

XÂY DỰNG QUY TRÌNH CÔ LẬP ĐẢO TUY TẠI VIỆT NAM VÀ SƠ BỘ ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA GHÉP ĐẢO TUY TRÊN CHUỘT BỊ GÂY BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG TYP 1 BẰNG STREPTOZOCIN

Đỗ Doãn Lợi¹, Đặng Thị Ngọc Dung¹, Nguyễn Khánh Hòa¹, Lê Minh Giáp²

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Viện Sốt rét và Ký sinh trùng Trung ương

Bệnh đái tháo đường typ 1 gây ra do tế bào beta của đảo tụy bị phá vỡ dẫn tới tụy mất khả năng bài tiết insulin để duy trì nồng độ glucose trong máu. Ghép đảo tụy là một phương pháp điều trị mới đang được tiến hành ở một số trung tâm nghiên cứu. Mục tiêu: Xây dựng phương pháp cô lập đảo tụy phù hợp với điều kiện Việt Nam. Sơ bộ đánh giá hiệu quả của phương pháp ghép đảo tụy cho chuột đái tháo đường typ 1 vào phúc mạc. Nghiên cứu: So sánh đối chứng hai phương pháp cô lập đảo tụy. Theo dõi hiệu quả ghép tụy cho chuột đái tháo đường typ 1 gây bằng streptozocin. Kết quả: Xây dựng được công thức pha chế dung dịch Hank's dùng cho cô lập đảo tụy. Đơn giản hoá được một số bước trong quy trình cô lập đảo tụy chuẩn học tập ở Karolinska, Thụy Điển mà không làm ảnh hưởng đến hình thái và chức năng của đảo tụy. Ghép sơ bộ ban đầu đảo tụy cho 5 chuột đái tháo đường typ 1 nặng và theo dõi trong 30 ngày. Kết luận: Phương pháp cô lập đảo tụy đơn giản giúp tiết kiệm tới 70% kinh phí mà vẫn đảm bảo cho đảo tụy có hình thái và chức năng bình thường. Phương pháp ghép tụy qua đường phúc mạc cải thiện được tình trạng glucose máu của chuột nhưng chỉ duy trì được trong thời gian ngắn.

Từ khóa: tiểu đảo tụy, đái tháo đường typ 1, tế bào beta

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đái tháo đường typ 1 là một bệnh tự miễn được xác định bởi các rối loạn chức năng hệ miễn dịch do tổn thương tế bào beta sản xuất insulin của tiểu đảo tụy. Mặc dù cơ chế bệnh sinh chưa được chứng minh rõ ràng nhưng có những biểu hiện do rối loạn về cấu trúc gen [1] và do ảnh hưởng của một số yếu tố về môi trường [2], ảnh hưởng của chế độ ăn uống [1]. Hậu quả là gây sự tăng cao glucose trong máu và xuất hiện các thể ceton trong hệ thống tuần hoàn do tế bào thiếu glucose. Nguyên tắc quan trọng trong điều trị là làm hạ glucose trong máu bằng cách bổ sung insulin trong tuần hoàn giúp cho glucose xâm nhập được vào trong tế bào dẫn tới hạn chế sự tăng cao nồng độ các thể ceton. Một phương pháp phổ biến hiện nay là tiêm insulin hàng ngày tùy theo mức độ của nồng độ glucose trong máu bệnh nhân. Điều hạn chế của phương pháp điều trị này là rất khó kiểm soát được biến chứng, trong đó đáng kể nhất là tai biến do dùng insulin quá liều hoặc bị nhiễm toan do dùng insulin không đúng cách và đủ liều. Hơn nữa, phương pháp điều trị này luôn đòi hỏi phải định lượng được nồng độ glucose trong máu. Vì vậy việc theo dõi điều trị gây nhiều tốn kém và phiền phức cho bệnh nhân, đồng thời luôn cần có cán bộ y tế theo dõi. Để hạn chế các tai biến nói trên, việc phát

triển các phương pháp điều trị mới để kiểm soát lượng insulin đưa vào cơ thể người bệnh trong giới hạn sinh lý là một việc làm cấp bách. Bổ sung tiểu đảo tụy thông qua ghép một số các tiểu đảo ngoại lai là một lựa chọn có nhiều triển vọng. Một ưu điểm quan trọng của phương pháp này là đơn giản hơn so với ghép cả tuyến tụy và liệu thuốc ức chế miễn dịch phải dùng ít hơn [4, 5]. Tuy nhiên, phương pháp này hiện nay chưa được nghiên cứu và ứng dụng tại Việt Nam. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục đích. Sửa đổi, áp dụng phương pháp cô lập đảo tụy tại labo thí nghiệm bộ môn Dược lý và bộ môn Hóa sinh, Đại học Y Hà Nội. Bước đầu cấy ghép các đảo tụy cô lập trên chuột cống trắng gây đái tháo đường typ 1 bằng streptozocin.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Chuột cống trắng trọng lượng 200 - 250g nuôi tại bộ môn Dược lý, trường Đại học Y Hà Nội.

