

ĐÁNH GIÁ MÔ HÌNH GÂY SUY THẬN MẠN TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG BẰNG ADENINE

**Trần Thị Tuyết Nhung¹, Phạm Xuân Phong¹,
Ngô Thị Tuyết Mai², Vũ Bình Dương²**

¹Viện Y học cổ truyền Quân đội

²Học viện Quân y

Tóm tắt

Mục tiêu: Nghiên cứu này nhằm đánh giá mô hình suy thận mạn bằng Adenine trên chuột nhắt trắng. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 22 chuột nhắt trắng được chia thành 2 nhóm, nhóm chứng (n=10): chuột ăn uống bình thường, nhóm gây suy thận mạn (n=12): sử dụng Adenine liều 100mg/kg trọng lượng cơ thể (TLCT)/ ngày, uống 2 ngày/ lần trong 5 tuần. **Kết quả:** Ở nhóm gây suy thận mạn, nồng độ urê, creatinin máu tăng, số lượng hồng cầu, hemoglobin máu giảm có ý nghĩa so với nhóm đối chứng sinh lý; hình ảnh giải phẫu bệnh cho thấy tổn thương tại cầu thận và tăng sinh kẽ thận. Tỷ lệ chuột sống 100%. **Kết luận:** Mô hình gây suy thận trên chuột nhắt trắng sử dụng Adenine dùng 100 mg/kg TLCT/ ngày, uống 2 ngày/ lần trong 5 tuần cho các triệu chứng suy thận mạn điển hình và tỷ lệ chuột sống đạt 100%.

Từ khóa: mô hình động vật, suy thận mạn, adenine.

EVALUATING THE MODEL OF ADENINE - INDUCED CHRONIC KIDNEY FAILURE IN WHITE MICE

Abstract

Objectives: This research aimed to evaluate the model of adenine - induced chronic kidney failure in white mice. **Objects and research methods:** 22 white mice were divided into 2 groups; The control group consisted of 10 healthy mice orally administered with distilled water. The experimental group was composed of 12 adenine - induced chronic kidney failure mice at a dosage of 100mg/kg/day, every 2 days for 5 weeks. **Results:** There is a statistically significant result in the experimental group, in which urea and creatinine concentrations were higher accompanied by the number red blood cells and the amount of hemoglobin, which were lower than that of the control group; Histopathology images showed the lesions in the glomerular and the interstitial proliferation. Overall survival rate of mice was 100%. **Conclusions:** the model of adenine - induced chronic kidney failure in white mice with adenine dose of 100mg/kg/day, every 2 days for 5 weeks showed typical symptoms and the proportion of mice still alive was 100%.

Keyword: animal model, chronic kidney failure, adenine.

* Ngày nhận bài: 16/5/2023

* Ngày phản biện: 25/5/2023

* Ngày phê duyệt đăng bài: 16/6/2023

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Suy thận mạn là bệnh lý diễn biến mạn tính, tiến triển tăng dần theo thời gian, có số lượng bệnh nhân gia tăng nhanh chóng và trở thành gánh nặng y tế cho nhiều quốc gia trên thế giới. Nhiều vị thuốc, bài thuốc y học cổ truyền được ứng dụng trong điều trị suy thận mạn. Do vậy, xây dựng mô hình suy thận mạn trên động vật thực nghiệm giúp đánh giá tác dụng tiền lâm sàng của các vị thuốc, bài thuốc y học cổ truyền nhằm nâng cao hiệu quả điều trị kéo dài thời gian tiến tới bệnh thận mạn giai đoạn cuối và nâng cao chất lượng sống cho bệnh nhân. Trên thế giới có nhiều phương pháp gây mô hình suy thận mạn, trong đó chia thành hai loại chính là phương pháp phẫu thuật và không phẫu thuật [1]. Phương pháp gây suy thận mạn phẫu thuật ít được lựa chọn vì phương pháp này gây tổn thương chuột ngay tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu, có tỷ lệ biến chứng trên chuột cao; quá trình phục hồi sau gây tổn thương phức tạp. Trong khi phương pháp gây mô hình suy thận mạn không phẫu thuật bằng Adenine thực hiện đơn giản, thời gian gây mô hình ngắn, gây được mô hình suy thận mạn điển hình [2]. Tuy nhiên, liều lượng, đường dùng, thời gian sử dụng Adenine như thế nào để đảm bảo xây dựng được mô hình suy thận mạn điển hình đồng thời đảm bảo chuột sống với tỷ lệ cao để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo là

