

2019

MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT BỆNH LÝ

ThS. BÙI NGUYỄN TÚ ANH

**TRƯỞNG PHÒNG PTN. CHĂM SÓC VÀ SỬ DỤNG
ĐỘNG VẬT**

VIỆN TẾ BÀO GỐC

MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

Đái tháo đường (Diabetes mellitus) là một bệnh rối loạn chuyển hóa, đặc trưng bởi nồng độ glucose máu cao mãn tính do tụy sản xuất thiếu insulin (thiếu insulin tuyệt đối) hoặc do giảm tác dụng của insulin (thiếu insulin tương đối) bởi các nguyên nhân khác nhau với cơ chế bệnh sinh phức tạp



LÀM THẾ NÀO ĐỂ TẠO
MÔ HÌNH CHUỘT
ĐÁI THẢO ĐƯỜNG ???



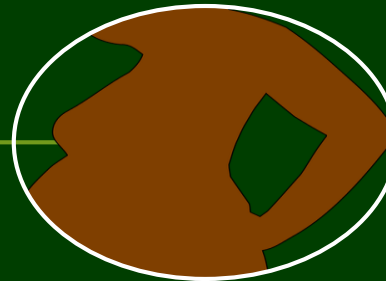
PHÂN LOẠI BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG



Type 1



Type 2



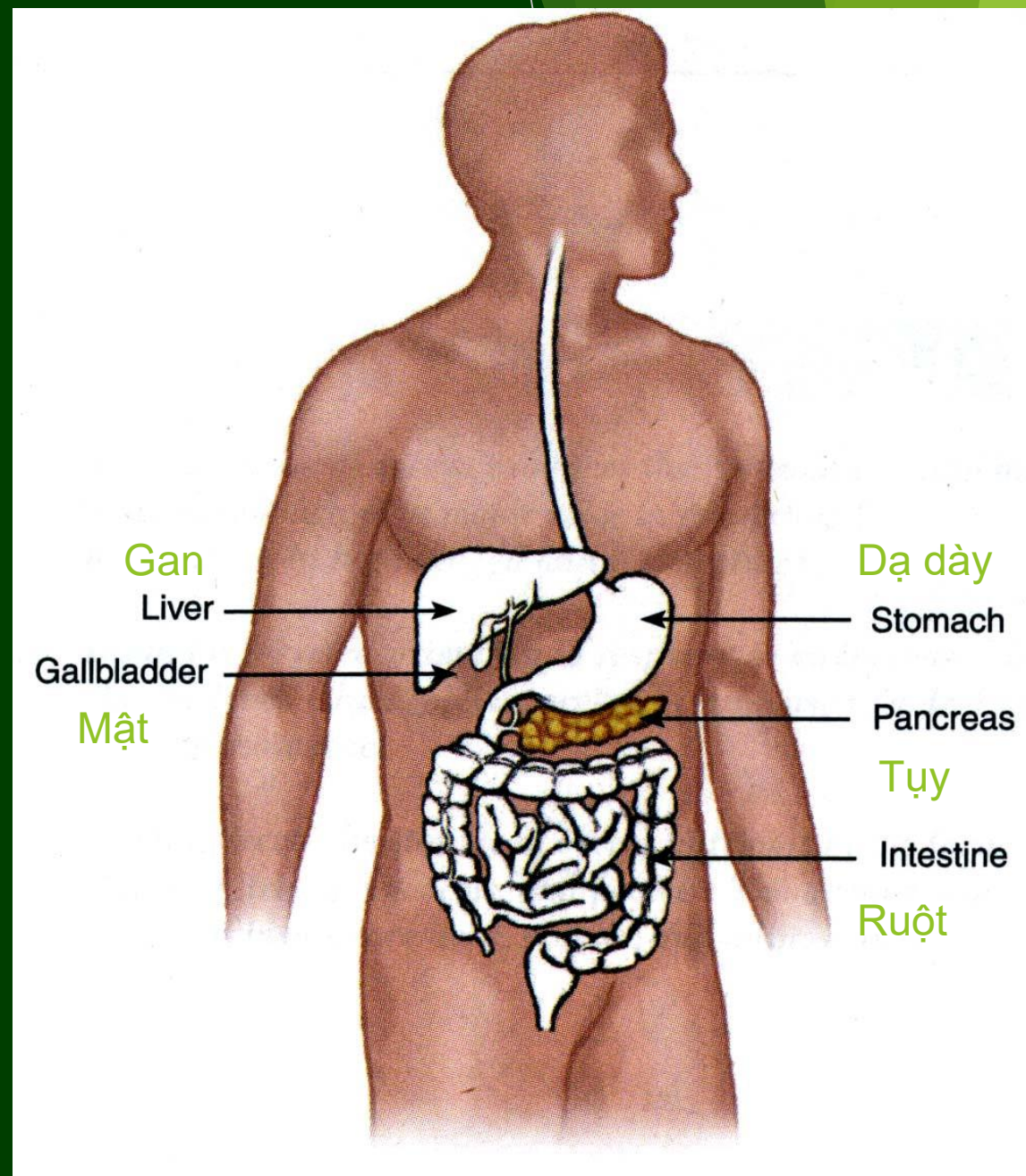
Thai kỳ



Khác...