2. Phương pháp

2.1. Cải tiến quy trình cô lập và nuôi cấy đảo tụy

Quy trình cô lập đảo tụy được cải tiến theo các bước như sau:

Xây dựng công thức pha chế dung dịch Hank's dùng để cô lập đảo tụy.

Xây dựng quy trình cô lập đảo tụy dựa trên phương pháp cô lập đảo tụy của Labo 6B: 01, Viện Karolinska, Stockholm, Thụy Điển [3] với phương châm rút ngắn một số bước có sử dụng các dung dịch đắt tiền, thay thế bằng các công đoạn và dung dịch rẻ tiền hơn mà cụ thể là lược bỏ phần cô lập có sử dụng các dung dịch có tỷ trọng 1077 và 1119 để ly tâm cùng với tụy sau khi đã ủ với collagenase bằng phương pháp nhật và rửa đảo tụy thủ công bằng dung dịch Hank's. Sau đó khoảng 50 - 100 đảo tụy được nuôi cấy trong đĩa petri bằng dung dịch RPMI 1640 với nồng độ glucose 11 mM kèm theo 10 % FCS, 100 U/ml penicillin và 100 mg/ml streptomycin sulphate. pH của dung dịch nuôi cấy luôn giữ ở 7.4 bằng cách cho thêm đệm Natri bicarbonate. Đảo tụy được nuôi cấy trong tủ ẩm 37°C qua đêm với 5% carbon dioxide. Chức năng của đảo tụy được đánh giá bằng cách định lượng nồng độ insulin của đảo tụy tiết ra trong 1h ngay sau khi đảo tụy được cô lập và ở giờ thứ 24 sau khi ủ. Kết quả được so sánh với kết quả nồng độ insulin của đảo tụy cô lập đo tại Viện Karolinska trong các nghiên cứu trước đây của chúng tôi [3].

2.2. Ghép đảo tụy cô lập cho chuột đái tháo đường gây bằng streptozocin

Chuột cống đái tháo đường được gây bằng cách tiêm màng bụng streptozocin liều 70mg/kg, nuôi trong 15 ngày. Sau khi lấy máu để đo lường

insulin và đánh giá nồng độ glucose máu để khẳng định chuột bị đái tháo đường typ 1 (glucose máu > 300mg/dl), chúng tôi tiến hành phẫu thuật, ghép đảo tụy chuột cùng bố, mẹ vào mạc nối lớn. Chuột đái tháo đường typ I sau khi ghép đảo tụy được theo dõi nồng độ glucose máu và insulin máu trong 30 ngày. Nhóm đối chứng chỉ gây đái tháo đường bằng streptozocin, phẫu thuật nhưng không ghép tụy cũng được tiến hành theo dõi song song. Nồng độ glucose máu được đo ở các thời điểm: trước phẫu thuật, sau phẫu thuật 5, 15 và 30 ngày.

Định lượng insulin: Insulin trong các mẫu dung dịch hoặc huyết tương được giữ ở nhiệt độ - 10°C trong vòng 20 ngày rồi đem định lượng trên máy ELISA tại Viện Quân Y 108 bằng "rat Insulin ELISA kit" của Mercodia, Uppsala Sweden.

2.3. Xử lý số liệu: Kết quả thu thập được xử lý bằng phương pháp thống kê sử dụng t test student. Khác biệt có ý nghĩa khi giá trị $p < 0,05$.

III. KẾT QUẢ

1. Cải tiến quy trình cô lập đảo tụy

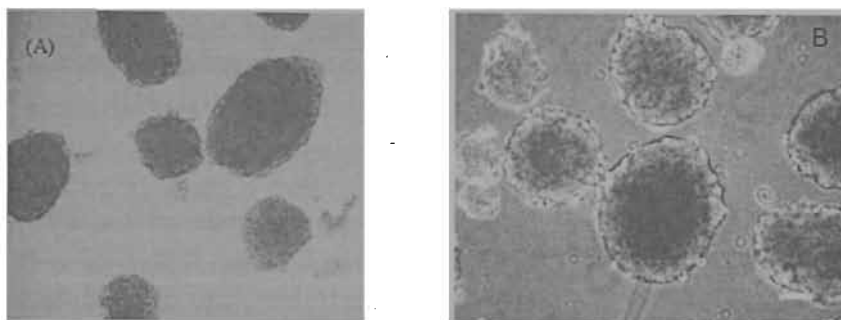
Đã xây dựng được công thức pha chế dung dịch Hank's dựa trên công thức của hãng Biovitrogen. Dung dịch sau khi pha chế được kiểm định về pH và khả năng sử dụng để cô lập đảo tụy so với dung dịch Hank's chuẩn đặt mua của Biovitrogen đã xây dựng được phương pháp cô lập đảo tụy bằng cách lược bỏ bớt một số bước có sử dụng các dung dịch đắt tiền.