mục tiêu đánh giá của nghiên cứu này.

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

2.1. Chất liệu và đối tượng nghiên cứu

Chất liệu: Adenine được cung cấp bởi công ty Sigma (Hoa Kỳ).

Đối tượng: 22 chuột nhắt trắng, chủng Swiss, cả hai giới, khỏe mạnh, trọng lượng $20 \pm 2g$. Động vật được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm với đầy đủ thức ăn và nước uống tại Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự - Học viện Quân y từ trước khi nghiên cứu 5 ngày và trong suốt thời gian nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuột nhắt trắng gồm 22 con, được chia thành 2 nhóm:

- Nhóm đối chứng sinh lý (n=10): chuột ăn uống bình thường, không uống Adenine.

- Nhóm gây suy thận mạn (n=12): dùng Adenine 100mg/kg TLCT/ngày, uống 2 ngày/ lần trong 5 tuần.

Phương pháp gây mô hình suy thận mạn: sử dụng kim tiêm đầu tù loại 1ml để lấy hỗn dịch Adenine hàm lượng 10mg/ml dầu ăn, đưa thẳng vào dạ dày chuột 0,1ml/10g/trọng lượng cơ thể (TLCT)/cách ngày, tương ứng liều 100mg/kg TLCT/cách ngày trong 5 tuần.

Chỉ tiêu theo dõi: Tình trạng toàn thân được theo dõi hàng ngày, trọng lượng chuột được theo

đôi hàng tuần. Sau 5 tuần nghiên cứu, tiến hành xét nghiệm huyết học bằng máy phân tích huyết học tự động Swelab Alfa (Thụy Điển), xét nghiệm urê, creatinin huyết thanh bằng máy BTS 350 (Biosystems, Tây Ban Nha), xét nghiệm mô bệnh học thận.

III. KẾT QUẢ

3.1. Tỷ lệ sống/chết, tình trạng

chung của các nhóm chuột

- Sau 5 tuần nghiên cứu, tỷ lệ chuột sống đạt 100%.

- Ở nhóm chuột gây suy thận mạn bằng Adenine liều 100 mg/kg TLCT/uống cách ngày, chuột vẫn ăn uống được nhưng kém dần, vận động chậm chạp, lông xù dần, hậu môn khô.