VỊ TRÍ TUYẾN TUY

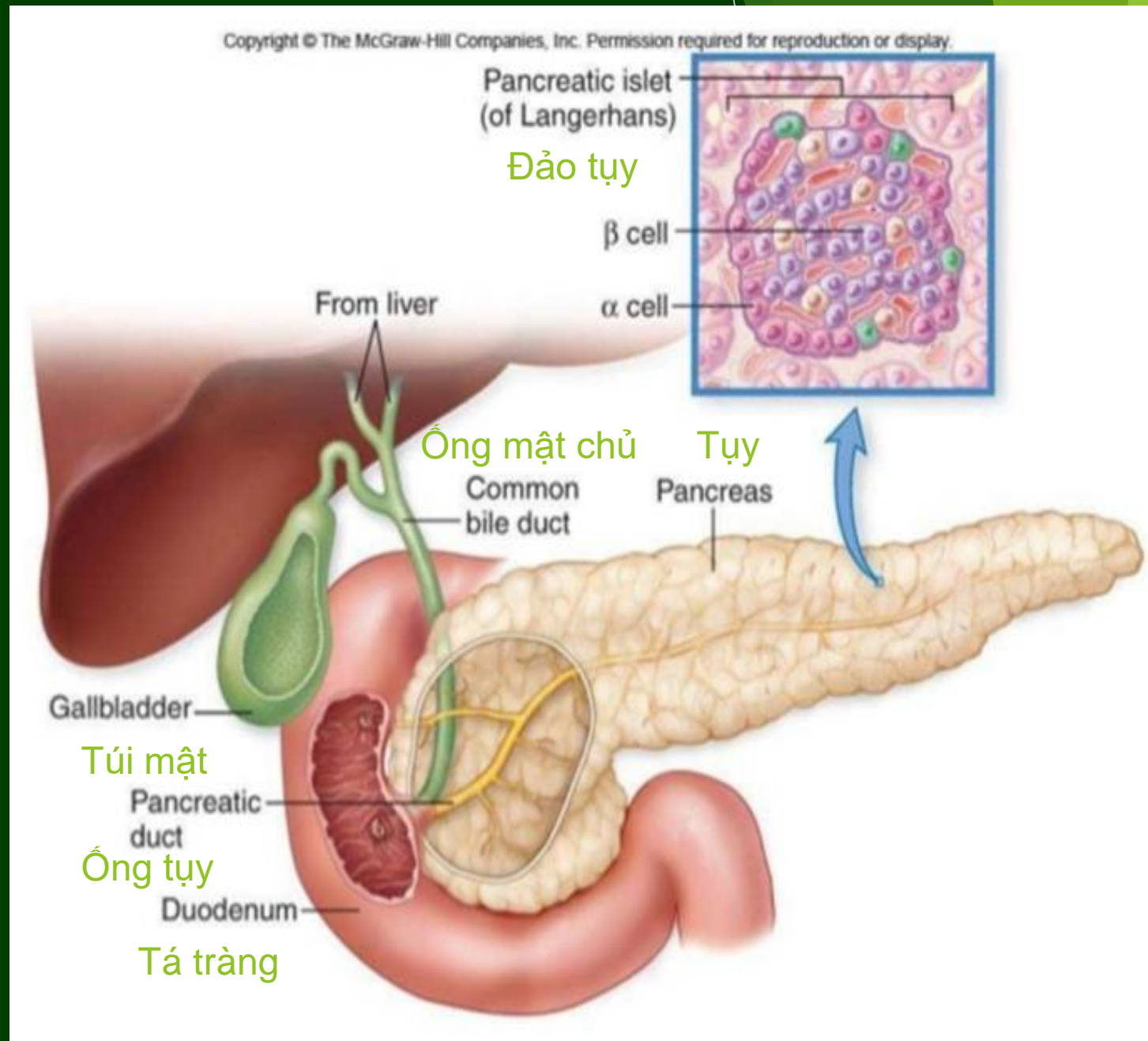
- Tuyến tụy là một cơ quan nằm trong ổ bụng, được coi là một phần của hệ tiêu hóa và hệ thống nội tiết của cơ thể.
- Tụy được xem là một cơ quan nội tiết và ngoại tiết quan trọng trong cơ thể. Bao gồm hai phần chính là
 - Tụy ngoại tiết với các ống tụy
 - Tụy nội tiết bao gồm các đảo tụy Langerhans (chiếm 1-5% khối lượng của tụy)



ĐẢO TỤY LANGERHANS

Đảo tụy là một cụm tế bào, bao gồm:

- Tế bào α (chiếm 15-20%)
- Tế bào β (hơn 70%)
- Tế bào δ (5-10%)
- Còn lại là tế bào γ và các tế bào khác



Nồng độ glucose trong máu cao,
kéo dài

Tụy không tiết đủ insulin hoặc các
tế bào kháng insulin.

Rối loạn chuyển hóa
carbohydrate, chất béo, protein.

ĐÁI THÁO ĐƯỜNG



**CHỌN ĐỘNG VẬT NÀO CHO
MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT ĐÁI
THẢO ĐƯỜNG ???**





CHUỘT
TRẮNG
???

