

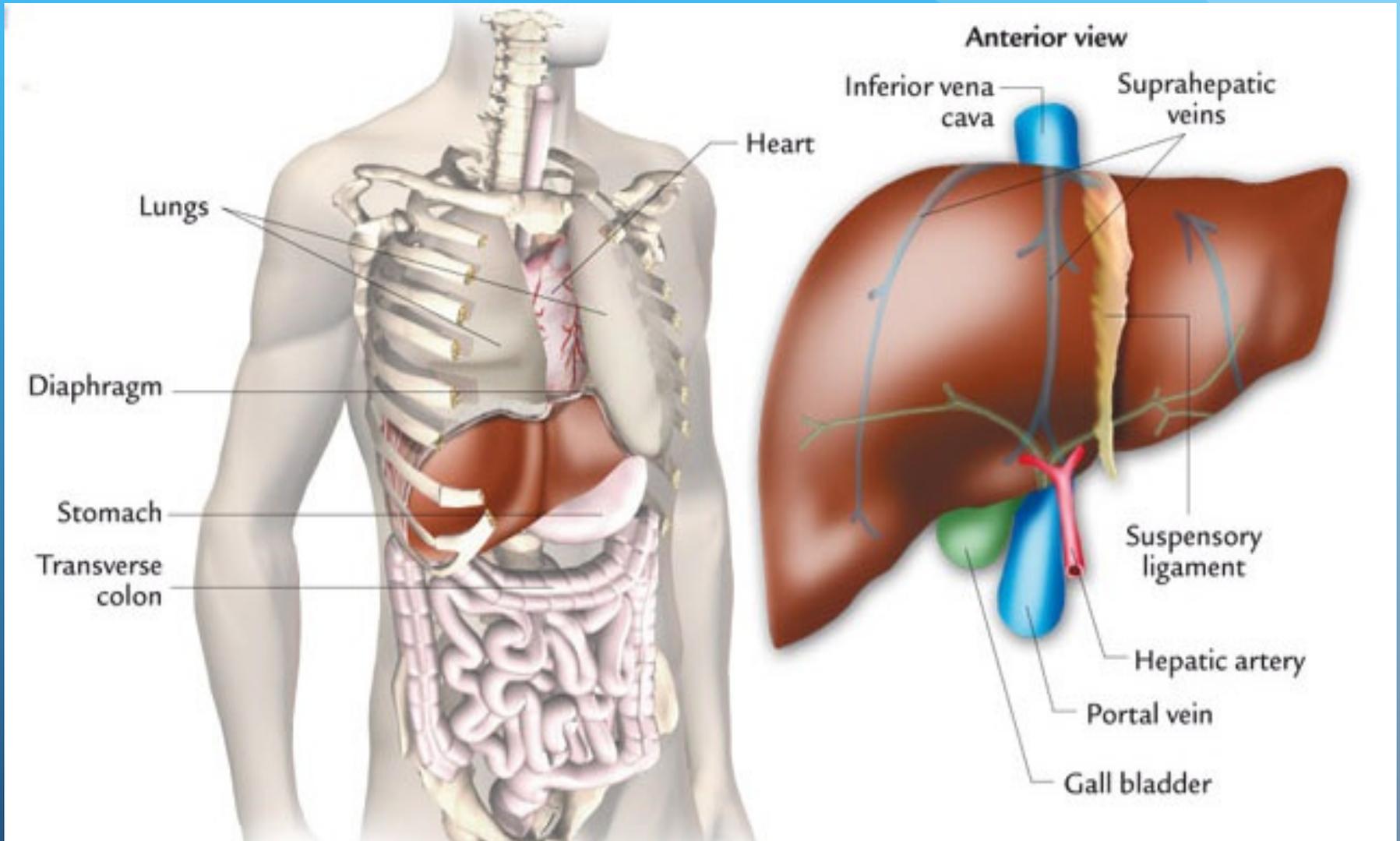
MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT BỆNH LÝ VỀ GAN

ThS.GV Trương Hải Nhung

BM. Sinh lý học và CNSH Động vật

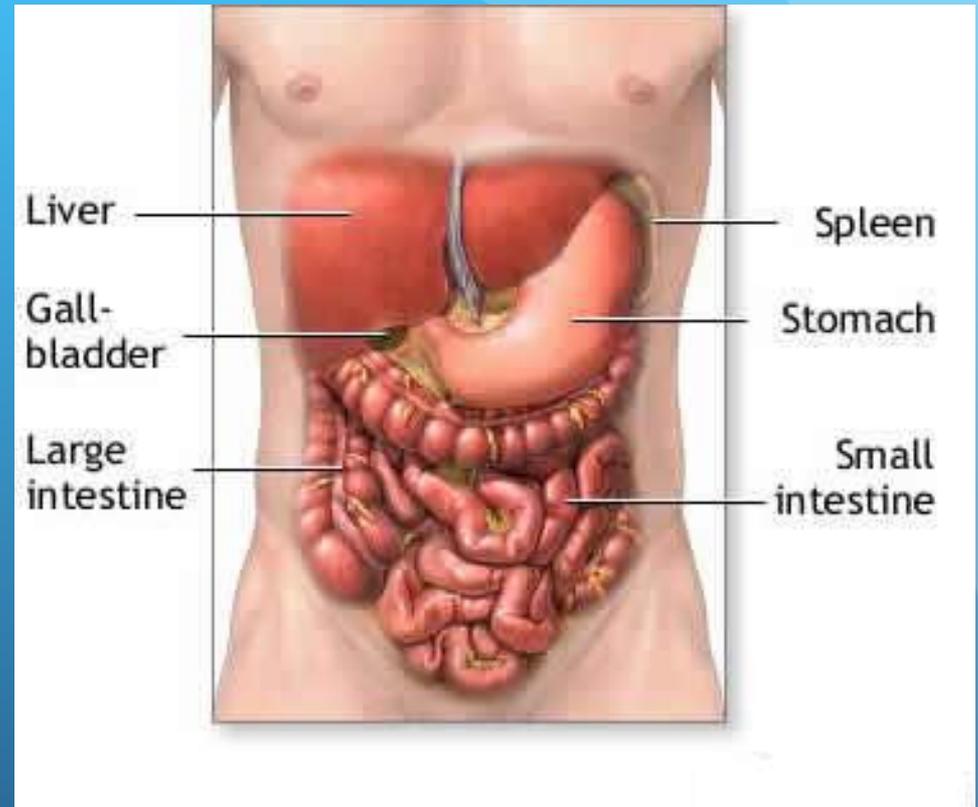
PTN Nghiên cứu và Ứng dụng Tế bào gốc

GAN



Cấu tạo gan

- Ở người trưởng thành, gan nặng 1,4 -1,6 kg
- Nằm ở phía trên, bên trái của bụng và phía sau xương sườn

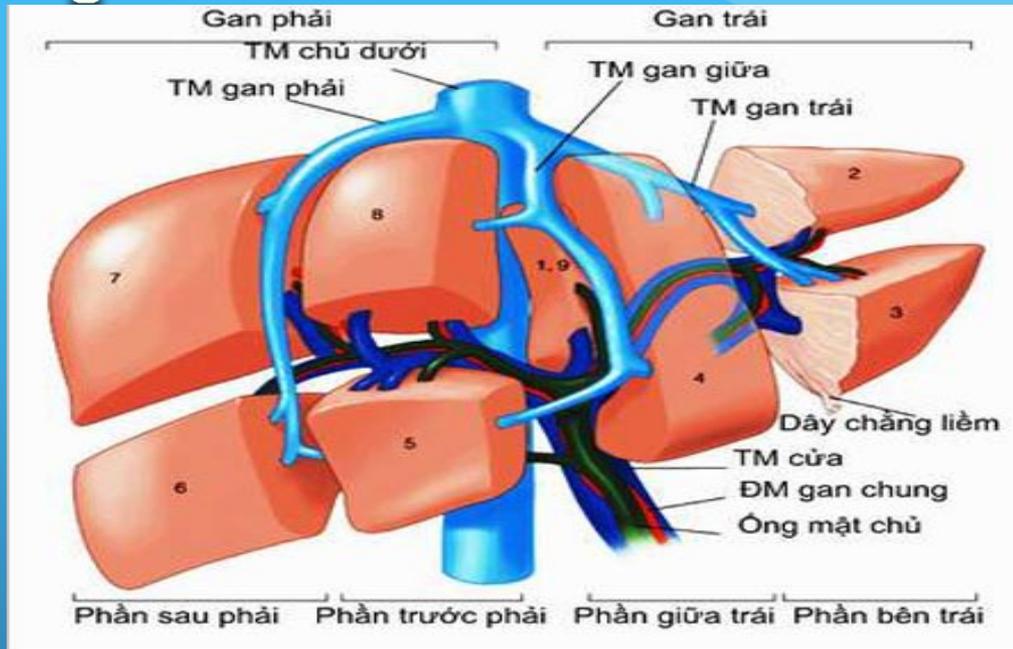


SINH HỌC GAN



- ◆ Là một cơ quan lớn nhất trong cơ thể người, trung gian giữa tiêu hóa và các nhu cầu trao đổi chất của cơ thể..
- ◆ Đơn vị cấu tạo và chức năng là các tiểu thùy gan (khoảng 50.000- 100.000 ở người trưởng thành)
- ◆ Tế bào gan hình đa giác, nhân tròn nằm ở trung tâm.
- ◆ Trong tế bào chất có nhiều ty thể và các túi thực bào

CẤU TẠO GAN



Chia thành 4 thùy: Thùy phải (lớn nhất); thùy trái; thùy vuông và thùy đuôi.

Máu được mang đi bởi các tĩnh mạch gan

Được kết nối với cơ hoành và thành bụng bởi 5 dây chằng.