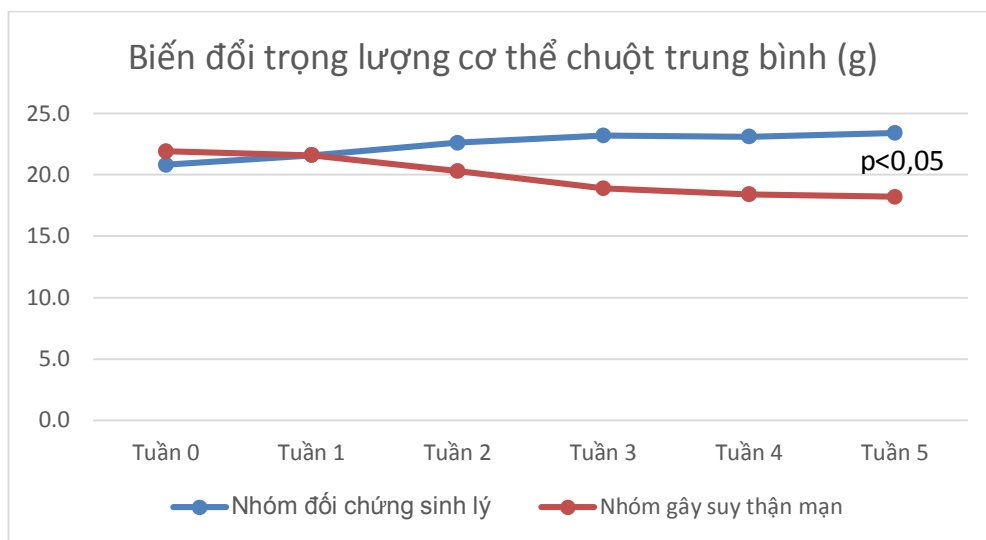


(a)



(b)

Hình 1. Hình ảnh chuột gây suy thận mạn theo mô hình Adenine
a. Chuột nhóm đối chứng sinh lý; b. Chuột gây suy thận mạn.



Biểu đồ 1. Biến đổi trọng lượng cơ thể chuột trung bình

Nhận xét: Theo biểu đồ 1, ở nhóm đối chứng sinh lý trọng lượng cơ thể chuột tăng dần, trong

khi ở nhóm gây suy thận mạn chuột giảm dần. Đến thời điểm kết thúc nghiên cứu, trọng lượng cơ

thể giữa hai nhóm khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

hóa và huyết học ở các nhóm chuột nghiên cứu

3.2. Kết quả một số chỉ tiêu sinh

Bảng 1. Nồng độ urê, creatinin huyết thanh tại thời điểm kết thúc thí nghiệm

Chỉ số xét nghiệm Nhóm	Urê (mmol/l, $\bar{X} \pm SD$)	Creatinin ($\mu\text{mol/l, } \bar{X} \pm SD$)
Đối chứng sinh lý (n=10)	6,1 ± 0,9	51,6 ± 4,9
Gây suy thận mạn (n=12)	12,8 ± 1,9	118,9 ± 15,6
p	< 0,05	< 0,05

Nhận xét: Kết thúc thí nghiệm, nồng độ urê, creatinin ở nhóm gây suy thận mạn cao hơn có

ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng sinh lý ($p < 0,05$).

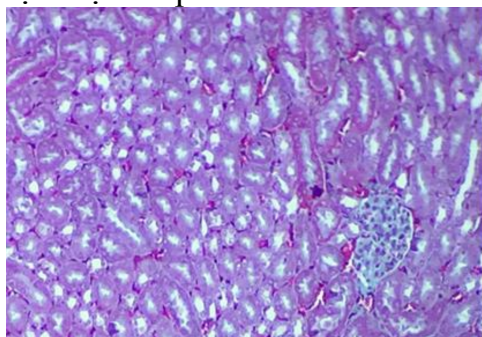
Bảng 2. Một số chỉ tiêu huyết học tại thời điểm kết thúc thí nghiệm

Chỉ số xét nghiệm Nhóm	Hồng cầu (T/l, $\bar{X} \pm SD$)	Hemoglobin (g/l, $\bar{X} \pm SD$)
Đối chứng sinh lý (n=10)	8,0 ± 0,7	124,8 ± 10,0
Gây suy thận mạn (n=12)	6,2 ± 0,8	101,3 ± 9,1
p	<0,05	<0,05

Nhận xét: Sau 5 tuần uống Adenine, chỉ số hồng cầu, hemoglobin ở nhóm chuột gây suy thận mạn thấp hơn so với nhóm đối

