



Gây mô hình thoái hóa khớp gối trên chuột cống trắng

DEPLOYING THE MODEL OF KNEE OSTEOARTHRITIS IN WISTAR RATS

Nguyễn Thị Ngọc¹, Đặng Xuân Cảnh¹, Đào Thế Anh¹, Nguyễn Hoàng Ngân²

¹Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

²Học viện Quân y

TÓM TẮT

Mục tiêu: Gây mô hình thoái hóa khớp gối trên chuột cống trắng bằng monosodium iodoacetate (MIA) tiêm ổ khớp. **Đối tượng và phương pháp:** Chuột cống trắng 9 tuần tuổi được tiêm ổ khớp MIA 1,0mg/30μL để gây thoái hóa khớp gối. Lô chứng tiêm nước muối sinh lý. Đánh giá sự thay đổi khả năng chịu đựng trọng lượng của chân sau bằng thiết bị đo chuyên dụng (Incapacitance tester); nồng độ PGE2 và các cytokines tiền viêm TNF-α, IL-1β, và IL-6 trong huyết thanh; và mô bệnh học khớp gối. **Kết quả:** So với lô chứng, chuột ở lô tiêm MIA có tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng của chân sau chuột giảm ($p < 0,001$); nồng độ PGE2, TNF-α, IL-1β, và IL-6 huyết thanh tăng ($p < 0,001$); hình ảnh mô bệnh học khớp gối thể hiện viêm thoái hóa khớp gối rõ với biểu hiện: khớp gối có màng hoạt dịch dày, bị xâm nhiễm nhiều tế bào viêm là lympho và đại thực bào; có nơi màng hoạt dịch bị hoại tử xơ huyết; các mao mạch máu sung huyết; mô sụn bị xơ hóa và thoái hóa hyalin. **Kết luận:** Đã triển khai thành công mô hình gây thoái hóa khớp gối trên chuột cống trắng bằng cách tiêm ổ khớp MIA (monosodium iodoacetate) 1,0mg/30μL.

Từ khóa: thoái hóa khớp gối, monosodium iodoacetate, chuột cống trắng

SUMMARY

Objective: Knee osteoarthritis model was induced in rats with synovial injection monosodium iodoacetate (MIA). **Subjects and methods:** 9-week-old wistar rats were injected with 1.0mg/30μL MIA into kneejoint to cause knee osteoarthritis. The control group was injected with physiological saline. Evaluate the change in the weight bearing with a specialized measuring device (Incapacitance tester); serum PGE2 and proinflammatory cytokines TNF-α, IL-1β, and IL-6; and histopathology of the knee. **Results:** Compared with the control group, rats in the MIA injection group had a reduction in the weight bearing ($p < 0.001$); serum concentrations of PGE2, TNF-α, IL-1β, and serum IL-6 were increased ($p < 0.001$); knee-joint histopathology showed clear osteoarthritis with manifestations: the knee joint has thick synovial membrane, infected with many inflammatory cells including lymphocytes and macrophages; in some places the synovial membrane has fibrotic necrosis; congestive blood capillaries; cartilage tissue is degenerative and hyalinic. **Conclusion:** The model of knee osteoarthritis has been successfully deployed in wistar rats by injecting MIA (monosodium iodoacetate) 1.0mg / 30μL.

Keywords: Knee osteoarthritis, monosodium iodoacetate, rats.

Ngày tiếp nhận: 30/8/2020

Ngày phản biện: 10/9/2020

Ngày chấp nhận đăng: 24/9/2021



1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thoái hóa khớp là hậu quả của quá trình cơ học và sinh học làm mất cân bằng giữa tổng hợp và huỷ hoại của sụn và xương dưới sụn kết hợp nhiều nguyên nhân và quá trình viêm gây nên. Bệnh rất thường gặp và là một trong những nguyên nhân chính gây giảm, mất khả năng vận động ở người cao tuổi [1]. Ở Việt Nam chưa có thống kê chính xác nhưng thoái hóa khớp chiếm tỷ lệ cao trong các bệnh lý cơ xương khớp, đặc biệt là thoái hóa khớp gối. Việc điều trị bệnh hiện nay là gánh nặng rất tốn kém cho cá nhân người bệnh nói riêng và toàn xã hội nói chung với chi phí điều trị cao, hiệu quả chưa đạt được như mong muốn trong khi có nhiều tai biến nặng nề, và tốn kém. Trong Đông y, thoái hóa khớp gối thuộc phạm vi chứng Hạc tất phong với nguyên nhân gây bệnh chủ yếu là do tà khí phong hàn, thấp nhiệt gây ra, cho nên còn gọi là bệnh phong tê thấp. Để điều trị bệnh có rất nhiều bài thuốc, vị thuốc YHCT thể hiện được thể mạnh của mình.