- Gan là cơ quan duy nhất ở người có đặc tính tự tái sinh

Gan có : nhu mô gan (hepatocyte) chiếm 80%

20% là sinusoidal cell:

- Tế bào nội mô (endothelial cell)
- kupffer cell (đại thực bào cư trú trong gan)
- lymphocyte gan
- HSC-tế bào hình sao (Hepatic Stellate cell)

Dây gan

Vi ống mật

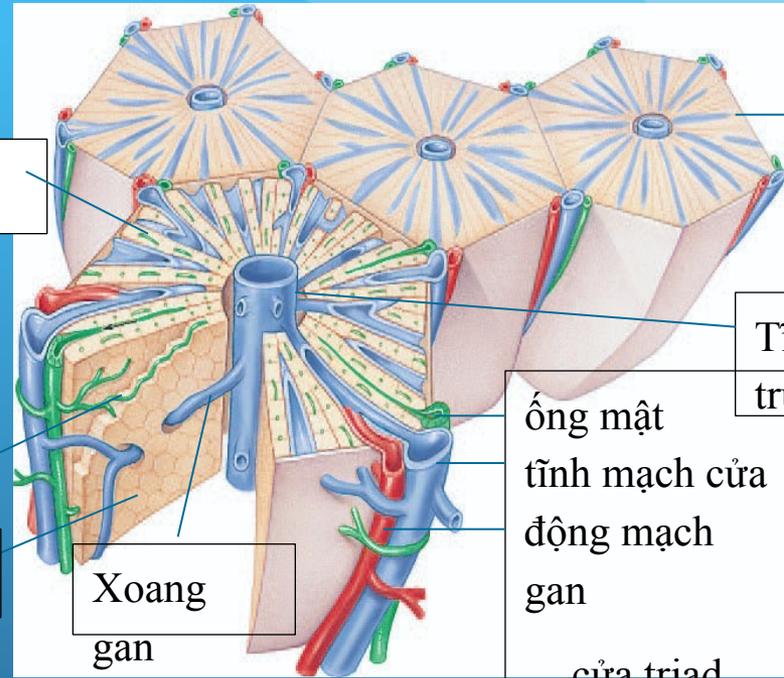
Tế bào gan

Xoang gan

Tiểu thùy gan

Tĩnh mạch trung tâm

ống mật
tĩnh mạch cửa
động mạch gan
cửa triad



Hình: Cấu trúc tiểu thùy gan

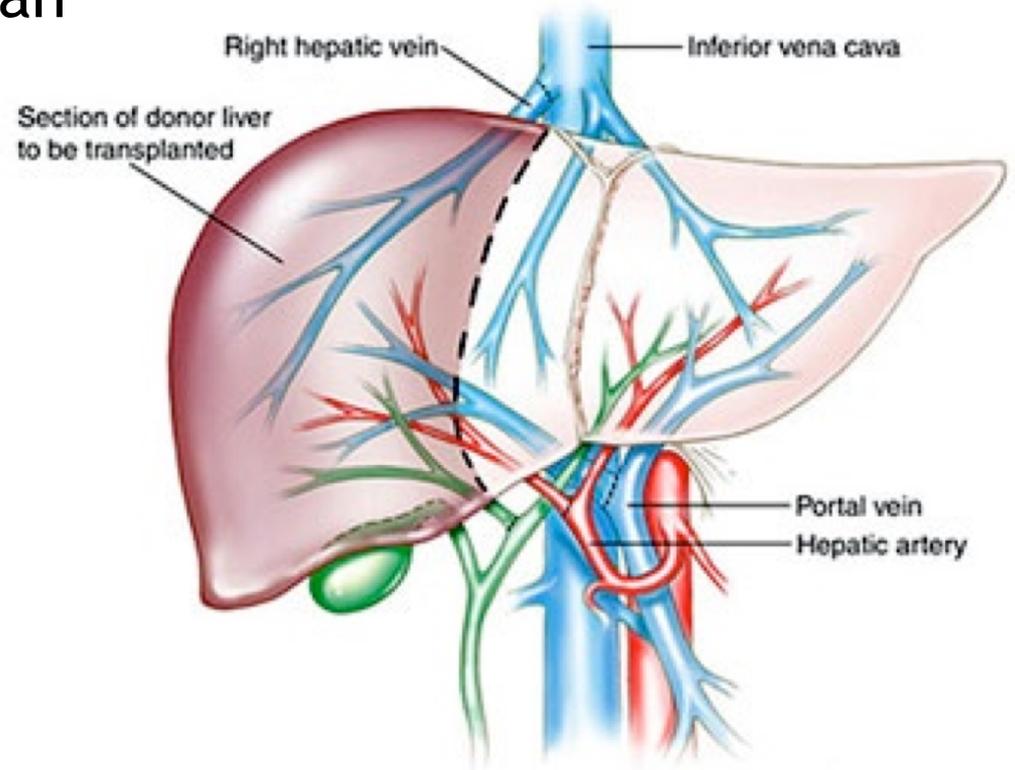
Các thùy gan được chia nhỏ thành nhiều đơn vị gọi là tiểu thùy (lobule), là những đơn vị cấu trúc mô học và chức năng chính của gan, có hình khối trụ, mặt cắt ngang có hình đa giác

❖ Giai đoạn phôi thai: cơ quan sản xuất hồng cầu

Giai đoạn trưởng thành

Gan có hơn 200 chức năng, bao gồm:

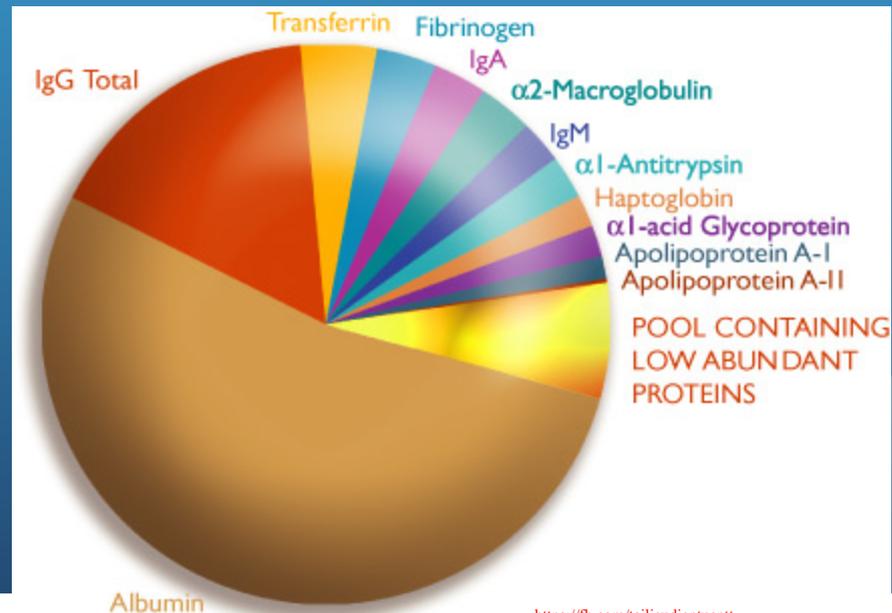
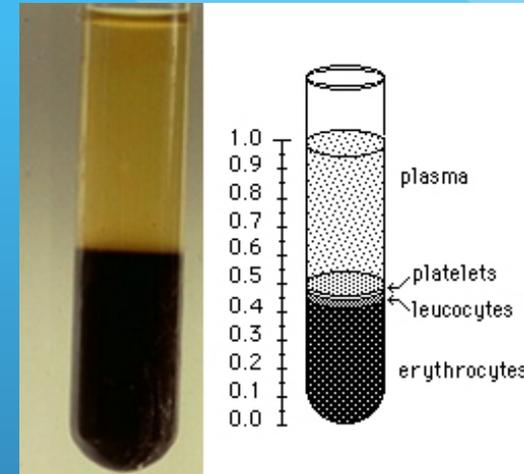
- Chức năng tiết: acid mật, cholesterol, bilirubin
- Chức năng tổng hợp: carbohydrate, lipid, protein
- Dự trữ: glycogen, vitamin, sắt, máu
- Chức năng khử độc



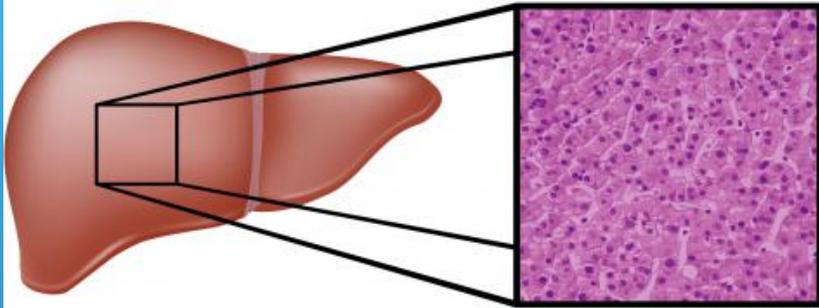
Chức năng

Tổng hợp Protein huyết tương

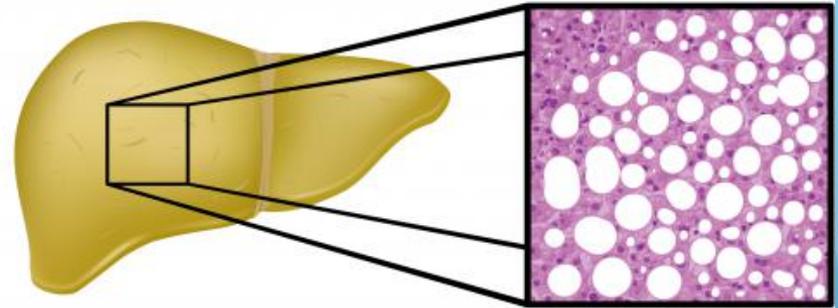
- Được sản xuất bởi lưới nội chất nhám của tế bào gan
- 3 loại chính
 - Albumin
 - Globulin
 - Fibrinogen



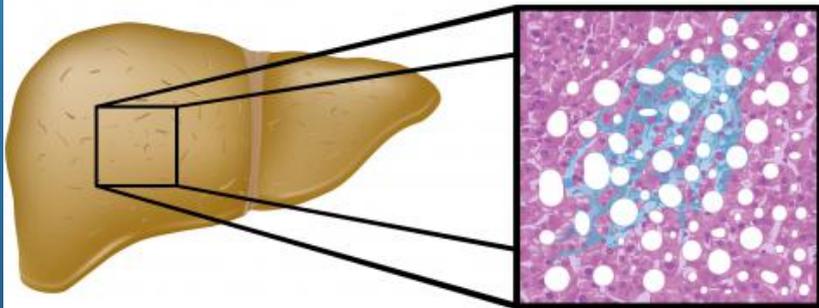
BỆNH VỀ GAN



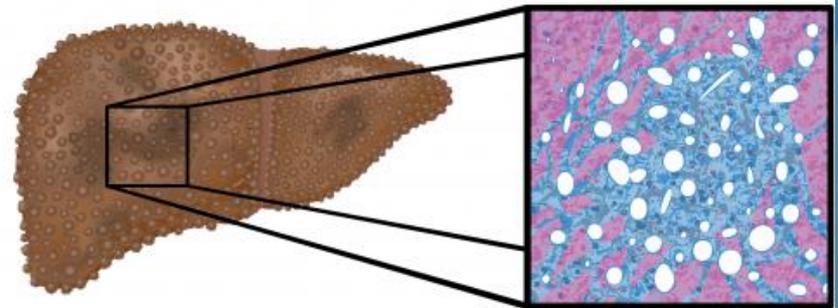
healthy liver
GAN KHOẺ MẠNH



hepatic steatosis
GAN NHIỄM MỠ



hepatic fibrosis
XƠ GAN



hepatic cirrhosis
CHAI GAN

- Viêm gan: virus (HBV, HCV), rượu, hoá chất,...
- Xơ gan
- Ung thư gan

Đánh giá tổn thương gan dựa vào men gan

Tế bào gan

AST (aspartate transaminase)/SGOT (serum glutamic oxaloacetic transaminase)

ALT (alanin transaminase)/SGPT (serum glutamic pyruvic transaminase): đặc trưng cho gan bị tổn thương

Màng tế bào gan: alkaline phosphatase

Thành tế bào ống mật: GGT (gamma glutamyl transpeptidase)

Nồng độ SGPT và SGOT

>5 lần: nặng

Tăng 2-5 lần: trung bình

Tăng 1-2 lần: nhẹ

<40 U/L huyết thanh: bình thường

Đánh giá các bệnh về gan

- Đánh giá men gan: AST, ALT, Bilirubin, GGT, ...
- Đánh giá chức năng gan: Albumin, thời gian prothrombin
- Siêu âm gan
- Sinh thiết gan: đánh giá tổ chức mô học