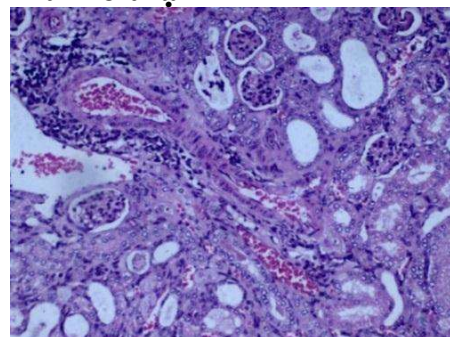
chứng sinh lý có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.3. Hình ảnh giải phẫu bệnh lý nhu mô thận



Hình 2. Nhóm đối chứng sinh lý (HEx400)

Hình ảnh các ống thận có cấu trúc bình thường, lòng ống hẹp, không có hình ảnh tổn thương, viêm. Sợi của tổ chức liên kết ở cầu thận và rải rác trong khe thận.



Hình 3. Nhóm gây suy thận mạn (HEx400)

Hình ảnh tổn thương ở ống thận và kẽ thận: Các mao mạch trong tiểu cầu thận và quanh các ống thận bị xung huyết. Mô kẽ có các ổ viêm quanh động mạch, tăng sinh xơ.

IV. BÀN LUẬN

Xây dựng mô hình suy thận mạn trên động vật thực nghiệm được nhiều tác giả nghiên cứu, thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả điều trị của thuốc. Mô hình được nghiên cứu chủ yếu trên hai loại động vật gặm nhấm là chuột cống và chuột nhắt trắng. Trước đây, các nghiên cứu chủ yếu sử dụng trên chuột cống trắng [2]. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Badreldin H.A. và cộng sự nhận thấy chuột nhắt là nhạy cảm với Adenine hơn so với chuột cống trắng, mô hình chuột nhắt trắng cho thấy sự thay đổi rõ dựa trên các chỉ số xét nghiệm hoá sinh, huyết học. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn đối tượng nghiên cứu là chuột nhắt trắng.

Mô hình gây suy thận mạn bằng Adenine lần đầu tiên được nghiên cứu bởi tác giả Yokozawa và gây được tổn thương suy thận mạn tương tự như do thiếu máu thận ở người [3]. Mô hình thường được sử dụng vì nhiều ưu điểm như dễ thực hiện, kết quả đánh giá rõ ràng, quan sát được nhiều biến đổi về mặt chức năng, hình thái giải phẫu bệnh. Cơ chế suy thận mạn của Adenine do sau khi đưa vào cơ thể, Adenine được chuyển hóa thành 2,8-dihydroxyadenine (DHA). Độ hòa tan thấp của DHA làm kết tủa tinh thể vào nhu mô thận. Sự kết tủa của các tinh thể

này lên vi nhung mao và vùng biểu mô đỉnh của ống lượn gần chỉ trong 2 ngày sau khi uống Adenine. Adenine gây suy thận mạn do làm tổn thương tại ống kẽ thận, thông qua các phản ứng viêm, hoạt hóa quá trình miễn dịch, tăng sinh tổ chức xơ [2], [4].

Mức liều Adenine sử dụng để gây suy thận mạn tùy thuộc vào từng nghiên cứu, vào các thông số cần đánh giá và tùy theo đặc điểm từng thí nghiệm. Tác giả Santana A.C. và cộng sự (2013) đã đánh giá hiệu quả chống viêm của thalidomid trên mô hình chuột nhắt suy thận mạn trong thời gian 6 tuần. Adenine được trộn với thức ăn chuẩn hoá (khối lượng Adenine chiếm 0,2% trong tổng khối lượng thức ăn) và cho chuột ăn uống tự do theo nhu cầu. Mức liều Adenine sử dụng được tính toán dựa vào tổng lượng thức ăn tiêu thụ hàng ngày của chuột, tương ứng khoảng 250-400 mg/kg/ngày [5]. Tương tự, Badreldin H. A. và cộng sự (2013) đã nghiên cứu đánh giá mô hình gây suy thận mạn trên cả chuột nhắt và chuột cống để so sánh giữa hai mô hình, đồng thời đánh giá tác dụng điều trị suy thận mạn của gôm acacia. Adenine cũng được trộn cùng với thức ăn chuẩn hoá. Chuột được ăn và uống nước tự do theo nhu cầu. Tỷ lệ Adenine tối ưu trong thức ăn là

0,2% sử dụng trong 4 tuần. Trong nghiên cứu này tác giả nhận thấy với mô hình suy thận gây ra bởi Adenine thì chuột nhất đáp ứng tốt hơn so với chuột cống [6].

