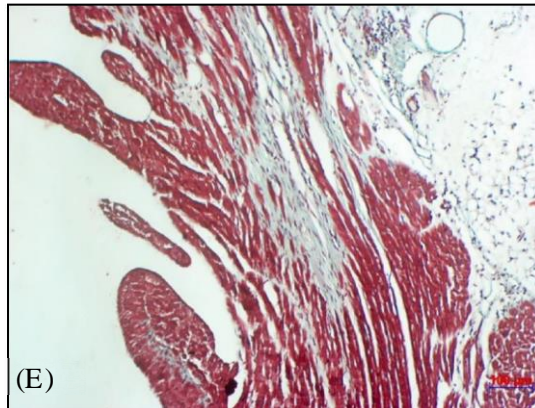
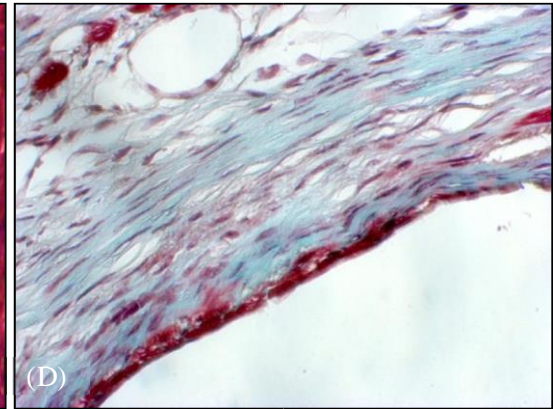
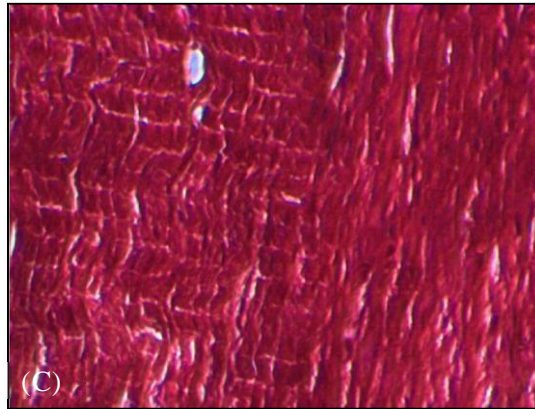
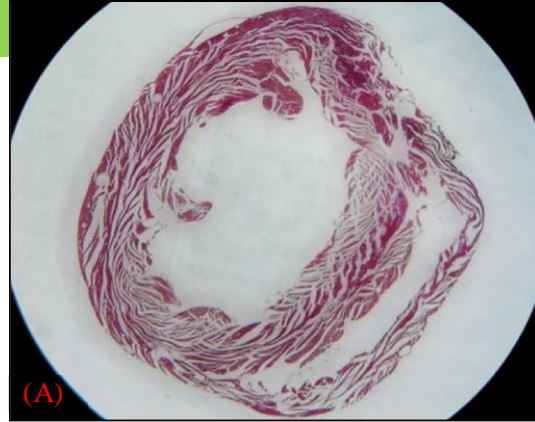
(C),(D),(E),(F)
Chuột mô hình 1 tuần, 3
tuần, 6 tuần và 10 tuần sau
giải phẫu ở vật kính 40x;
Các đầu mũi tên đen chỉ
các tế bào gây viêm, đầu
mũi tên xanh chỉ các
nguyên bào sợi.



Kết quả đánh giá

Nhuộm Trichrome

A. Tim chuột ĐC; B. Tim chuột ngày N70; C. Phần mô tim khỏe mạnh; D. Phần mô tim bị nhồi máu; E. Thành tim ngày 21; F. Thành tim ngày 70



Kết quả đánh giá

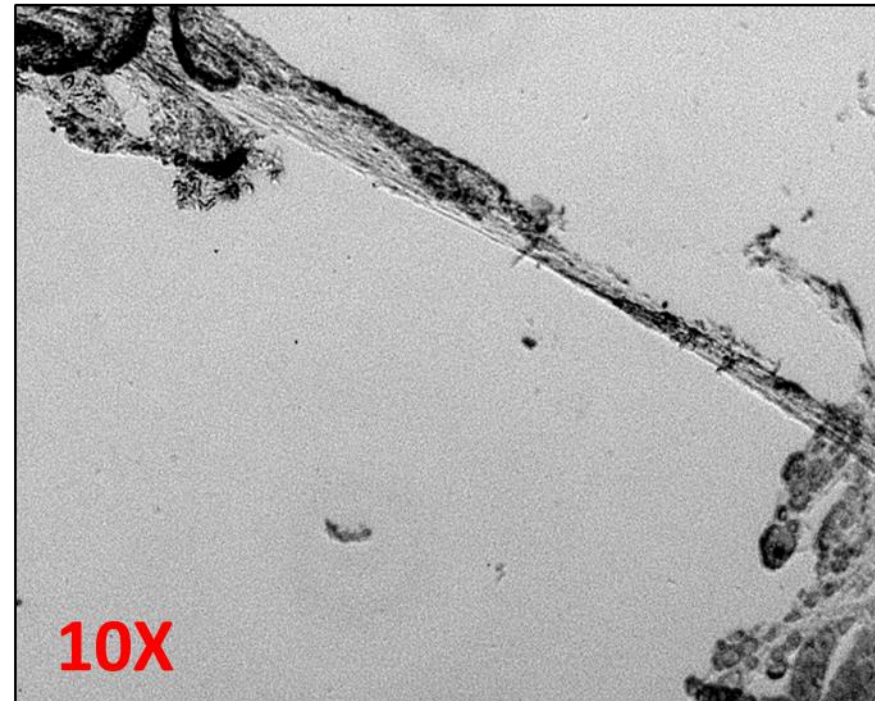
Nhuộm IHC

Heart tissue damage analysis

Control

Experiment

White field



Kết quả đánh giá

Heart tissue damage analysis

Hoechst**Annexin-V****Merge****Control****10X****10X****10X****Experiment****10X****10X****10X**

Kết quả đánh giá

Vùng nhồi máu ở tim chuột sau khi tắc nghẽn mạch vành. (A) Hình vẽ mô tả vùng nhồi máu ở tim khi có sự tắc nghẽn LAD xảy ra; (B) Mẫu tim chuột mô hình ngày N42 sau giải phẫu; (C) Tim chuột rat 4 tuần sau thắt LAD theo nghiên cứu của He Q và cs; (D) Tim chuột nhắt trắng 4 tuần sau giải phẫu theo nghiên cứu của Guifu Wu và cs.