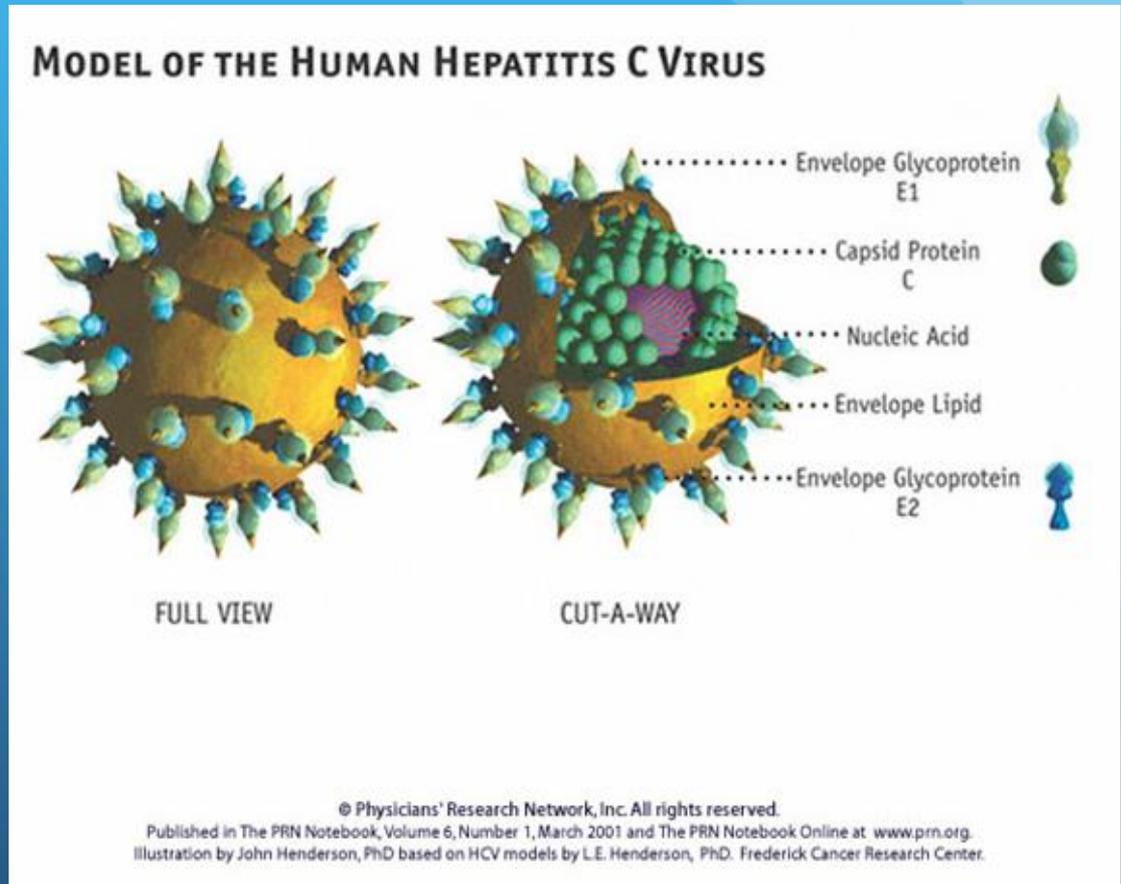
Viêm gan siêu vi C

Hiện nay khoảng 2% dân chúng toàn cầu đang bị viêm gan C

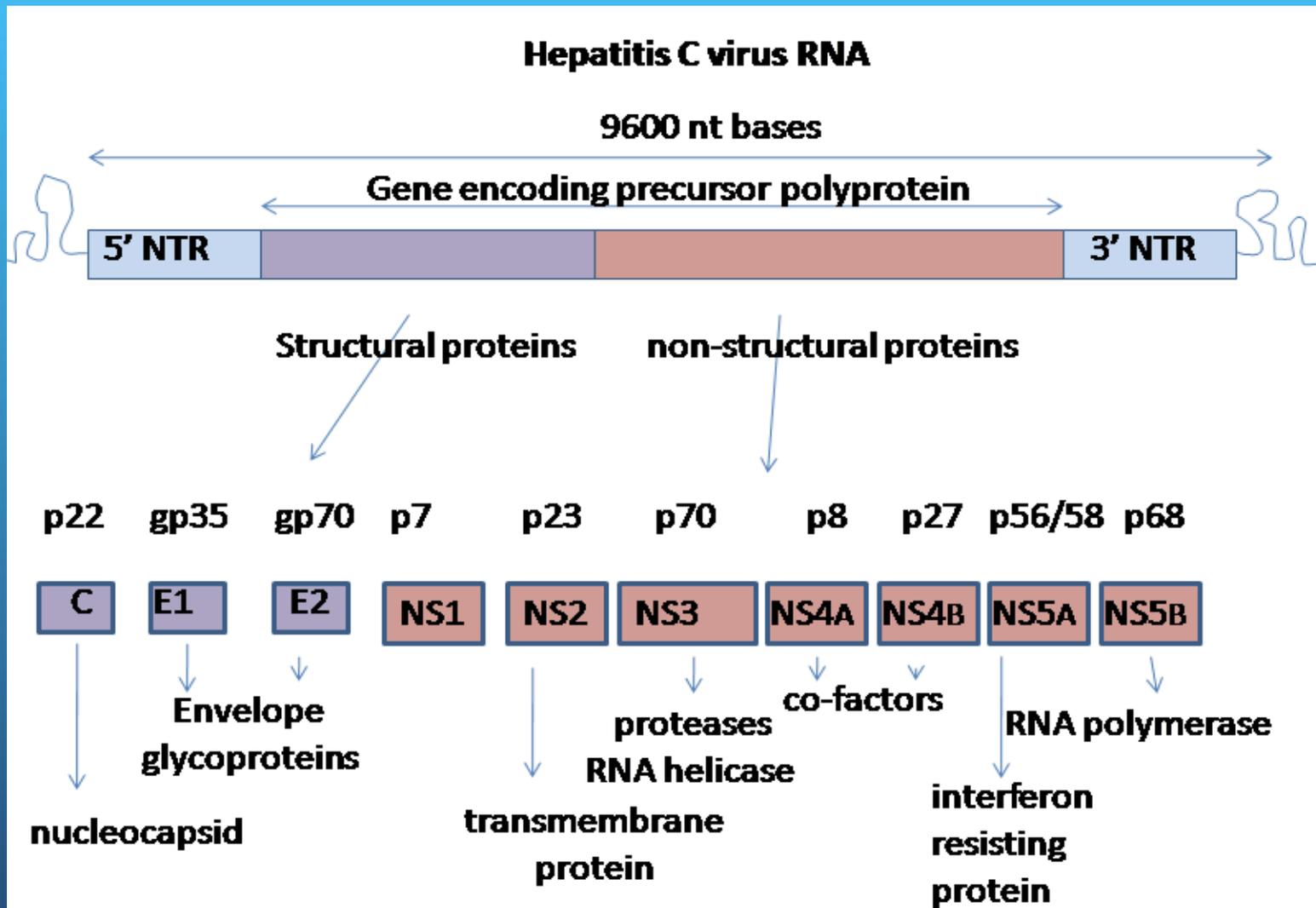
- ❖ Vi khuẩn viêm gan C là nguyên nhân hàng đầu gây ra viêm gan kinh niên tại Hoa Kỳ. Trên nước Mỹ, với hơn 4 triệu người đang bị viêm gan C kinh niên, gần 10.000 người tử vong mỗi năm vì căn bệnh này.
- ❖ Khoảng 80% bệnh nhân khi bị lây bệnh viêm gan C sẽ trở thành dạng mạn tính. Trong số này, khoảng 20%-30% sẽ bị xơ gan và ung thư gan.

Khái quát về viêm gan siêu vi C

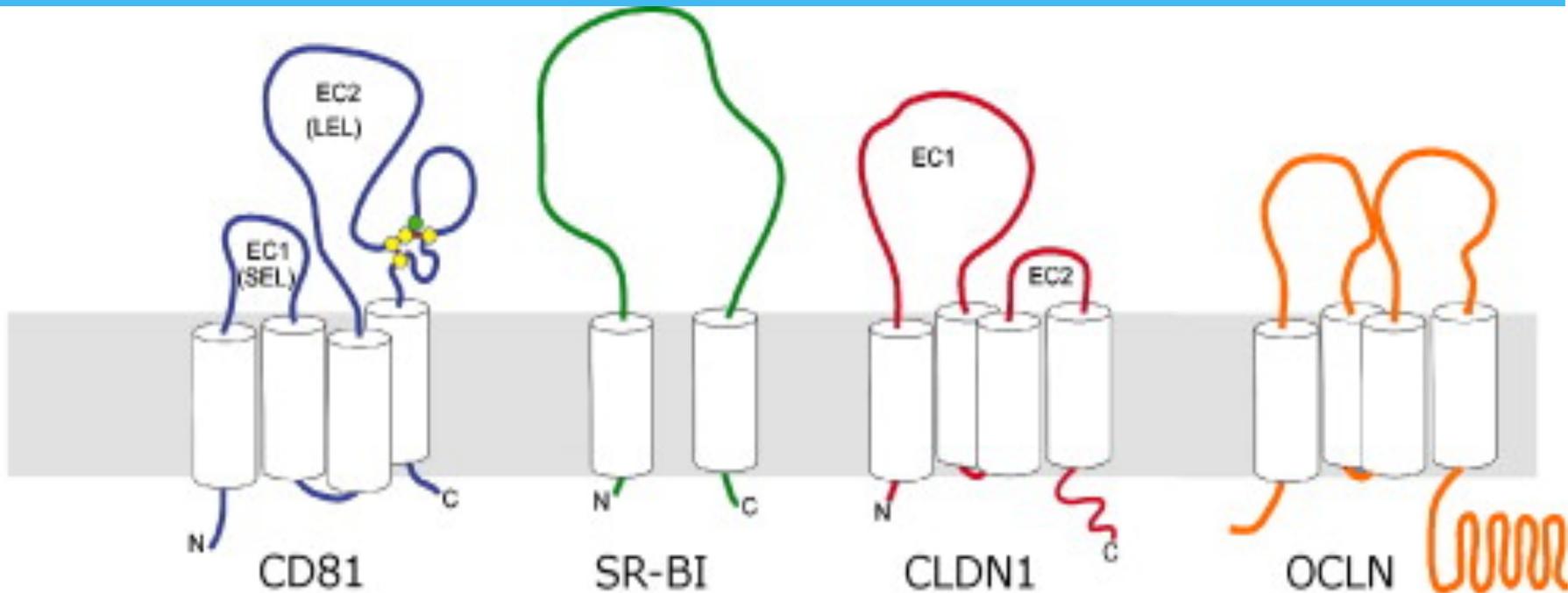
HCV là một loại vi khuẩn có RNA kỳ lạ với khả năng thay đổi đặc tính di truyền một cách nhanh chóng và dễ dàng



Thuộc họ Flaviridae, giống *Hepacivirus*.