Với hai nghiên cứu kể trên, liều Adenine khoảng từ 250-400 mg/kg/ngày. Mức liều Adenine sử dụng cao hơn nhiều so với nghiên cứu của chúng tôi (mức liều 100 mg/kg/ngày, sử dụng cách ngày). Nguyên nhân khác biệt do khi sử dụng Adenine trộn cùng với thức ăn, Adenine sẽ bị hao do mất đi cùng thức ăn dư thừa. Bên cạnh đó, vì chuột ăn uống tự do theo nhu cầu nên lượng Adenine ăn vào của mỗi con chuột khác nhau, đáp ứng tổn thương suy thận mạn sẽ khác nhau. Đây cũng là một điểm hạn chế của các nghiên cứu nêu trên.

Năm 2018, Rahman A. và cộng sự đã đánh giá và tối ưu mô hình gây suy thận mạn cho chuột nhất sử dụng Adenine. Các tác giả lựa chọn được liều tối ưu là 50 mg/kg/ngày, sử dụng theo đường uống và được phân tán trong dung dịch carboxymethyl cellulose 0,5% để đảm bảo đồng nhất. Ngoài ra, để đánh giá mức độ thiếu máu ở mô hình chuột nhất gây suy thận mạn bằng Adenine, tác giả có sử dụng lô chứng dương là nhóm chuột gây suy thận mạn sau 28 ngày và được tiêm dưới da erythropoietin người tái tổ hợp [7].

Nhìn chung nghiên cứu này so với nghiên cứu của chúng tôi có nhiều nét tương đồng: gây tổn thương mạn thận trước, sau đó mới sử dụng thuốc để điều trị. Đây cũng chính là nguyên tắc chung của các mô hình được nhiều nghiên cứu thừa nhận. Tuy nhiên, nghiên cứu của Rahman A. và cộng sự sử dụng mức liều thấp hơn (50 mg/kg/ngày) và tần suất uống nhiều hơn (uống hàng ngày), thời gian phơi nhiễm ngắn hơn (trong 28 ngày) so với nghiên cứu của chúng tôi.

Nhằm mục đích để chắc chắn gây tổn thương thận mạn, chúng tôi sử dụng với mức liều cao hơn (100mg/ kg/ ngày) và uống cách ngày. Để sử dụng liều xác định, đồng đều giữa các chuột chúng tôi lựa chọn cách đưa Adenine trực tiếp vào dạ dày chuột qua kim đầu tù. Qua quan sát thực nghiệm của chúng tôi nhận thấy khi sử dụng với liều 100 mg/ kg/ ngày trước hết tạo ra đợt viêm cấp, sau đó, khi sử dụng cách ngày thì các đợt viêm cấp tiến triển thành viêm mạn. Như vậy, về tổng liều sử dụng thì nghiên cứu của chúng tôi là tương đương với nghiên cứu của Rahman A. và cộng sự nhưng sử dụng liều cao và uống cách ngày để đảm bảo tạo ra viêm thận mạn. Ngoài ra, thời gian cho chuột uống Adenine trong nghiên cứu này (35 ngày) là dài hơn so với của