CHỦNG THUẦN CHỦNG

inbred

BALB/C

FVB

C57BL/6

DBA

C3H

BROWN NORWAY

LEWIS

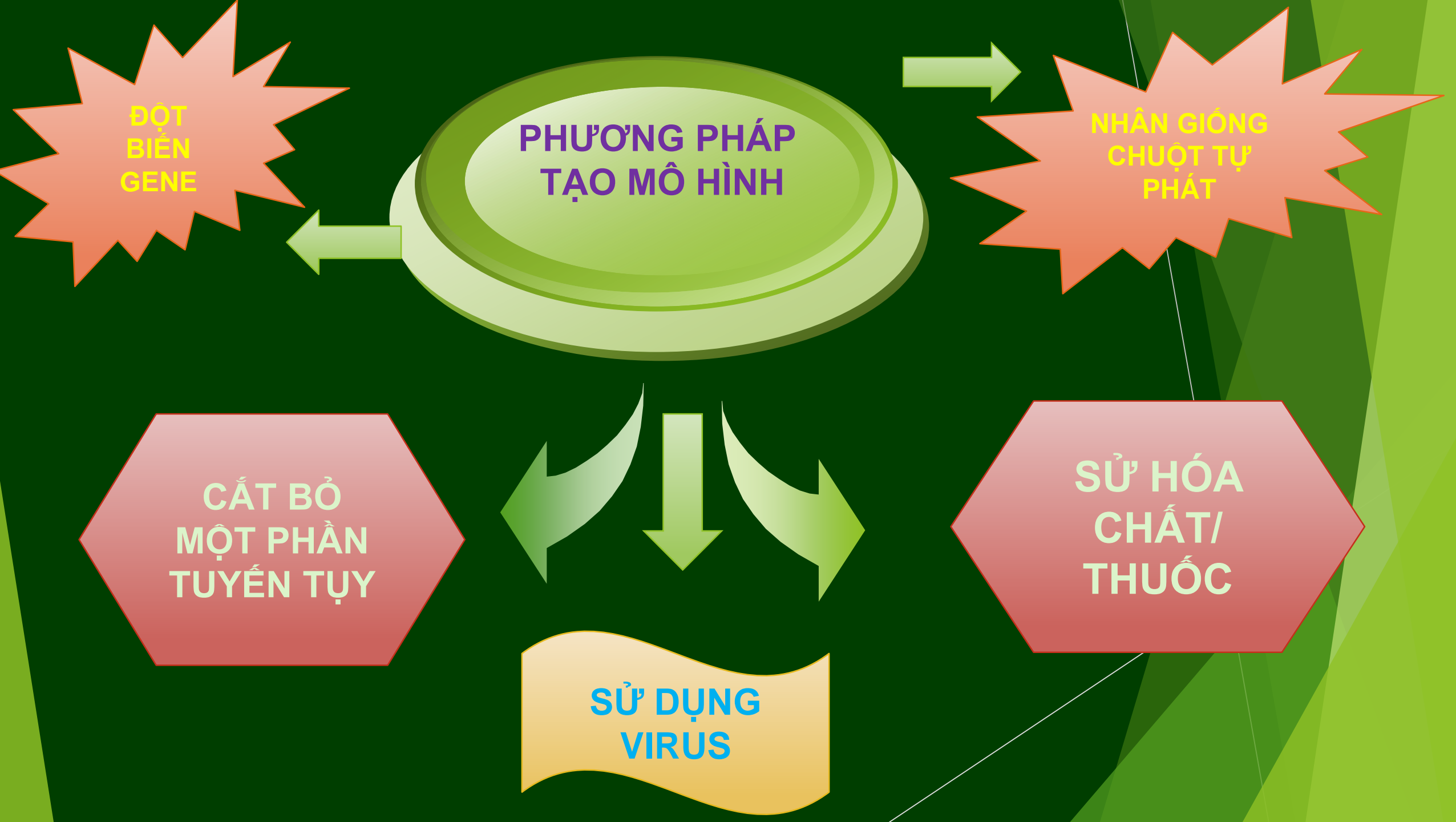
DARK AGOUTI

SPRAGUE DAWLEY

WISTAR

MÔ HÌNH CHUỘT ĐÁI THÁO ĐƯỜNG TYPE 1





MÔ HÌNH TỰ PHÁT

- Chuột NOD (Non-obese diabetic)



- Biobreeding rat ,
- Double-Tg models: RIP-Ag and Ag-specific TCR Tg
- BDC2.5/B6^{g7}

MÔ HÌNH GIẢI PHẪU

- **Đòi hỏi kỹ thuật cao**
- **Phải bổ sung các enzyme ngoại tiết**
- **Là mô hình đơn giản để thiết lập các nghiên cứu về sự phục hồi tụy**

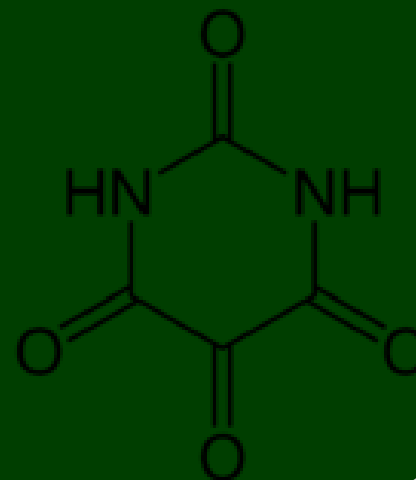
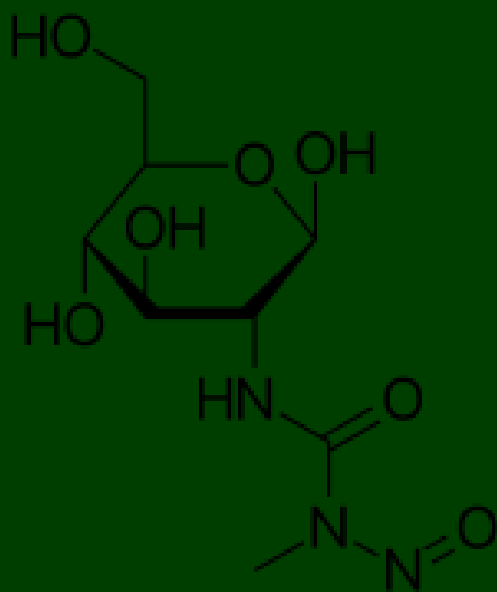
MÔ HÌNH SỬ DỤNG VIRUS

Coxsackie B (CVB4, CVN5),
Encephalomyocarditis,
Virus gây rubéole,
Virus quai bị

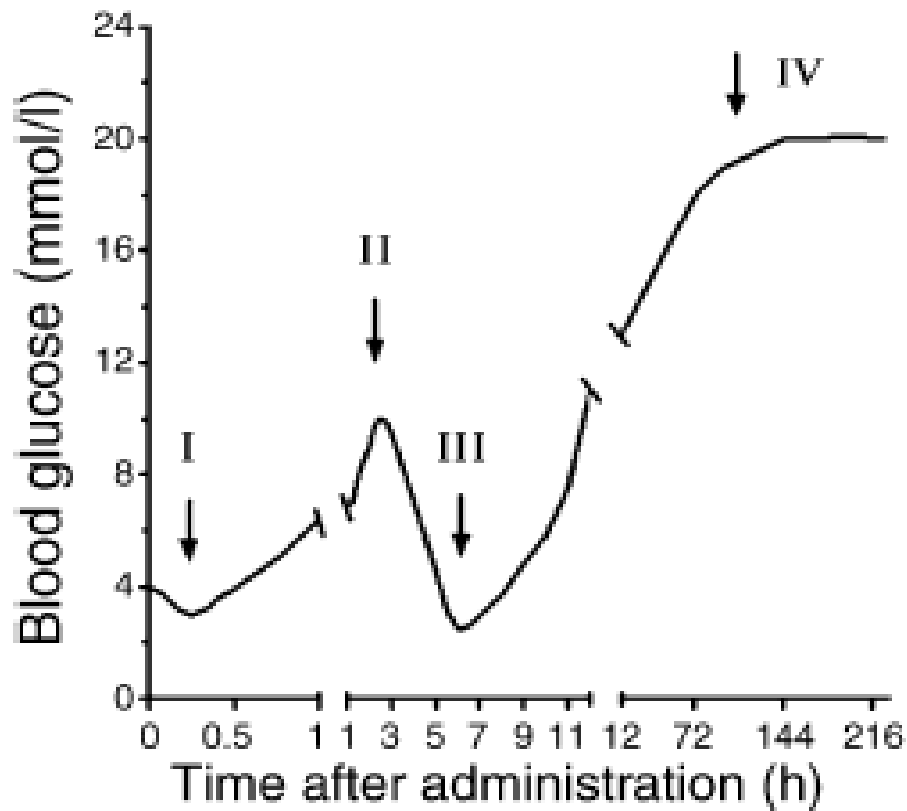
MÔ HÌNH SỬ DỤNG HÓA CHẤT GÂY ĐỘC

Streptozotocin (STZ) và Alloxan.