Các thụ thể đích HCV tấn công



Expression:	Ubiquitous	Liver/Adrenal	↑ Liver	Ubiquitous
Receptor:	HCV E2	HCV E2	§	§
Role:	Attachment Internalization	Attachment	Internalization	Internalization

5. Dấu hiệu, triệu chứng

Viêm gan C cấp tính

Đau ốm như bị cúm	Sình bụng	Buồn nôn
Mệt mỏi (nhẹ đến nặng)	Đau vùng bụng	Nôn mửa
Ăn không ngon (biếng ăn)	Sốt	Đổ mồ hôi vào đêm
Tiêu chảy	Vàng da	Khó tiêu
Nhức bắp thịt, khớp	Nhức đầu	

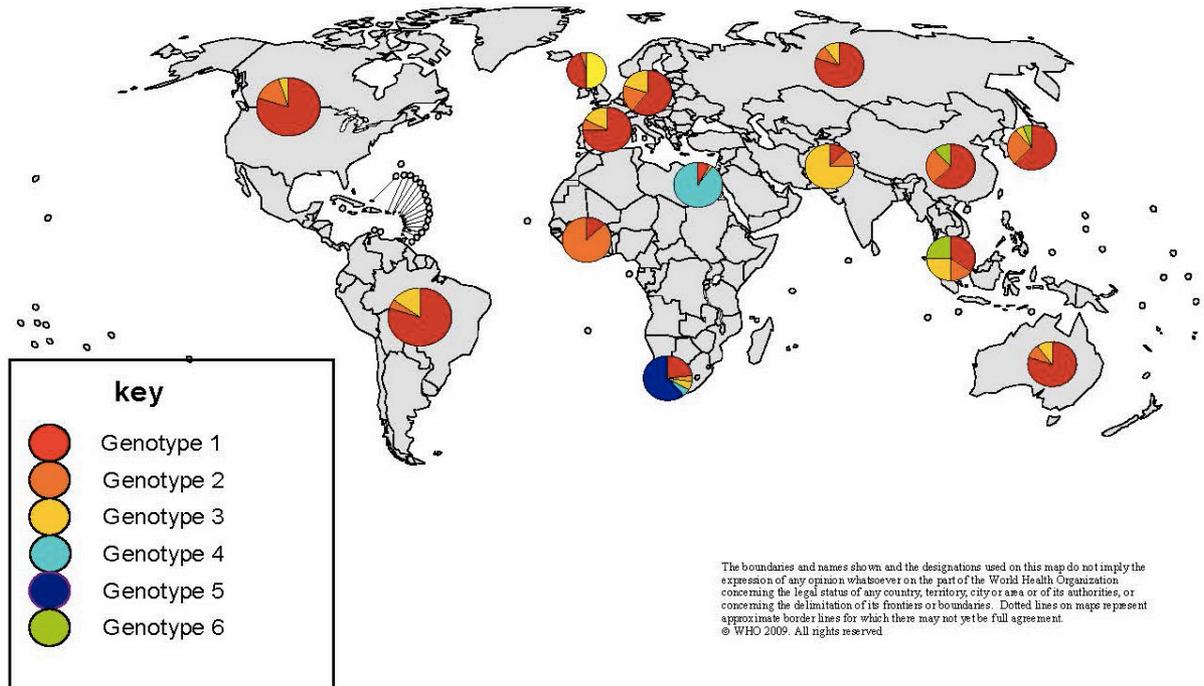
Viêm gan C mạn tính

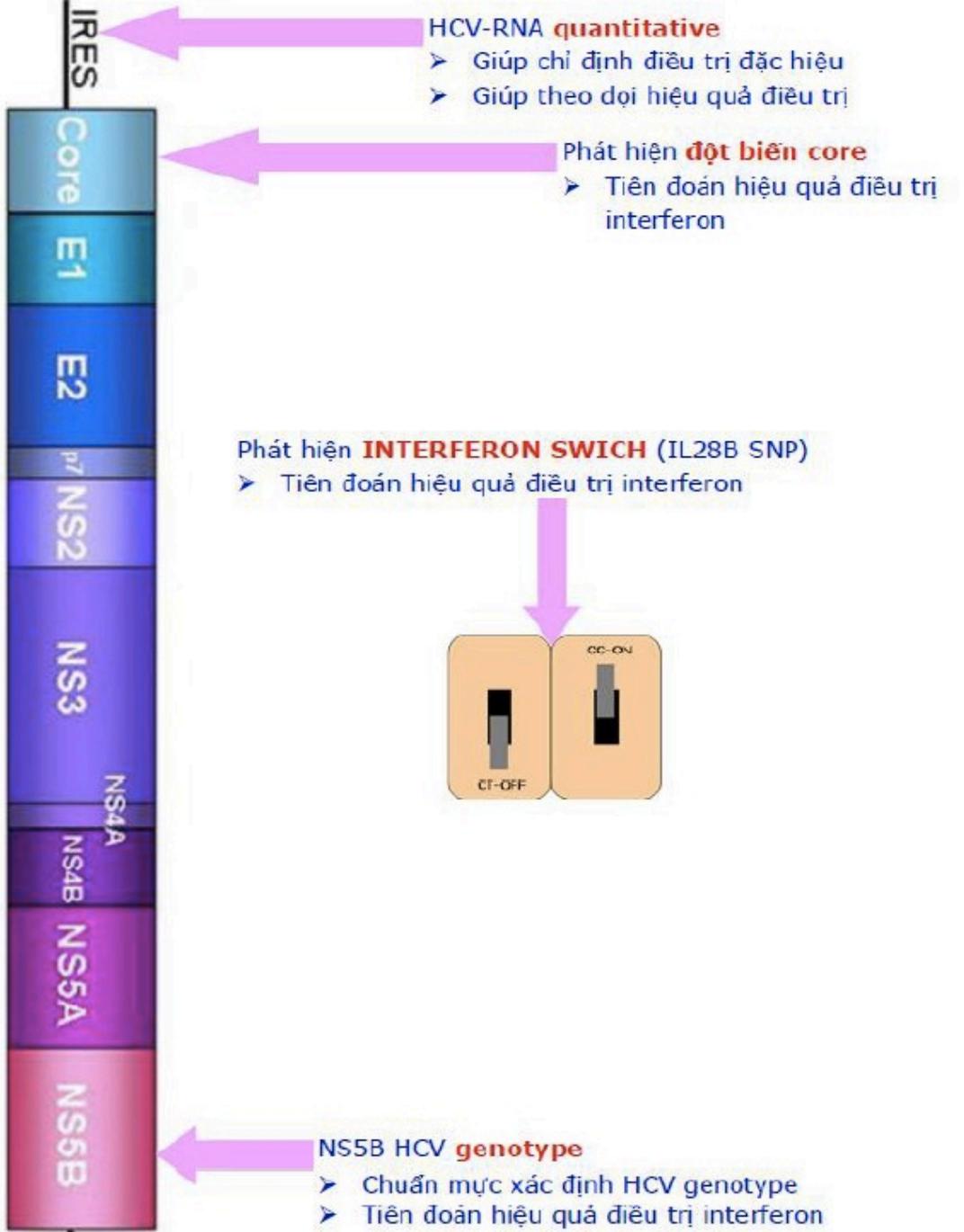
Mệt mỏi (nhẹ đến nặng)	"Brain fog" (Rối trí)	Tâm thần bất thường
Ăn không ngon (biếng ăn)	Buồn nôn	Khó tiêu
Nhức bắp thịt, khớp	Đau vùng bụng	Sốt
Nhức đầu	Trầm cảm	

Region	Predominant HCV genotype
Europe, North America, Japan	Genotype 1a, 1b (genotypes 2 & 3 are less common)
Southeast Asia	Genotype 3
Egypt, the Middle East, Central Africa	Genotype 4
South Africa	Genotype 5
Asia	Genotype 6



Global distribution of HCV genotypes





CÁC LOẠI MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT BỆNH VIÊM GAN C

1. TRÊN LINH TRƯỞNG

✓ Trên tinh tinh

Đóng vai trò chính trong việc khám phá ra HCV

Có giá trị cho nghiên cứu ở mức độ phân tử, miễn dịch và các khía cạnh lâm sàng của sự lây nhiễm HCV

Cảnh báo được sự xâm nhiễm của virus, sự đáp ứng của tế bào chủ

Nghiên cứu phát triển nhiều loại vaccine dự phòng khác nhau

Ưu điểm

Tinh tinh không giống hoàn toàn như ở người

Độ mãn tính của HCV ở tinh tinh thấp hơn ở người

Đạo đức và tài chính, số lượng tinh tinh nghiên cứu thường bị giới hạn

Nhược điểm

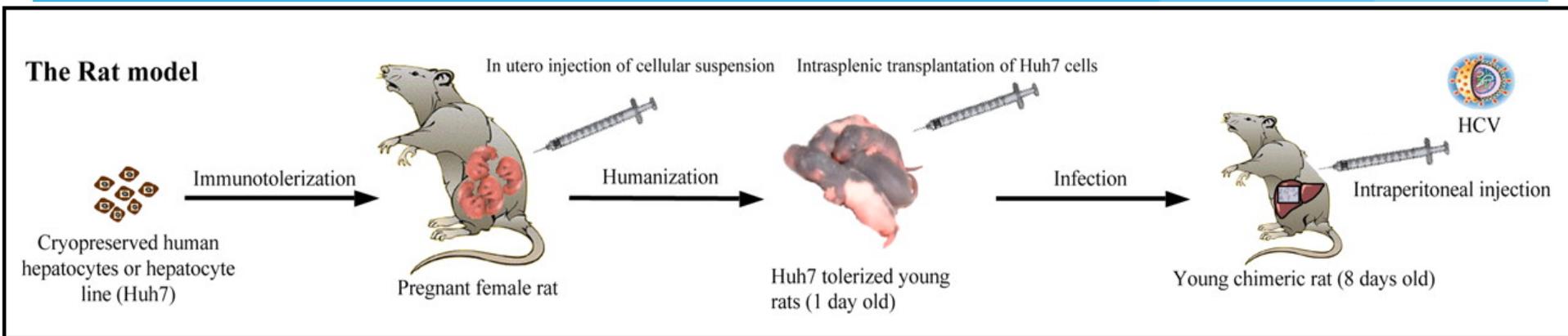
✓ Trên khỉ *Callithricidae*

- Trên *Saguinus mystax* và *S. labiatus*: tỷ lệ lây nhiễm cao.
- Trên *Saguinus Oedipus Oedipus*: có khả năng chống chịu với HCV

=> nghiên cứu miễn dịch và đánh giá của các thuốc kháng virus.

2. MÔ HÌNH TRÊN CHUỘT

✓ Mô hình trên chuột Rat



Ưu điểm:

Quá trình sao chép của virus khá thành công.

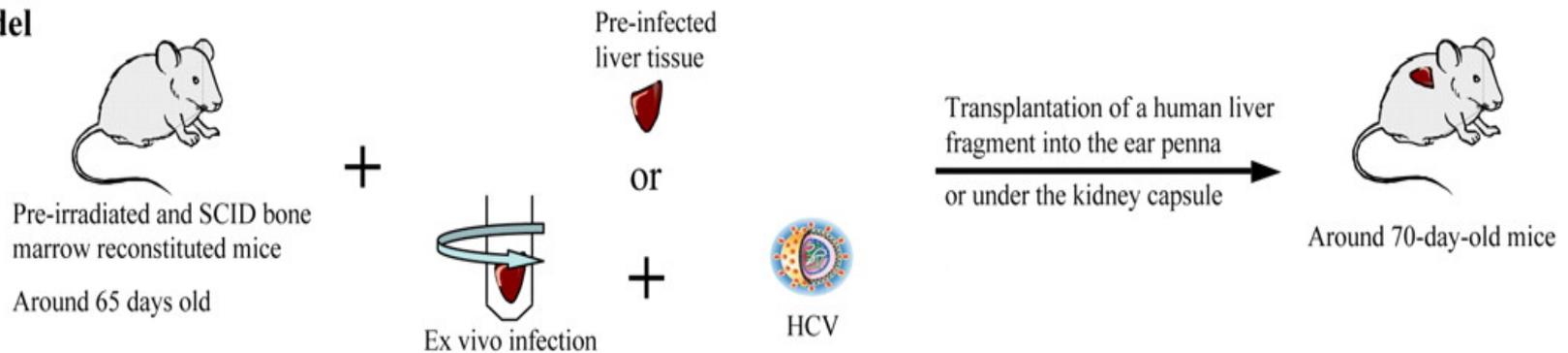
Nhược điểm:

Mức độ cấy ghép khá thấp → sự phát triển của tế bào u gan và lượng virus trong máu không cao.