các tác giả trên (28 ngày) là để đảm bảo cho việc chắc chắn tạo ra suy thận mạn trên mô hình động vật thực nghiệm để đảm bảo sự chính xác và lặp lại của thí nghiệm trong các đánh giá về tác dụng của thuốc trong giai đoạn tiếp theo. Sự khác nhau này còn có thể do đích đến tiêu chí đánh giá của hai nghiên cứu là khác nhau. Nghiên cứu của Rahman A. và cộng sự mục đích là để đánh giá mức độ thiếu máu ở chuột suy thận mạn, chỉ đánh giá một chỉ số chức năng liên quan đến quá trình tạo máu: hematocrit, erythropoietin và hemoglobin [7]. Trong khi đó, nghiên cứu của chúng tôi muốn đánh giá sâu hơn và toàn diện nên quan tâm nhiều chỉ số chức năng thận hơn như ure, creatinin, các chỉ số công thức máu và xét nghiệm mô bệnh học thận.

Hiện tại, ở Việt Nam, có một vài nghiên cứu về mô hình suy thận mạn trên chuột nhắt trắng do Adenine. Trong đó mức liều sử dụng và thời gian sử dụng có sự giao động. Tác giả Phạm Xuân Phong và cộng sự sử dụng Adenine với mức liều 120mg/kg/uống cách ngày trong 4 tuần sẽ gây được mô hình tổn thương thận mạn điển hình và kết quả xét nghiệm với ure, creatinin máu tăng. Tuy nhiên với mức liều trên, tỷ lệ chuột còn sống thấp (28,6%) [8].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, ở nhóm chuột gây suy thận mạn, trọng lượng cơ thể giảm dần, đến thời điểm kết thúc nghiên cứu, trọng lượng cơ thể nhóm chuột thấp hơn của nhóm đối chứng sinh lý với $p < 0,05$ (Biểu đồ 1). Kết quả nghiên cứu của tác giả Badreldin và cộng sự cũng cho thấy sự giảm trọng lượng chuột nghiên cứu khi chuột dùng Adenine [9]. Nhóm chuột gây suy thận mạn thể trạng yếu, vận động chậm chạp, lông xù và bết. Nguyên nhân là do Adenine sau khi vào cơ thể, chuyển hóa thành chất DHA lắng đọng tại ống kẽ thận, gây tổn thương viêm, hoạt hóa miễn dịch, tăng sinh tế bào xơ, chức năng thận giảm dần dẫn tới chuột ăn kém, sút cân, vận động ít hơn, lông xù và bết.

Bằng cách đưa thẳng Adenine qua kim đầu tù vào dạ dày chuột với liều 100mg/kg TLCT/cách ngày trong thời gian 5 tuần, nồng độ ure, creatinin máu ($12,8 \pm 1,9$ mmol/l và $118,9 \pm 15,6$ μ mol/l) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($6,1 \pm 0,9$ mmol/l và $51,6 \pm 4,9$ μ mol/l) với $p < 0,05$. Chỉ số hồng cầu và Hemoglobin ($6,2 \pm 0,8$ T/l và $101,3 \pm 9,1$ g/l) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng sinh lý ($8,0 \pm 0,7$ T/l và $124,8 \pm 10,0$ g/l) với $p < 0,05$. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả

của một số nghiên cứu khác trên thế giới. Tác giả Chia-Hung Yen và cộng sự nghiên cứu trộn Adenine trong thức ăn. Sau 24 tuần, urê và creatinin đều tăng cao trong máu ($p < 0,05$) [10]. Badreldin và cộng sự tạo mô hình suy thận bằng Adenine với mức tăng urê lên tới 40 mmol/l và creatinin tăng tới trên 100 $\mu\text{mol/l}$ [9]. Suleimani cũng gây tổn thương thận mạn bằng Adenine, tác giả thấy nồng độ creatinin huyết tương tăng cao gần gấp đôi so với nhóm chứng, nồng độ urê tăng gần gấp 4 lần sau thời gian ăn thức ăn chứa Adenine 0,25% trong 5 tuần; độ thanh thải creatinin trên chuột cống uống Adenine đạt 0,03 ml/phút so với 0,06 ml/phút ở nhóm chuột khỏe mạnh [6]. Hiện tại, không có quy chuẩn về nồng độ urê và creatinin huyết thanh ở mô hình suy thận mạn mà chỉ so sánh với nhóm chứng khỏe mạnh và các nhóm mô hình suy thận được điều trị [6], [9], [10].