STZ ưu tiên hơn về thời gian tồn tại, khả năng gây độc



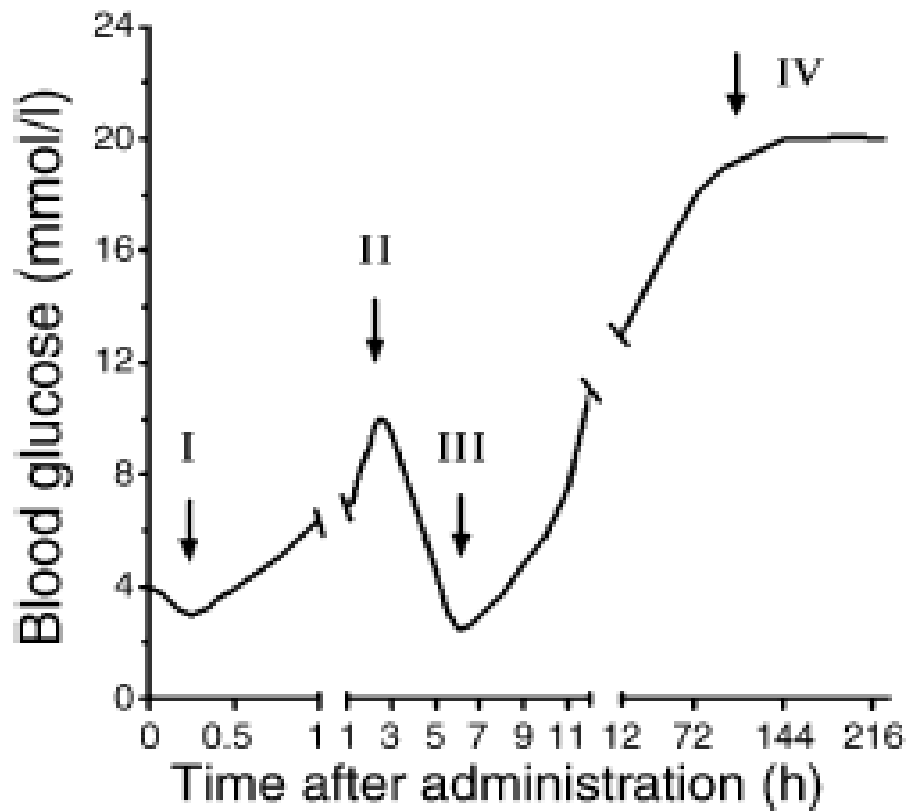
CƠ CHẾ TÁC ĐỘNG



- ❖ Gđ 1: Giảm đường huyết nhẹ
 - 30 phút sau khi tiêm Alloxan
 - Ức chế Glucosekinase làm giảm tiêu thụ ATP
 - Tỷ lệ ATP/ADP tăng lên làm kênh KATP đóng.
 - Khử cực tế bào beta.
 - Kênh canxi mở, kích thích sản xuất insulin.
- ❖ Gđ 2: Tăng đường huyết
 - Kéo dài 2-4h sau 1h tiêm
 - Phá hủy không bào làm lưới nội chất nhám trương ra gây giảm diện tích Golgi.
 - Giảm sự phóng thích các hạt insulin.

Alloxan (từ pha I→IV) và STZ ((từ pha II→IV)

CƠ CHẾ TÁC ĐỘNG



❖ Gđ 3: Giảm đường huyết dạng nặng

- 4-8 h sau khi tiêm thuốc và kéo dài trong nhiều giờ
- Tế bào β bị phá hủy trầm trọng
- Màng tế bào bị hư hỏng
- Insulin được phóng thích hoàn toàn vào trong máu

❖ Gđ 4: tăng đường huyết vĩnh viễn

- 12 → 24h sau khi tiêm thuốc
- Tế bào β đã bị phá hủy trầm trọng
- Insulin tiết ra ít

Alloxan (từ pha I→IV) và STZ ((từ pha II→IV)

TẠI SAO STZ VÀ
ALLOXAN CHỈ TÁC
ĐỘNG TRÊN TỤY ???



Streptozotocin

Streptozotocin (STZ) có tên danh pháp hóa học là 2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido))-D-glucopyranose được tổng hợp nhân tạo từ *Streptomyces achromogenes*.

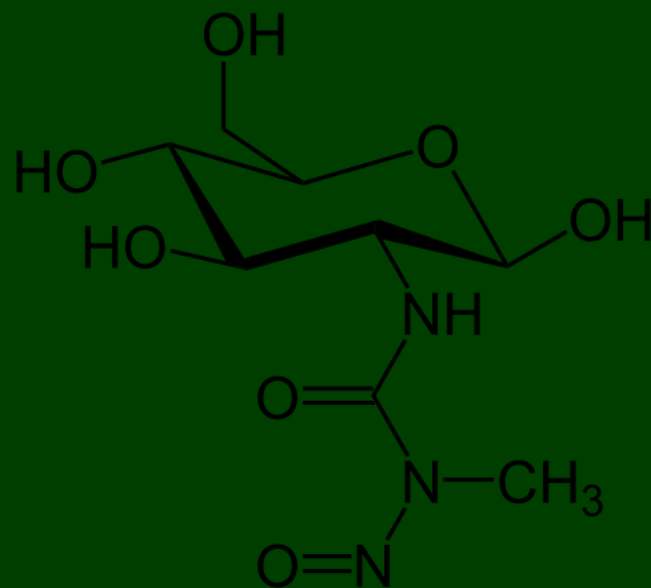
Vào cuối những năm 50 của thế kỷ 20, streptozotocin được phát hiện và phân lập từ một chủng nấm sợi *Streptomyces achromogenes* bởi công ty dược Upjohn, Mỹ.

Streptozotocin

Đến những năm 1960, khả năng gây độc chọn lọc của STZ lên các tế bào Beta của tụy được phát hiện. Phát hiện này đã mở đường cho các ý tưởng dùng STZ để gây mô hình ĐTĐ tuýp 1 trên động vật thực nghiệm và dùng STZ để điều trị chứng ung thư tụy. Và đến năm 1982, cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (U.S. Food and Drug Administration – FDA) đã cấp phép lưu hành streptozotocin dưới dạng thuốc điều trị ung thư tế bào đảo tụy với tên thương mại là Zanosar

Streptozotocin

Về mặt cấu tạo hóa học, phân tử STZ là một phức hợp của glucosamine và nitrosourea. Bao gồm một nhóm methylnitrosourea liên kết với glucose tại vị trí cacbon thứ 2 của glucose.