Sự khác nhau ở phân tử MHC của người và chuột → đáp ứng miễn dịch không giống nhau trước sự xâm nhiễm của tế bào khối u.

✓ Mô hình Trimerera

The Trimerera model



- **Ưu điểm:** sử dụng để thử nghiệm chất kháng HCV.
- **Nhược điểm:** Có thể không ghép đúng vị trí, gây biến chứng: chứng thiếu máu cục bộ, chứng viêm mô xơ, mất cấu trúc chức năng, gây chết.

MÔ HÌNH CHUỘT CHUYỂN GEN MANG THỤ THỂ TB GAN NGƯỜI

1. ĐỐI TƯỢNG

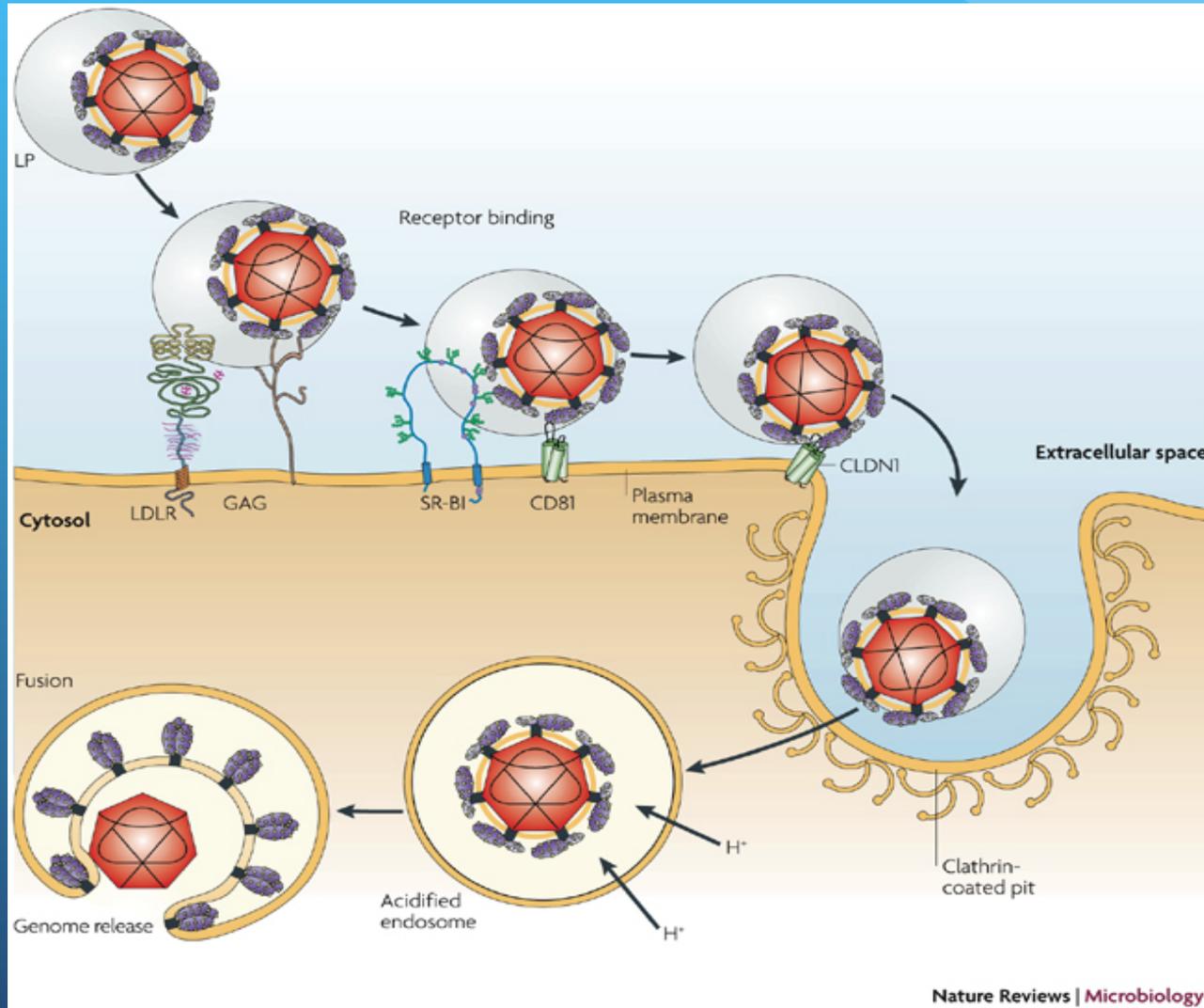
Chuột đực 3-6 tháng
tuổi

CHUỘT CHUYỂN
GEN HUMAN
CD81



Chuột nhà *Mus musculus domesticus*

QUÁ TRÌNH XÂM NHIỄM CỦA HCV



TẠO PLASMID HUMAN CD81

NO HCV INFECTION TO HUMAN CD81 TRANSGENIC MICE

193

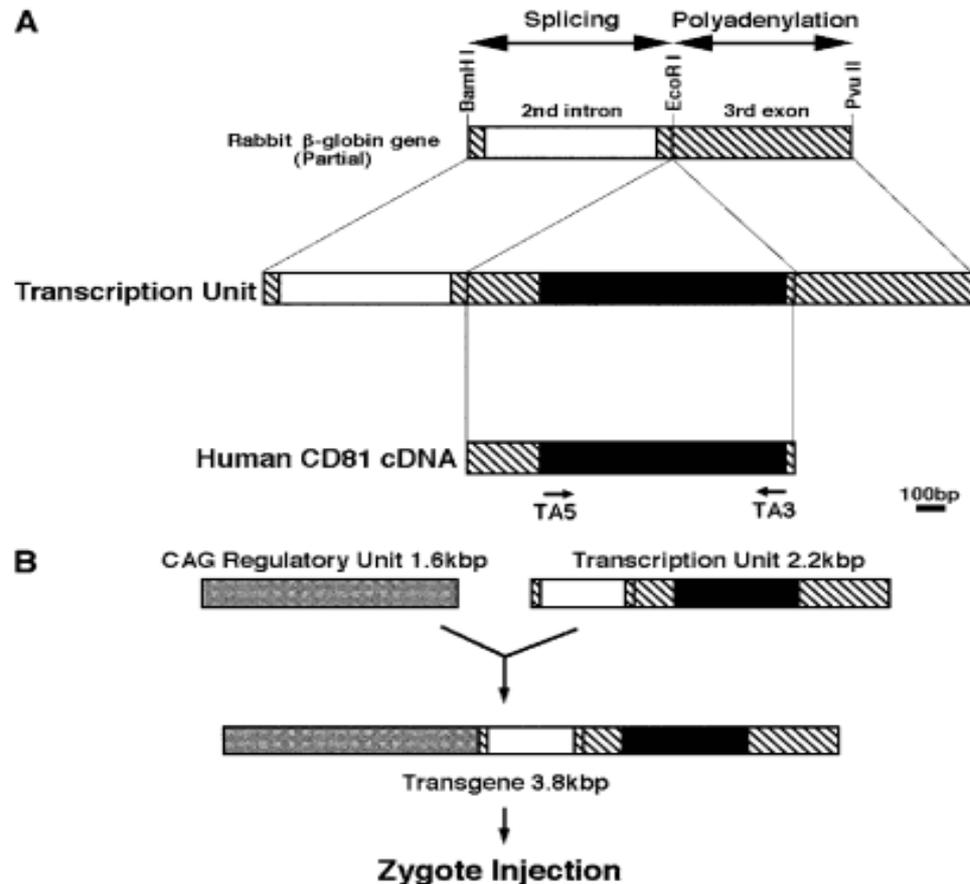


FIG. 7. Strategy to construct the human CD81 transgene. (A) Transcription unit of human CD81. The partial rabbit β -globin gene containing the 2nd intron and the 3rd exon was split and used for splicing and polyadenylation sites to ensure efficient transcription of the transgene. The intron is indicated as an open bar. The nontranslated exon and the human CD81-coding region are indicated as hatched and closed bars, respectively. The PCR primers to detect transgene integration in the mouse genome (TA5 and TA3) are indicated as small arrows (not drawn to scale). (B) Construction of the transgene. The CAG regulatory unit (indicated as a shaded bar) was joined at the 5' end of the transcription unit.

PHƯƠNG PHÁP TẠO CHUỘT CHUYỂN GEN HUMAN CD81

B

Transfect targeting construct into ES cells from mouse with dominant coat color

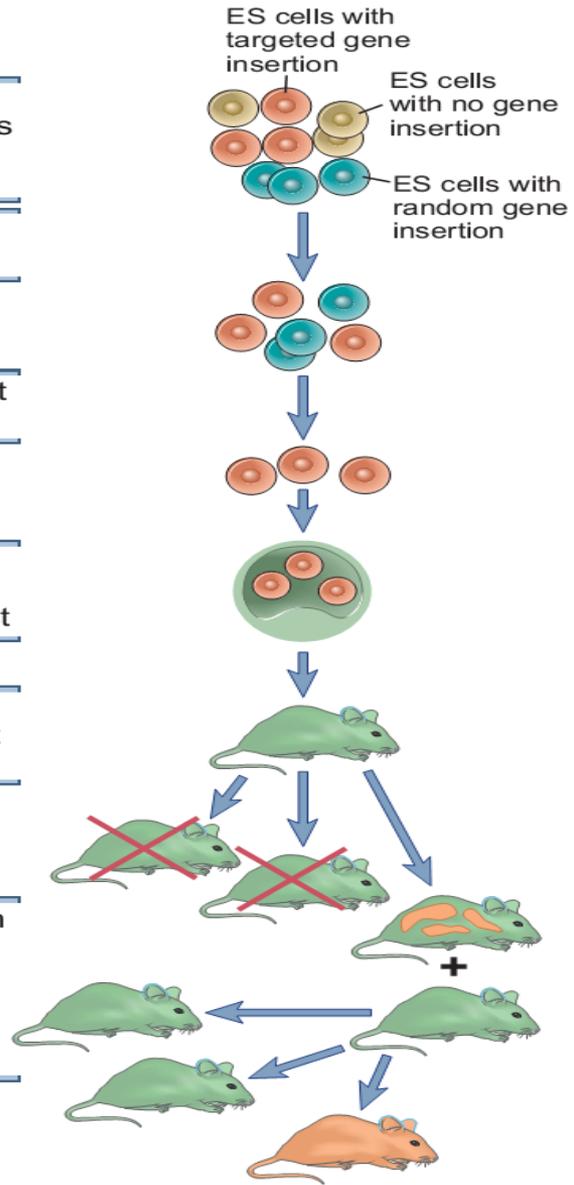
Neomycin treatment (positive selection)