Hình ảnh mô bệnh học thận chuột uống Adenine liều 100mg/kg TLCT/cách ngày cho thấy có tổn thương ở ống thận và kẽ thận. Các mao mạch trong tiểu cầu thận và quanh các ống thận bị xung huyết. Mô kẽ có các ổ viêm quanh động mạch, tăng sinh tế bào sợi, xuất hiện một số ống thận bị teo nhỏ. Nghiên cứu của tác giả Al Suleimani

và cộng sự cũng cho thấy hình ảnh viêm thận kẽ mạn tính đặc trưng bởi sự xâm nhập sâu rộng của tế bào lympho và đại thực bào, giãn ống thận và bong các tế bào biểu mô ống thận.

V. KẾT LUẬN

Như vậy, sử dụng Adenine với liều 100mg/kg TLCT/sử dụng cách ngày đưa thẳng vào dạ dày chuột bằng kim đầu tù trong 5 tuần cho kết quả mô hình suy thận mạn liều tối ưu với các triệu chứng điển hình và vẫn duy trì được tình trạng sức khỏe chuột để có thể tiếp tục các nghiên cứu để đánh giá tác dụng điều trị của thuốc trên tiền lâm sàng. Kết quả thực nghiệm sau 5 tuần, tỷ lệ chuột sống đạt 100%, nồng độ urê và creatinin tăng, số lượng hồng cầu, hemoglobin máu giảm ở nhóm gây suy thận mạn khác biệt với nhóm đối chứng sinh lý có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1. Kujal P, Vernerová Z (2008).** "5/6 nephrectomy as an experimental model of chronic renal failure and adaptation to reduced nephron number". *Ceskoslovenska fysiologie*, 57(4), 104-9.
- 2. Diwan V, Brown L, Gobe GC (2018).** "Adenine-induced chronic kidney disease in rats". *Nephrology (Carlton, Vic)*, 23(1), 5-11.
- 3. Yokozawa T, Zheng PD, Oura**

H, et al. (1986). "Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats". *Nephron*, 44(3), 230-4.

4. Jia T, Olauson H, Lindberg K, et al. (2013). "A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice". *BMC nephrology*, 14, 116.

5. Santana AC, Degaspari S, Catanozi S, et al. (2013). "Thalidomide suppresses inflammation in adenine-induced CKD with uraemia in mice". *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 28(5), 1140-9.

6. Al Suleimani YM, Al Za'abi M, Ramkumar A, et al. (2015). "Influence of treatment with gum acacia on renal vascular responses in a rat model of chronic kidney disease". *European review for medical and pharmacological sciences*, 19(3), 498-506.

7. Rahman A, Yamazaki D, Sufiun A, et al. (2018). "A novel approach to adenine-induced chronic kidney disease associated anemia in rodents". *PloS one*, 13(2), e0192531.

8. Phạm Xuân Phong, Lê Ngọc Thúy (2015). "Xây dựng mô hình suy thận mạn trên chuột nhắt". *Tap chí Y học Việt Nam*, 430(2), 6-8.

9. Ali BH, Al-Salam S, Al Za'abi M, et al. (2013). "New model for adenine-induced chronic renal failure in mice, and the effect of gum acacia treatment thereon: comparison with rats". *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 68(3), 384-93.

10. Yen CH, Sun CK, Leu S, et al. (2012). "Continuing exposure to low-dose nonylphenol aggravates adenine-induced chronic renal dysfunction and role of rosuvastatin therapy". *Journal of translational medicine*, 10, 147.