VẬN CHUYỂN GLUCOSE

GLUT1

- Có ở hồng cầu, tế bào nội mô ở hàng rào máu não.
- Có ái tính rất cao với glucose.
- Vận chuyển glucose với nồng độ thấp trong trạng thái cơ bản.

GLUT2

- Có ở gan, thận, tụy.
- Có ái tính rất thấp với glucose.
- Kích hoạt GLUT4
- Kích hoạt tế bào β sản xuất insulin.

GLUT3

- Có ở tế bào thần kinh.
- Chất vận chuyển chính trên bề mặt các neuron thần kinh.

GLUT4

- Nằm bên trong tế bào xương và mỡ.
- GLUT 4 chuyển lên bề mặt màng tế bào đến vận chuyển glucose khi nhận tín hiệu từ insulin.

Streptozotocin

Ngay khi vào được bên trong tế bào beta, phân tử STZ sẽ bị phân cắt thành glucose và nitrosourea. Chính gốc nitrosourea này đã gây chết tế bào beta thông qua sự alkyl hóa DNA. Đặc biệt tại vị trí oxy thứ 6 của phân tử guanine.

- Phá hủy tế bào β
- Làm suy yếu hệ thống ti thể
- Alkyl hóa DNA
- Ức chế O-GlcNAcase.

CƠ CHẾ GÂY ĐỘC CỦA STZ

1. STZ vào bên trong tế bào thông qua kênh GLUT2

- N- methylnitrosea tạo ion carbonium (CH_3^+)
- CH_3^+ phản ứng với electron của N và O, gây đột biến
- Poly ADP –ribose polymerase tham gia sửa chữa DNA
- NAD^+ giảm, ATP giảm, tế bào bị phá hủy

2. STZ giải phóng NO, NO làm suy giảm ty thể, ức chế tổng hợp ATP

- Nitrat hóa acid nucleic , khử purin và pyrimidine
- Làm bất hoạt enzyme sửa chữa, /sao chép DNA
- Tế bào chết apoptosis hay necrosis

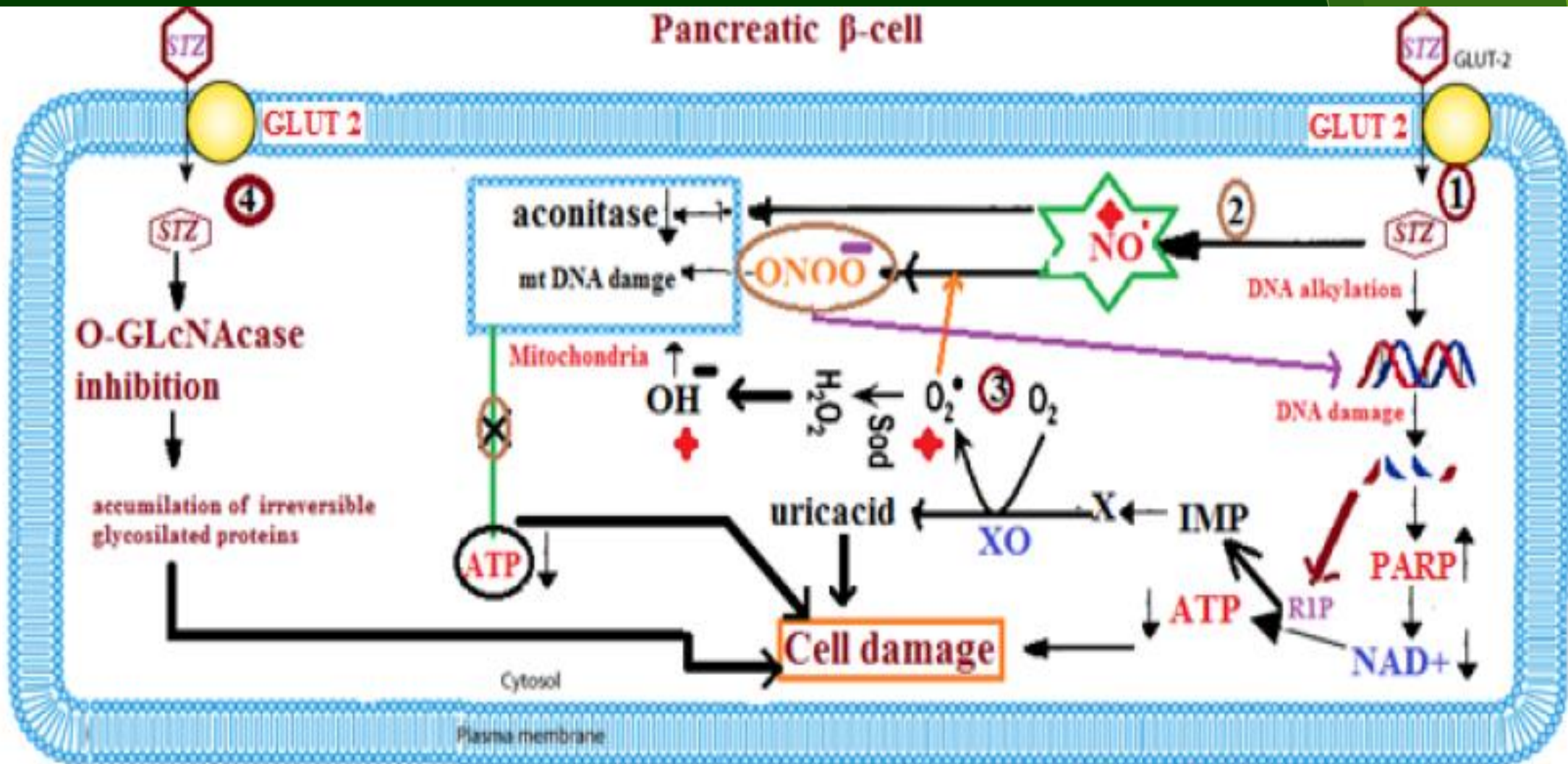
CƠ CHẾ GÂY ĐỘC CỦA STZ

3. Sự tạo thành các gốc tự do gây tổn thương DNA

- Glucose tự động quá trình oxy hóa
- Superoxide, Hydroxyle, Hydrogen peroxide (H_2O_2) và peroxynitrite
- Các gốc tự do tác động lên tế bào gây stress oxy hóa

4. Sự ức chế O- GlcNAcase bởi STZ

- O-glycosyl hóa không thể đảo ngược
- Tích tụ các protein có hại
- Tế bào bị Apoptosis



Extracellular matrix * PARP: Poly (ADP ribose) polymerase 1.X: Xanthine 2.XO: Xanthine oxidase
3. $O_2^{\bullet -}$: super oxide 4.SOD: superoxide dismutase 5.R-1-P: Ribose -1-Phosphate

6. NO^{\bullet} : Nitric Oxide 7. H_2O_2 : Hydrogen peroxide 8. OH^{\bullet} : Hydroxide ion 9. $ONOO^{\bullet -}$: Peroxynitrite 10.IMP: Inositol mono phosphate
+ Free radicals

SỬ DỤNG STZ TẠO MÔ HÌNH

Vị trí

- Tiêm tĩnh mạch.
- Tiêm xoang bụng



Liều tiêm

- Nhiều liều thấp.
- Liều đơn duy nhất (100mg/kg).