Ganciclovir treatment (negative selection)

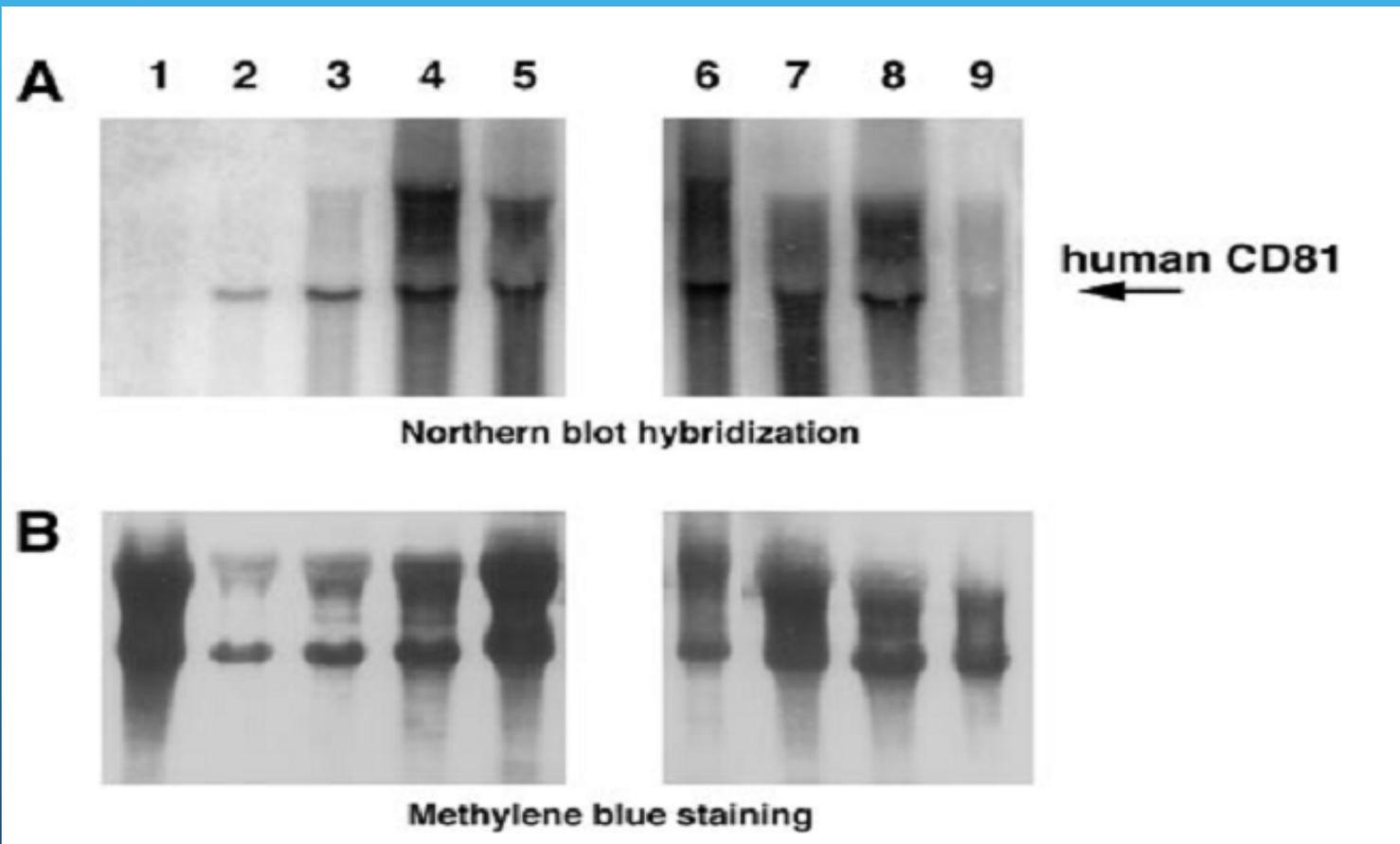
Inject ES cells with targeted mutation into mouse blastocyst

Implant blastocyst into pseudopregnant female mouse

Choose offspring with chimeric coat color partly derived from ES cells and breed to achieve germline transmission



➤ Biểu hiện được gene human CD81 trên con chuột biến đổi gen.



➤ NHƯỢC ĐIỂM

Các đột biến có thể chịu ảnh hưởng bởi sự biểu hiện các gene khác

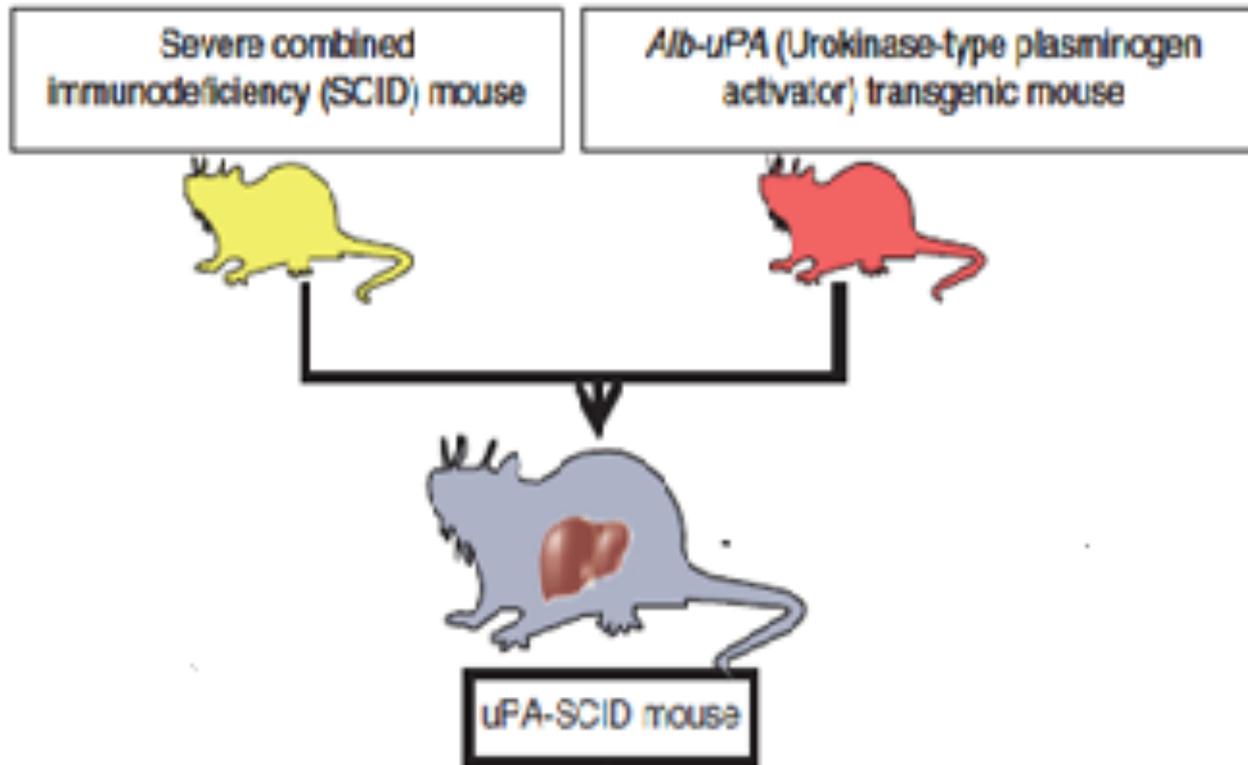
Khó khăn trong việc biểu hiện hay làm mất gen.

Gen chuyển có thể gắn vĩnh viễn lên bộ gen của cơ thể.