Các nghiên cứu thực nghiệm giúp đánh giá nhanh chóng hiệu quả điều trị của các thuốc YHCT, trong đó việc triển khai thành công mô hình gây bệnh trên động vật giữ vai trò quan trọng. Mô hình gây thoái hóa khớp trên động vật thực nghiệm đã được một số tác giả xây dựng đánh giá cũng như sử dụng trong nghiên cứu tác dụng của thuốc, và được công bố trên các tạp chí quốc tế có uy tín [3], [4]. Tại Việt Nam đây là một mô hình mới, cần được triển khai đánh giá trước khi áp dụng vào nghiên cứu đánh giá tác dụng của thuốc. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu: *Gây mô hình thoái hóa khớp gối trên chuột cống trắng bằng monosodium iodoacetate (MIA)*.

2. CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Động vật nghiên cứu

Chuột cống trắng trưởng thành, dòng Wistar, 9 tuần tuổi, cân nặng 200 ± 10 g, số lượng 20 con,

không phân biệt giống, do Ban chăn nuôi động vật thí nghiệm, Học viện Quân y cung cấp, nuôi dưỡng trong điều kiện chuẩn về thời gian sáng tối, nhiệt độ, thức ăn, nước sạch. Chuột được nuôi 7 ngày trước khi nghiên cứu.

2.2. Các trang thiết bị, hóa chất phục vụ cho nghiên cứu.

- Kim đầu tù cho chuột uống, cốc chia vạch, bơm kim tiêm 1ml.
- Máy xét nghiệm ELISA.
- Cân điện tử của Nhật, độ chính xác 0,001 gam.
- Bộ dụng cụ mổ động vật cỡ nhỏ.
- Hoá chất: Monosodium iodoacetate (MIA) (cat. #I2512; Sigma, St. Louis, MO, USA). Các kit ELISA xét nghiệm chất trung gian gây viêm PGE2 và các cytokines tiền viêm TNF- α , IL-1 β , và IL-6 trong huyết thanh.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

* **Tiến hành nghiên cứu** theo phương pháp của Ikufumi Takahashi và cs (2018) [3]. Chuột được chia ngẫu nhiên thành 02 lô, mỗi lô 10 con.

+ Lô chứng: không gây thoái hóa khớp gối, tiêm ổ khớp nước muối sinh lý 30 μ L.

+ Lô mô hình: gây thoái hóa khớp gối, tiêm ổ khớp monosodium iodoacetate 1,0mg/30 μ L

* **Quá trình gây thoái hóa khớp gối trên chuột cống như sau:**

- Monosodium iodoacetate (MIA) 1,0mg được hòa tan trong 30 μ L nước muối vô trùng.

- Gây mê chuột bằng isoflurane (gây mê đường hô hấp).

- Đầu gối ở chân sau bên phải của chuột được làm sạch lông và sát trùng.

- Chuột được đặt nằm ngửa, cẳng chân đặt tạo góc 90 $^{\circ}$ ở khớp gối.



- Sờ nắn phía dưới xương bánh chè để xác định dây chằng xương bánh chè. Dùng kim 29 gauge, 0,5 inch để tiêm MIA (1,0mg/30μL) vào khớp gối bên

phải tại vị trí ở mặt trong dây chằng xương bánh chè. Cần thận trọng để đảm bảo rằng kim không tiến quá xa vào các dây chằng chéo.



Ảnh 1. Hình ảnh giải phẫu khớp gối và vị trí tiêm thuốc gây thoái hóa khớp gối

*** Các chỉ tiêu đánh giá:**

- Đánh giá sự thay đổi khả năng chịu đựng trọng lượng của chân sau bằng thiết bị đo chuyên dụng (Incapacitance tester), theo phương pháp được mô tả bởi S. E. Bove M.S. và sc (2003) [2]. Tính tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng} = \frac{\text{Trọng lượng trên chân sau bên phải}}{\text{Trọng lượng trên chân sau bên phải} + \text{trái}} \times 100$$

- Lấy máu, ly tâm 2000 vòng trong 15 phút ở 4°C, tách lấy huyết thanh để xét nghiệm chất trung gian gây viêm PGE₂ và các cytokines tiền viêm TNF-α, IL-1β, và IL-6.

- Xét nghiệm mô bệnh học khớp gối: Sau 8 tuần, chuột được giết và khớp gối chân sau bên phải được cắt ra, cố định trong Formalin 10%, làm tiêu bản nhuộm HE đánh giá mô bệnh học khớp gối.

2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý theo các phương pháp thống kê y sinh học, áp dụng các phương pháp phân

tích mô tả: tính tỷ lệ phần trăm, giá trị trung bình, độ lệch chuẩn. So sánh giá trị trung bình bằng T-student test sử dụng phần mềm Microsoft Excel. Số liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả đánh giá sự thay đổi khả năng chịu đựng trọng lượng của chân sau bằng thiết bị đo chuyên dụng.