Thời gian

- Nhịn ăn trước tiêm
- Nhịn khát sau tiêm



ALLOXAN

Alloxan được phát hiện vào năm 1818 bởi Brugnatelli. Mãi đến năm 1838 cái tên Alloxan mới được xuất hiện và công bố bởi Wöhler cùng Liebig dưới dạng là một sản phẩm của quá trình oxi hóa axit uric.

Năm 1943, nhóm các nhà khoa học gồm Dunn, Sheehan và McLethie thuộc đại học Glasgow đã công bố khả năng gây hoại tử tế bào tiết insulin của thỏ khi được tiêm alloxan. Kể từ thời điểm đó cho đến nay, alloxan chỉ được sử dụng như một loại thuốc để gây ĐTĐ tuýp 1 trên động vật.

ALLOXAN

Tương tự như STZ, alloxan cũng có khả năng gây độc chọn lọc lên tế bào beta của tuyến tụy do công thức cấu tạo của chất này cũng gần giống như glucose và có thể đi qua kênh GLUT2 trên tế bào beta. Tuy nhiên khi vào được bên trong tế bào beta, cơ chế gây độc của alloxan lại đi theo hai con đường khác nhau.

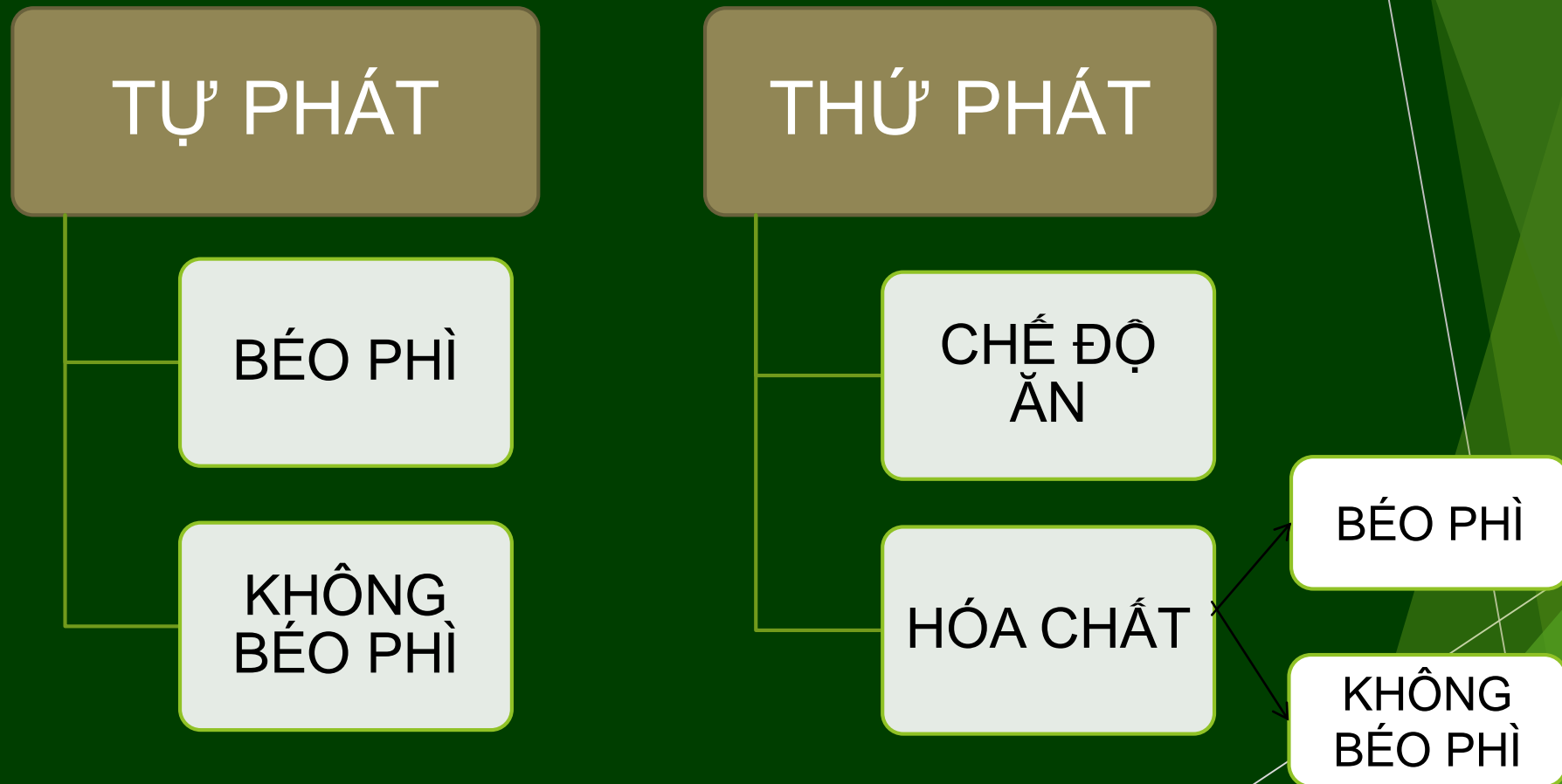
ALLOXAN

1. Sinh ra các gốc oxy tự do như superoxyde (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) và gốc hydroxy (OH^-) để làm đứt gãy DNA. Các gốc oxy tự do này là sản phẩm của quá trình biến đổi các phân tử alloxan thành axit dialuric.