Một lượng lớn bản sao chèn một cách ngẫu nhiên trong hệ thống vật chủ

Chuột khảm uPA-SCID

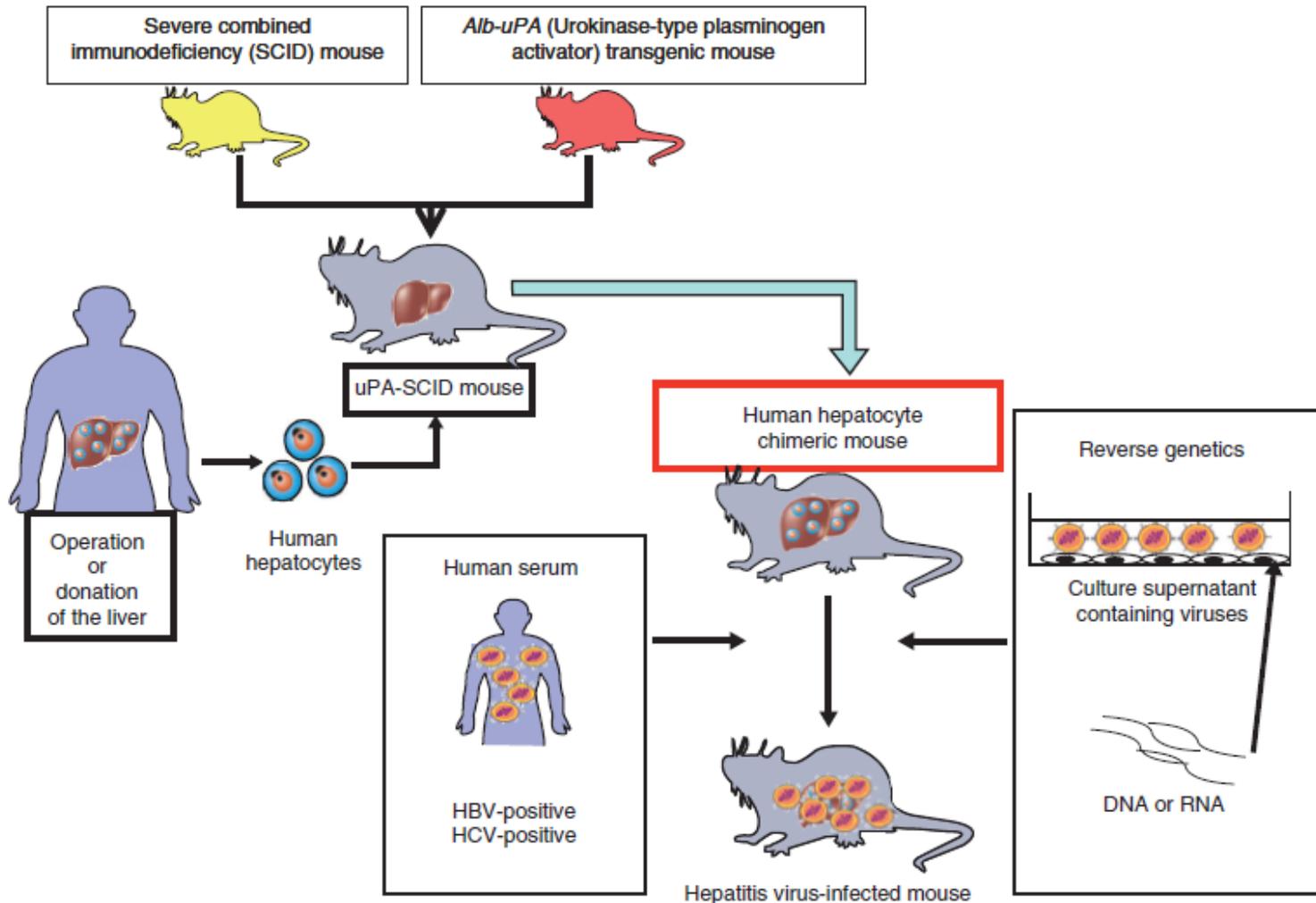
Human hepatocyte chimeric mice



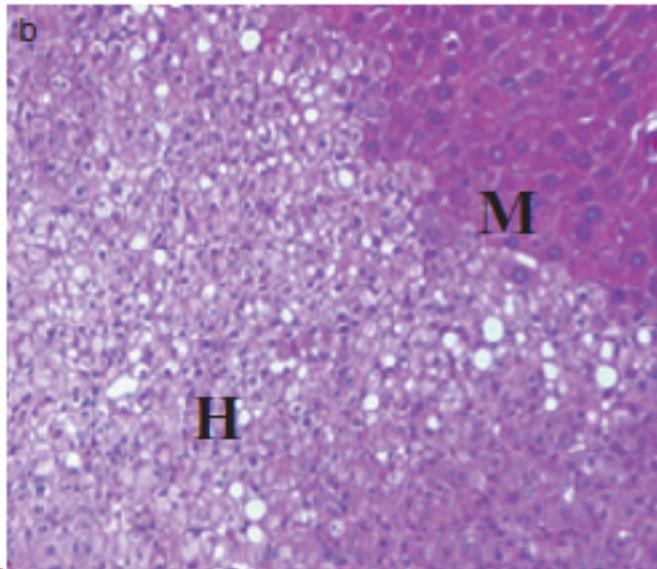
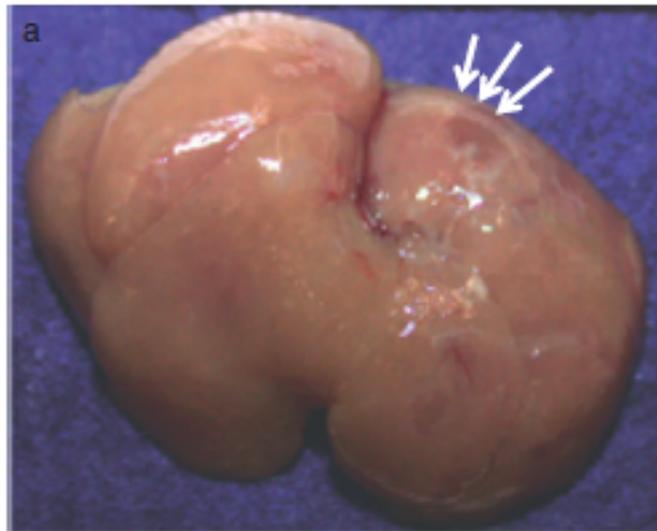
Phương pháp tạo mô hình

Human hepatocyte chimeric mice

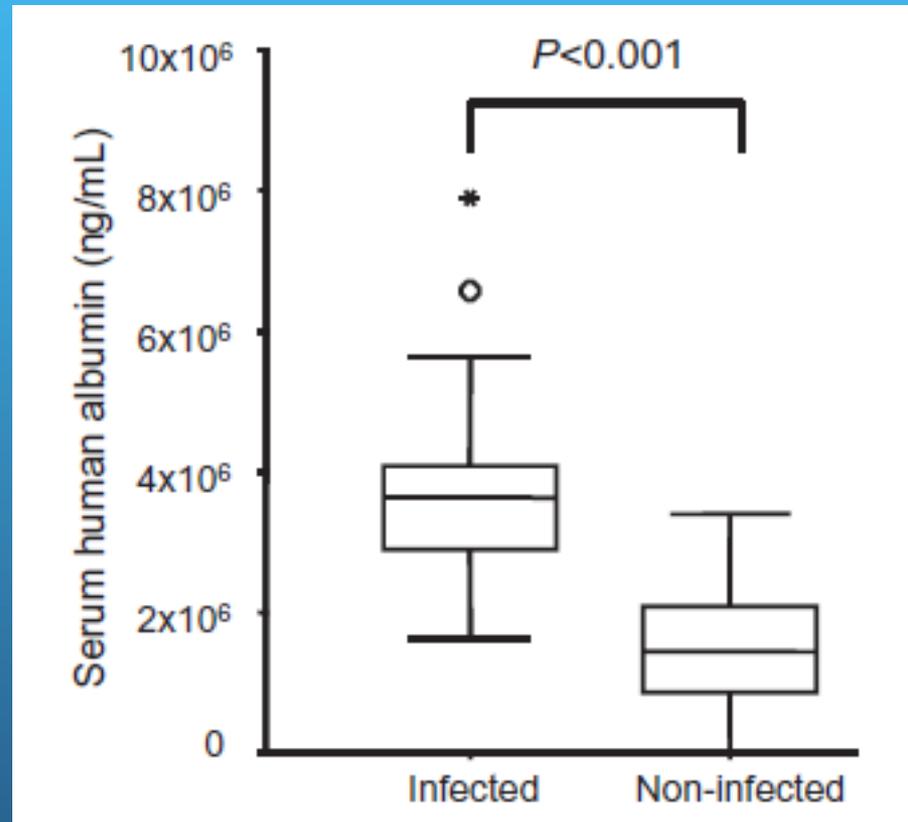
K Chayama *et al.*



Kiểm tra sự thành công của mô hình



Kiểm tra sự thành công của mô hình



Ưu nhược điểm của mô hình

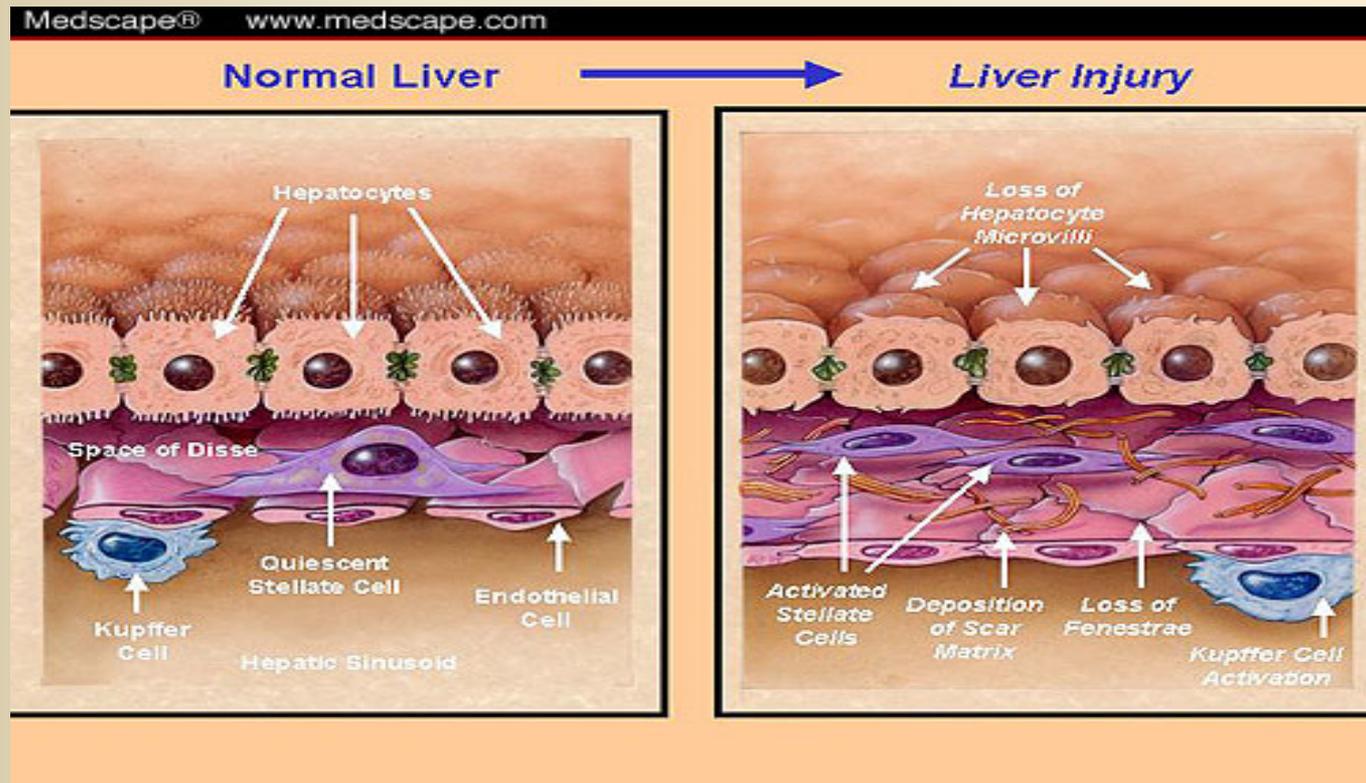
Ưu điểm

- Tỷ lệ cấy ghép thành công cao.
- Tỷ lệ lây nhiễm cao.
- Biểu hiện nhiều thụ thể cho HCV.

Nhược điểm

Không dùng để nghiên cứu trực tiếp đáp ứng miễn dịch TB và miễn dịch dịch thể.

BỆNH XƠ GAN



Xơ hóa thay thế cấu trúc gan bình thường

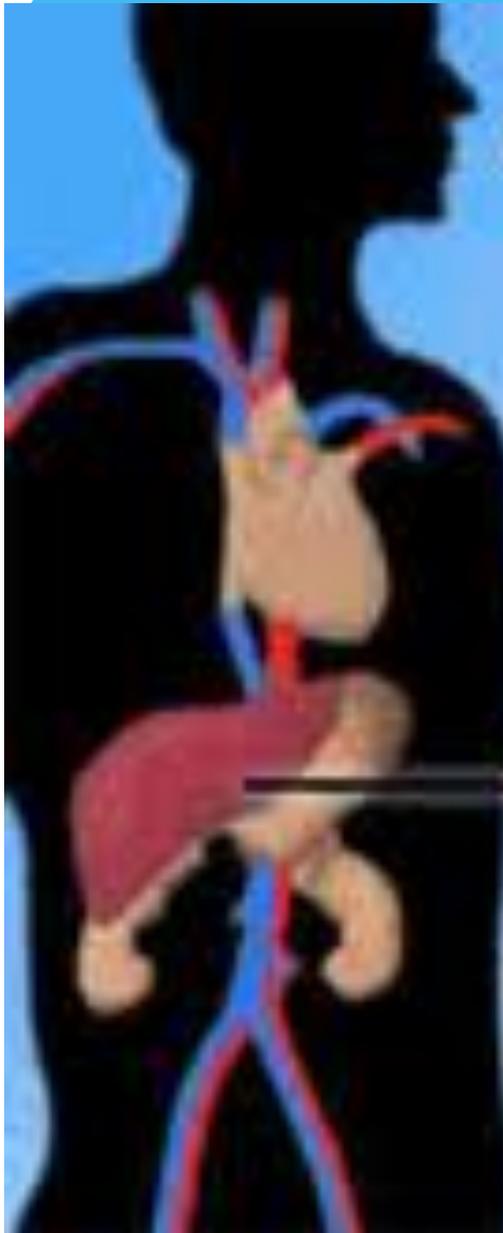
Thoái hóa tế bào xảy ra

Gan cố gắng để tái tạo các tế bào, nhưng tế bào bất thường và vô tổ chức

Nguyên nhân bất thường lưu lượng máu và bạch huyết

Kết quả hình thành nhiều mô sợi hơn

Quá trình hủy hoại Tế Bào Gan



Gan nhiễm mỡ



Sự thâm nhiễm mỡ
gây căng phồng
các Tế bào Gan



Xơ hóa Gan



Sẹo hóa
Tế bào mô của Gan



Xơ Gan



Sự tăng sinh
mô liên kết
gây phá hủy
Tế bào gan

CÁC LOẠI XƠ GAN

- Laennec' s (xơ gan do rượu)
- Postnecrotic (Sau hoại tử)
- Biliary (Xơ gan mật)
- Cardiac (xơ gan tim)



Triệu chứng

- Giai đoạn sớm: Rất ít triệu chứng rõ ràng, chỉ hơi đau ở hạ sườn phải, bụng trướng nhẹ, xuất hiện sự giãn các vi mạch ở cổ, mặt...
- Giai đoạn muộn: suy gan, tăng áp lực tĩnh mạch cửa và phù.