Kết quả được trình bày ở bảng 1.



Bảng 1. Tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng của chân sau chuột (n = 10, Mean ± SD)

Lô nghiên cứu		Tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng (%)					P _a
		Sau 1 tuần (a)	Sau 3 tuần (b)	Sau 5 tuần (c)	Sau 7 tuần (d)	Sau 8 tuần (e)	
Lô chứng	(1)	50,81 ± 2,80	50,39 ± 2,99	51,62 ± 2,84	50,52 ± 4,55	51,06 ± 2,75	> 0,05
Lô mô hình	(2)	29,34 ± 4,40	31,26 ± 2,76	32,12 ± 3,96	36,08 ± 3,84	37,97 ± 3,63	P _{b,c-a} > 0,05 P _{d,e-a} < 0,01
P ₂₋₁		< 0,001	< 0,001		P ₂₋₁ < 0,001 P _{3,4,5-1} < 0,01		-

Nhận xét:

**So với lô chứng, tại tất cả các thời điểm đo:* tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng đo được ở lô mô hình giảm có ý nghĩa thống kê với p < 0,001. Đáp ứng với đau của chuột được đánh giá thông qua tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng ở 2 chân sau của chuột. Bình thường chuột đứng cân bằng, phân phối chịu đựng trọng lượng của chuột dao động quanh 50%. Khi chuột bị đau chân phải (ở đây là khớp gối phải), phân phối chịu đựng trọng lượng dồn sang bên trái (bên không đau), giảm đi ở bên phải (bên đau), phân phối chịu đựng trọng lượng của chuột giảm. Như vậy, MIA tiêm vào khớp gối phải của chuột gây viêm, thoái hóa từ đó gây đau khớp gối phải.

** So sánh trong cùng một lô giữa các thời điểm đo:* Ở lô chứng, tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng tại các thời điểm đo không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p > 0,05), với giá trị dao động quanh 50%. Ở lô mô hình, các thời điểm b, c (3, 5 tuần sau tiêm MIA) có tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng tăng hơn nhưng không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05) so với thời điểm 1 tuần sau tiêm MIA. Các thời điểm d, e (7, 8 tuần sau tiêm MIA) tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng tăng hơn có ý nghĩa thống kê (p < 0,01) so với thời điểm 1 tuần sau tiêm MIA. Sau khi tiêm MIA, tình trạng viêm tại ổ khớp tiến triển mạnh (tiến triển viêm cấp tính), tuy nhiên sau đó tiến triển viêm giảm dần ở tuần thứ 7, 8 sau tiêm, còn lại chủ yếu là tổn thương thoái hóa khớp (tiến

triển viêm mạn tính). Ở giai đoạn tiến triển viêm mạn tính (tuần thứ 7, 8 sau tiêm), chuột vẫn đau khớp nhiều (tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng giảm so với lô chứng với p < 0,001), tuy nhiên có giảm hơn (p < 0,01) so với khi đang tiến triển viêm cấp tính (1 tuần sau tiêm MIA).

3.2. Kết quả xét nghiệm PGE2, TNF-α, IL-1β, và IL-6 của chuột nghiên cứu.

Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Nồng độ PGE2, TNF-α, IL-1β, và IL-6 trong huyết thanh chuột (n = 10)

Lô nghiên cứu Chỉ số đánh giá		Lô chứng (1)	Lô mô hình (2)	P ₂₋₁
PGE2 (pg/mL)	Mean ± SD	50,25 ± 7,70	364,22 ± 104,68	< 0,001
	% tăng so với (1)	-	Tăng 624,82 %	
TNF-α (pg/mL)	Mean ± SD	20,66 ± 1,92	61,09 ± 5,84	< 0,001
	% tăng so với (1)	-	Tăng 195,69 %	
IL-1β (pg/mL)	Mean ± SD	20,36 ± 3,05	84,63 ± 10,89	< 0,001
	% tăng so với (1)	-	Tăng 315,65 %	
IL-6 (pg/mL)	Mean ± SD	24,86 ± 2,42	62,54 ± 5,97	< 0,001
	% tăng so với (1)	-	Tăng 151,58 %	