2. Bất hoạt enzyme glucose kinase bằng cách phản ứng với nhóm thiol (SH^-) trong phần để gắn glucose vào trên phân tử glucose kinase dẫn đến sự hình thành các cầu nối disulfide làm cho enzyme này bị thay đổi cấu trúc và mất chức năng, khi glucose kinase bị bất hoạt, đường không thể gắn vào enzyme này, và tế bào beta sẽ không còn nhận biết được nồng độ glucose trong máu, khi đó tế bào beta sẽ không tiết insulin khi đường huyết cao dẫn đến nồng độ glucose trong máu không thể điều hòa được

MÔ HÌNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG TYPE 2

CÁC DẠNG MÔ HÌNH



TỰ PHÁT BÉO PHÌ



- Ob/ob mouse
- Db/db mouse
- KK mouse
- KK A^y mouse
- New Zealand Obese (NZO) mouse
- TSOD mouse
- NoNcNZO10 mouse
- TALLYHO/Jng (TH) mouse
- M16 mouse
- Zucker Faffty rat
- Zucker diabetic fatty rat
- SHR – cp rat
- JCR – cp rat
- OLETF rat
- Obese rhesus monkey

Ob/ob mouse



- Giống chuột C57BL/6J mang đột biến trên NST số 6
- Thừa cân tích mỡ dẫn đến béo phì diễn ra trong 4 tuần
- Tăng tiết insulin, tăng đường huyết, giảm khả năng dung nạp glucose
- đột biến này trên giống chuột C57BL/KS chúng sẽ bị đái tháo đường nghiêm trọng → chết sớm

TALLYHO/Jng (TH) mouse



- Bẩm sinh do nhiều gen gây ra
 - Tăng trọng lượng cơ thể, tăng lượng chất béo, tăng nồng độ insulin trong huyết tương và tăng lipid máu
 - Ở giới đực đảo tụy có cấu trúc bất thường
- Mô hình này phù hợp cho nghiên cứu đái tháo đường tuýp 2

New Zealand Obese (NZO) mouse



- Thu được từ việc giao phối cận huyết giữa một vài thể hệ chuột lang
- Xuất hiện các hội chứng do sự di truyền đa gen như háu ăn, béo phì, tăng đường huyết nhẹ, tăng nồng độ insulin, giảm dung nạp glucose và kháng insulin
- Trọng lượng cơ thể tăng lên nhanh chóng chỉ trong 2 tuần đầu tiên
- Tăng đường huyết và giảm dung nạp glucose tăng lên theo độ tuổi.

Db/db mouse

- Giống chuột C57BL/KsJ tạo ra do đột biến lặn trên NTS thường
 - Tăng nồng độ insulin huyết thanh vào 10-12 ngày tuổi
 - Tăng sản xuất insulin vào khoảng 2-3 tuần tuổi
 - Do sự apoptosis của tế bào β , nồng độ insulin nhanh chóng giảm
 - Cân nặng tăng (40-50g) và giữ nguyên như thể vào tháng thứ 2
 - Tuần 6, tăng tiết insulin và tăng trọng lượng cơ thể
 - Tuần 12, béo phì, tăng nồng độ insulin trong máu và tăng đường huyết
- ➔ Mô hình này sử dụng nghiên cứu rối loạn chuyển hóa lipid hay sự nhạy cảm của insulin.

TỰ PHÁT KHÔNG BÉO PHÌ

- Cohen diabetic rat
- GK rat
- Torri rat
- None obese mutant C57 BL/6 (Akita) mouse
- ALS/LT mouse

GK rat

- Do nhiều gen gây ra.
- Tăng đường huyết cao khi đói, giảm nồng độ insulin trong máu, rối loạn dung nạp glucose ở tuần thứ 2
- Trưởng thành có tỷ lệ suy giảm tế bào beta lên tới 60%
- Xuất hiện biến chứng của bệnh ĐTĐ ở giai đoạn sớm
- Sử dụng nghiên cứu gây suy giảm tế bào beta ở ĐTĐ tuýp 2 và biến chứng do ĐTĐ tuýp 2 gây ra.

Torri rat

- Chuột mắc chứng ĐTĐ tuýp 2 không béo phì tự nhiên
- Tăng đường huyết, giảm nồng độ insulin, giảm dung nạp glucose, tăng triglyceride
- Đảo tụy của những con chuột này bị sơ hóa
- Có khả năng sống sót trong thời gian dài mà không cần insulin bổ trợ.
- 70-77 tuần tuổi, có biến chứng ĐTĐ như đục thủy tinh thể, bong tróc và xuất huyết võng mạc

Cohen diabetic rat

- Tạo ra bởi sự biến đổi gen do chế độ ăn
- Đặc điểm là nhạy cảm với hàm lượng carbohydrat cao.