TRIỆU CHỨNG

Mạch máu nổi gân



Bàn tay son



Móng tay trắng

Các phương pháp xây dựng mô hình động vật bị xơ gan hiện nay

-Động vật biến đổi gene

-Thắt ống mật chủ

- Dùng hepatotoxins :chủ yếu là các chất isothiocyanate-alpha-naphthyl (Anit), Silica, Carbon tetrachloride (CCL4), rượu và allyl (AA), 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC).

Hoạt động của hepatotoxins chủ yếu làm hủy hoại ống dẫn mật từ đó gây nên các triệu chứng xơ gan như trên người. Tuy nhiên các tác dụng và khả năng tạo mô hình xơ gan trên chuột tối ưu của từng chất rất khác nhau.

Bảng so sánh kết quả của các phương pháp tạo mô hình xơ gan trên chuột

	Hepatotoxins					CBDL
	alpha-naphthyl- isothiocyanate (Anit)	allyl alcohol (AA)	carbon tetrachloride (CCL4)	3,5-diethoxycarbonyl- 1,4 dihydrocollidine (DDC)	Silica	
thời gian tạo mẫu	4 tuần	4 tuần	4 tuần	4 tuần	4 tuần	4 tuần
thời gian đánh giá	24 tuần	24 tuần	24 tuần	24 tuần	24 tuần	24 tuần
bị xơ gan	có	không	có	có	không	có
thời gian xơ gan	12 - 24 tuần		4 - 20 tuần	4 - 12 tuần		4 - 8 tuần
liều lượng	xơ gan tỉ lệ với liều lượng		phụ thuộc vào liều lượng	xơ gan tỉ lệ với liều lượng		
Sự sống còn	không ảnh hưởng nhiều		Giảm mạnh	không ảnh hưởng nhiều		Chết vào cuối tuần 16

MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT BỆNH XƠ GAN BẰNG CCL₄

- ❖ CCl₄ đã được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu các mô hình gây tổn thương cho gan.
- ❖ Sự gây tổn thương cho gan của CCl₄ gián tiếp thông qua phản ứng khử hình thành gốc ($\cdot\text{CCl}_3$) bởi cytochrome P 450:
$$\text{CCl}_4 + e^- \rightarrow \cdot\text{CCl}_3 + \text{Cl}^-$$
Sau đó được chuyển đổi thành gốc ($\cdot\text{OOCCl}_3$) (Goepfert AR và cộng sự, 1995):
$$\cdot\text{CCl}_3 + \text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OOCCl}_3$$
Gốc $\cdot\text{OOCCl}_3$ tấn công các acid béo không no \rightarrow cacbon nằm ở trung tâm các gốc lipid \rightarrow gốc peroxy lipid \rightarrow **peoroxyl hóa lipid (LPO)**.
- ❖ Ngoài ra ($\cdot\text{CCl}_3$) có thể phản ứng với nhóm sulfhydryl, như giảm glutathione (GSH) và các thiol protein, mà cuối cùng dẫn đến bất thường chức năng protein, peoroxyl hóa lipid màng, và từ đó làm tổn hại ti thể và hạt nhân dẫn đến suy giảm chức năng sinh lý của tế bào gan và cuối cùng là hoại tử tế bào gan (Recknagel RO và cộng sự, 1992).

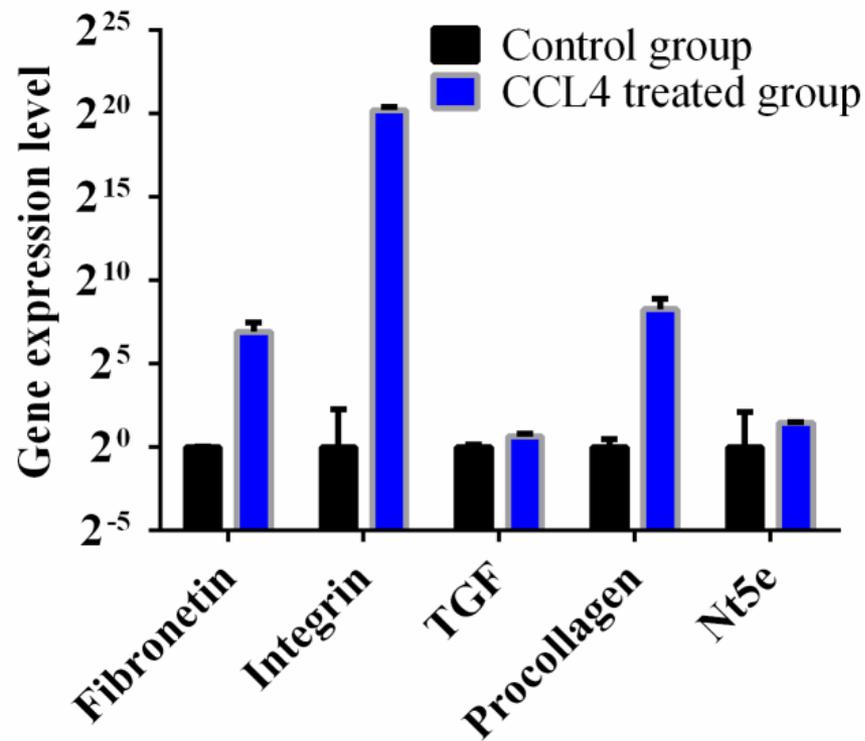


Table 2. Levels of serum markers in our mouse model of liver fibrosis after 11 weeks of treatment with 1.0 mL/kg CCl₄

	Control	Mouse model of liver fibrosis (CCL4 1.0ml/kg)
ALT (U/l)	40.639±2.018	412,181±90,640 *
AST (U/l)	47.153±1.116	242,584±126,325 *
Direct Bilirubin	0.1408±0.025	0.3283±0.053 *
Albumin	1.913±0.047	1.584±0.027 *

Results are means and SD; Student's t-test, $p < 0.05$ (*: There is significant difference with control group)

Table 1. Histological grading and staging of chronic hepatitis in experimental groups according to the Knodell-Ishak index (Ishak Modified HAI)

Group	Necroinflammatory Scores	Architectural changes, fibrosis and cirrhosis
Group II	7/18	3-5/6

Nghiên cứu gây tạo xơ gan trên chuột nhắt trắng Swiss Albino sử dụng chất độc CCl₄

Truong et al., 2014

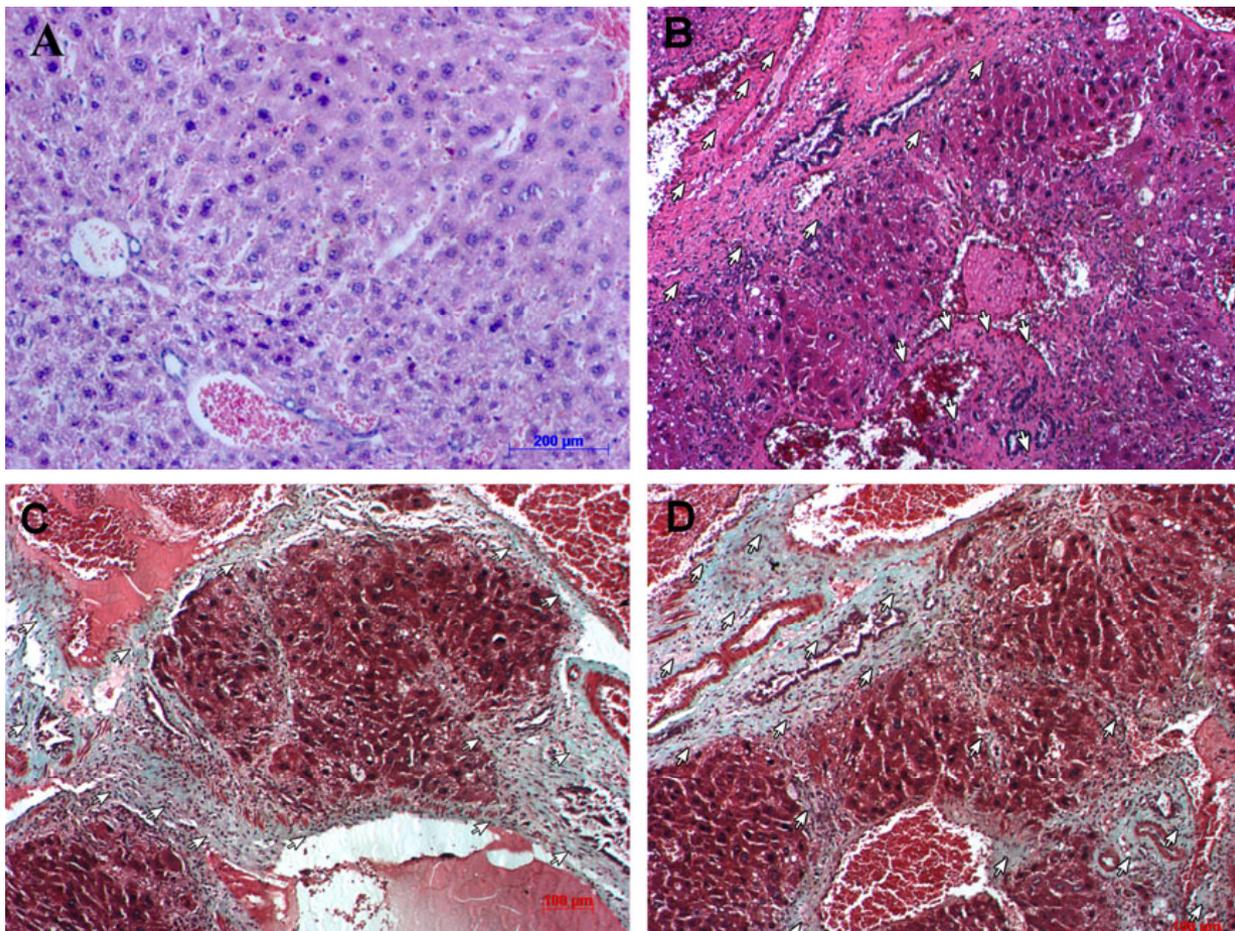


Figure 6. After administration of CCl₄ (1ml/kg dose) for 11 weeks, liver morphology changed distinctly. The entire surface of liver became rough and shrink. A. H&E staining in control group; B. H&E staining in liver fibrosis mouse model; C&D. Massive Trichrome staining in liver fibrosis mouse model. White arrows show hepatic fibrosis area.

THÀNH CÔNG