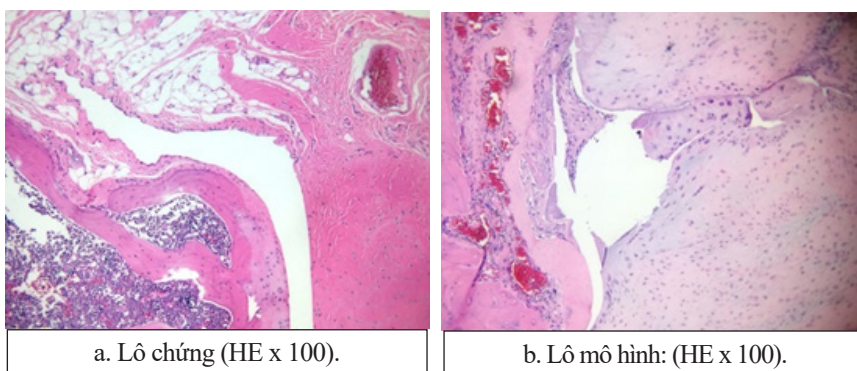
Nhận xét:

- So với lô chứng tiêm nước muối sinh lý, lô mô hình tiêm MIA vào khớp gối chuột có nồng độ trong huyết thanh của PGE2, TNF- α , IL-1 β , và IL-6 đều tăng

cao có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$). MIA khi tiêm vào khớp gối chuột gây viêm mạnh, làm tăng nồng độ chất trung gian gây viêm PGE2 và các cytokines tiền viêm TNF- α , IL-1 β , và IL-6 trong huyết thanh.

2.3. Kết quả xét nghiệm mô bệnh học khớp gối

Hình ảnh mô bệnh học nhuộm HE của khớp gối được trình bày ở ảnh 1.



Ảnh 1. Hình ảnh mô bệnh học khớp gối ở các lô chuột nghiên cứu

Nhận xét:

- Hình ảnh mô bệnh học khớp gối của chuột ở lô chứng cho thấy: Khớp gối với màng hoạt dịch mỏng được lót bởi biểu mô dẹt, không bị xâm nhiễm tế bào viêm. Không có dấu hiệu hoại tử cơ huyết mạch hoạt dịch, không có dấu hiệu sung huyết mạch máu. Sụn khớp không bị tổn thương thoái hóa. Hình ảnh mô bệnh học khớp gối bình thường.

- Hình ảnh mô bệnh học khớp gối của chuột ở lô mô hình cho thấy: Khớp gối với màng hoạt dịch dày, bị xâm nhiễm nhiều tế bào viêm là lympho và đại thực bào. Có nơi màng hoạt dịch bị hoại tử cơ huyết. Các mao mạch máu sung huyết. Mô sụn bị xơ hóa và thoái hóa hyalin. Đây là những biểu hiện rõ rệt của hình ảnh viêm thoái hóa khớp gối. Việc tiêm MIA vào khớp gối đã gây viêm, tổn thương phá hủy sụn khớp, gây nên tình trạng thoái hóa khớp rõ rệt tại thời điểm đánh giá là sau tiêm thuốc 8 tuần.

5. KẾT LUẬN

Đã thành công trong việc triển khai gây mô hình thoái hóa khớp trên chuột cống trắng bằng cách tiêm ổ khớp monosodium iodoacetate (MIA) 1,0mg/30 μ L. So với lô chứng tiêm nước muối sinh lý, các chuột ở lô mô hình (tiêm MIA) có biểu hiện viêm làm tăng nồng độ chất trung gian gây viêm PGE2 và các cytokines tiền viêm TNF- α , IL-1 β , và IL-6 trong huyết thanh; đầu khớp làm giảm phân phối chịu đựng trọng lượng; và tổn thương viêm, thoái hóa khớp gối thông qua hình ảnh màng hoạt dịch dày, bị xâm nhiễm nhiều tế bào viêm là lympho và đại thực bào, có nơi màng hoạt dịch bị hoại tử cơ huyết, các mao mạch máu sung huyết, mô sụn bị xơ hóa và thoái hóa hyalin.



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Østergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. (2006). *Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging*. Osteoarthritis Cartilage. 2006; 14: 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.014> PMID: 16242352.
2. S. E. Bove M.S., S. L. Calcaterra M.S., R. M. Brooker B.S., C. M. Huber B.S., R. E. Guzman D.V.M., Ph.D., P. L. Juneau M.S., D. J. Schrier Ph.D. and K. S. Kilgore Ph.D (2003). *Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis*. OsteoArthritis and Cartilage (2003)11,821–830. doi:10.1016/S1063-4584(03)00163-8.
3. Takahashi I, Matsuzaki T, Kuroki H, Hosono M (2018). *Induction of osteoarthritis by injecting monosodium iodoacetate into the patellofemoral joint of an experimental rat model*. PLoS ONE 13 (4): e0196625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196625>
4. Udo M, Muneta T, Tsuji K, Ozeki N, Nakagawa Y, Ohara T, et al (2016). *Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a dose- and time-dependent manner: proposed model-specific scoring systems*. Osteoarthritis Cartilage. 2016; 24: 1284–1291. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.02.005> PMID: 26915639.