→ Nghiên cứu

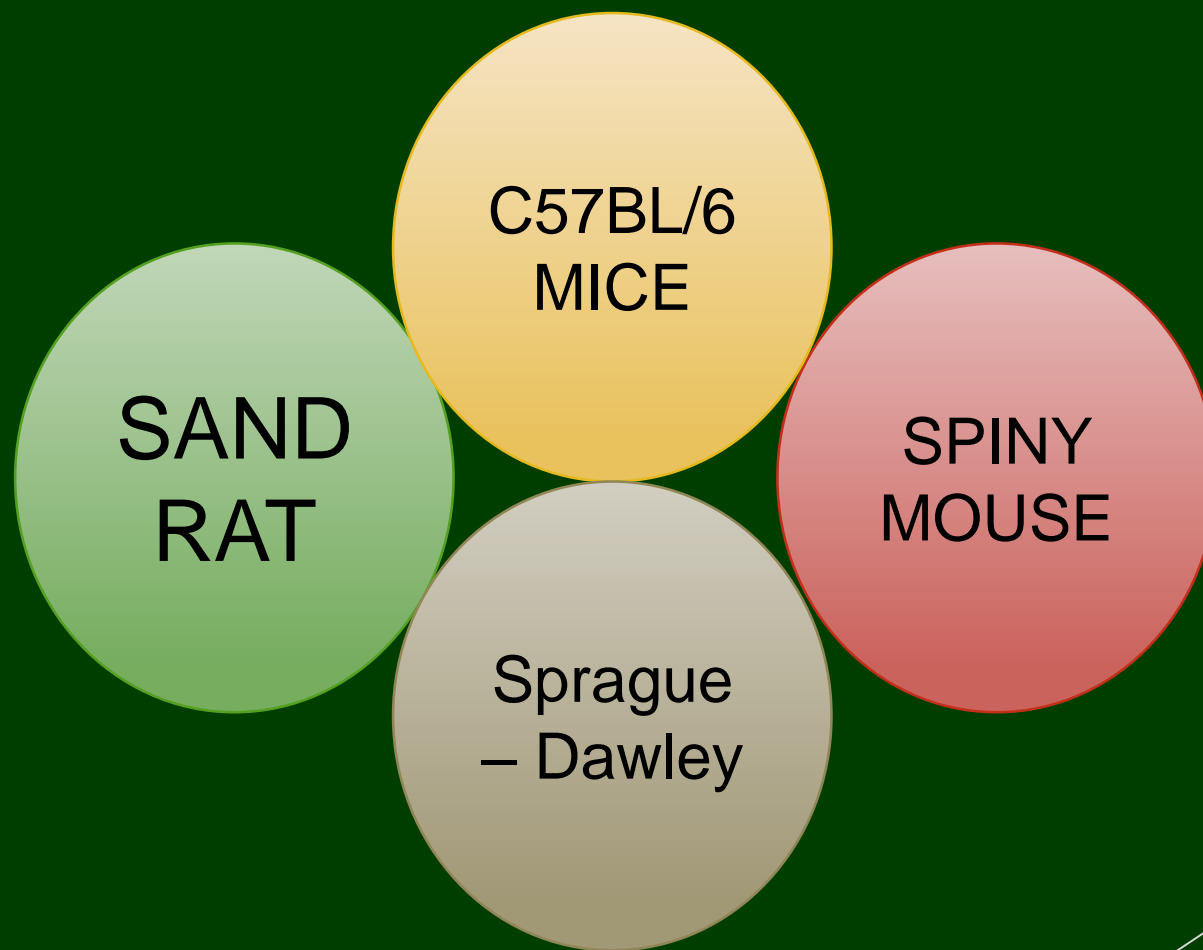
- + Tác động của yếu tố môi trường bên ngoài lên bệnh ĐTĐ tuýp 2
- + Biểu hiện kiểu hình của bệnh ĐTĐ và sự ảnh hưởng hành vi tình dục bởi biểu hiện kiểu hình của ĐTĐ

THỨ PHÁT DO THỨC ĂN

CHẾ ĐỘ ĂN
GIÀU CHẤT
BÉO

CHẾ ĐỘ ĂN
CHỨA
FRUCTOSE

CHẾ ĐỘ ĂN GIÀU CHẤT BÉO



CHẾ ĐỘ ĂN CHỨA FRUCTOSE

- Có những triệu chứng như tăng mỡ máu, tăng nồng độ insulin, và sự kháng insulin
- Lượng calo trong chế độ ăn vào khoảng từ 35-72%, hoặc 10-15% fructose trong nước uống và cho ăn từ 2-12 tuần.
- Hạn chế của mô hình này là mất một thời gian khá dài để gây ra được những đặc điểm bệnh chính của ĐTĐ tuýp 2

THỨ PHÁT DO HÓA CHẤT

BÉO PHÌ

KHÔNG
BÉO PHÌ

THỨ PHÁT DO HÓA CHẤT GÂY BÉO PHÌ



Goldthioglucose (GTG)

- Tiêm bụng liều 150-350mg/kg
- Có dấu hiệu béo phì, tăng nồng độ insulin máu, tăng glucose máu, kháng insulin ở tuần 16-20

Monosodium Glutamate (MSG)

- Tiêm MSG (2mg/kg) trên những con chuột sơ sinh (1 đến 5 ngày tuổi).
- Sau 7 tuần tuổi chuột có dấu hiệu tăng cân
- Sau 8 tuần, con đực có sự bài tiết insulin qua đường tiểu, con cái sau 19 tuần
- Sau 12 tuần, con đực có dấu hiệu giảm dung nạp glucose và kháng insulin
- Con đực, gan bị kháng insulin
- Hạn chế của mô hình này là có sự phát triển của những khối u nhỏ ở gan

THỨ PHÁT DO HÓA CHẤT KHÔNG GÂY BÉO PHÌ

STZ hoặc Alloxan trên chuột trưởng thành

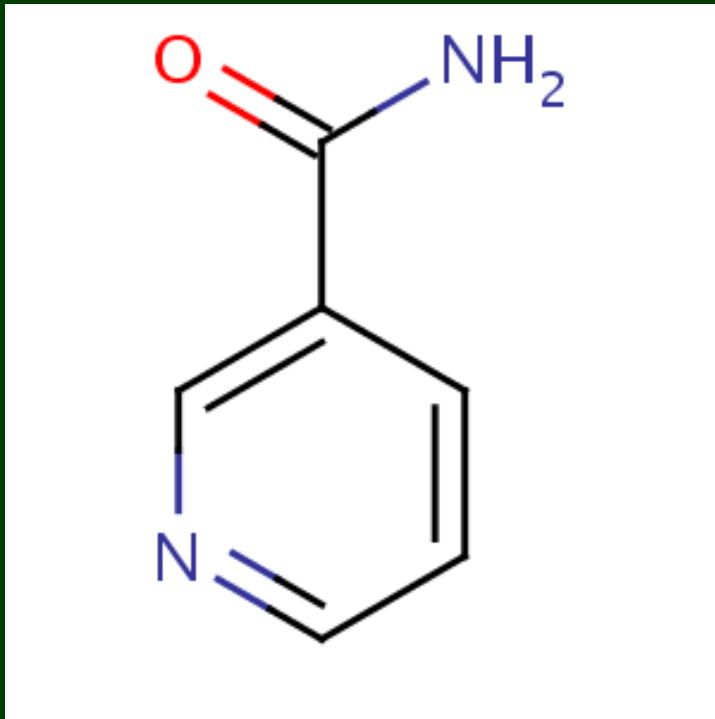
STZ hoặc Alloxan trên chuột sơ sinh

STZ và Nicotinamide

STZ và chế độ ăn giàu chất béo

V.V. ...

CƠ CHẾ CỦA NICOTINAMIDE



- Vitamin thuộc nhóm B
- Nicotinamide hoạt động như một chất có khả năng ức chế ADP-ribose polymerase (PARR) yếu, chống oxy hóa, ức chế quá trình chết theo chu trình của các tế bào ở mô bị thiếu máu cục bộ
- Nicotinamide còn là tiền chất cho coenzyme β – (NAD⁺).

Thảo luận





Liên hệ:

Th.S. Bùi Nguyễn Tú Anh

Email: bntanh@hcmus.edu.vn

Viện tế bào gốc

B2-3. KHTN, Linh Trung, Thủ Đức