Bảng 1. So sánh kết quả thu được khi cô lập đảo tụy của 1 chuột cống trắng theo hai phương pháp

STT	Nội dung	Phương pháp cô lập của Lacy P.E.	Phương pháp cải tiến
1	pH dung dịch Hank's	7,38 ± 0,5	7,37 ± 0,9
2	Thể tích Hank's cần dùng	130 ml	300 ml
3	Số đảo tụy thu được	259 ± 76	165 ± 89
4	Dung dịch 1077	5ml	0
5	Dung dịch 1119	5ml	0
6	Số lần ly tâm trên máy	5	0
7	Khối lượng collagenase	8,0 ± 1,0 mg	9,0 ± 1 mg
8	Thời gian chi phí	63 ± 10 phút	80 ± 13 phút
9	Chi phí hoá chất	1.000.000 đ	200.000đ

Bảng 2. Chất lượng đảo tụy thu được sau khi cô lập bằng phương pháp cải tiến

STT	Nội dung	Phương pháp cô lập của Lacy P.E.	Phương pháp cải tiến
1	Số đảo tụy thu được	259 ± 76	165 ± 89
2	Kích thước đảo tụy sau khi cô lập	360 ± 175 μm	452 ± 158 μm
3	Khả năng bài tiết insulin sau khi cô lập (ng/đảo/h)	13,1 ± 0,93	13,8 ± 0,85
4	Tỉ lệ sống sau 24h nuôi cấy	97% ± 2%	89% ± 5%
5	Khả năng bài tiết insulin sau 24h nuôi cấy	Chưa xác định	Chưa xác định

**Ảnh 1. Hình thái đảo tụy cô lập bằng 2 phương pháp**

A: Phương pháp cô lập đảo tụy của Labo 6B: 01, Viện Karolinska, Stockholm, Thụy Điển.

B: Phương pháp cải tiến.

2. Kết quả ghép tụy cho chuột cống đái tháo đường typ I gây bằng streptozocin

Bảng 3. So sánh một số chỉ số cơ bản sau khi ghép tụy sau 10 ngày

TT	Nội dung	Nhóm chuột bình thường	Nhóm chuột đái tháo đường typ I không ghép tụy	Nhóm chuột đái tháo đường typ I ghép tụy
1	Số lượng chuột (n)	10	10	10
2	Số đạt tiêu chuẩn đái tháo đường typ 1	0	5	5
3	Nồng độ glucose máu trước khi ghép tụy	5,3 ± 1,5 mM	18,7 ± 6,3 mM	19,2 ± 5,6 mM
4	Nồng độ glucose máu sau ghép tụy 10 ngày	5,2 ± 1,7 mM	20,3 ± 5,8 mM	14,5 ± 4,6 mM *
5	Nồng độ insulin máu trước khi ghép tụy (ng/ml)	3,2 ± 0,3	0,5 ± 0,5	0,3 ± 0,5
6	Nồng độ insulin máu sau ghép tụy 10 ngày (ng/ml)	3,5 ± 0,3	0,4 ± 0,7	1,5 ± 0,4*
7	Số chuột sống 10 ngày sau ghép tụy	10 con	5	5
8	Số chuột sống 15 ngày sau ghép tụy	10	2	4
9	Số chuột sống 21 ngày sau ghép tụy	10	0	2

IV. BÀN LUẬN

Về phương pháp cô lập đảo tụy cải tiến

Bằng cách chủ động xây dựng công thức pha

chế dung dịch Hank's, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã chủ động được phần cơ bản trong các bước tiến hành cô lập đảo tụy. Phương pháp cô lập học tập được tại Viện Karolinska cần một máy ly tâm cỡ lớn

hiện chỉ mới có ở labo trung tâm, Trường Đại học Y Hà Nội. Phương pháp của chúng tôi đã đơn giản được bước này. Số lượng đảo tụy thu được trên mỗi chuột bằng phương pháp cô lập của chúng tôi ít hơn so với phương pháp cô lập tại Viện Karolinska [3]. Thời gian chi phí cho toàn bộ quá trình cũng kéo dài hơn (bảng 1). Tuy nhiên chất lượng đảo tụy bằng cả hai phương pháp đều không có gì khác biệt (bảng 2). Điều đó cho thấy phương pháp cô lập đảo tụy thủ công của chúng tôi có thể được sử dụng trong điều kiện nghiên cứu của Việt Nam.

Về khả năng ghép tụy cho chuột đái tháo đường typ I

Sử dụng đảo tụy cô lập để ghép cho bệnh nhân đái tháo đường typ I đã được tiến hành thành công ở một số nước. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ghép đảo tụy là một phương pháp đơn giản, an toàn và có hiệu quả điều trị rõ rệt [4, 6]. Khó khăn lớn nhất là tìm kiếm nguồn đảo tụy. Một số nghiên cứu đã chỉ ra nguồn lý tưởng là phát triển các phương pháp nuôi cấy đảo tụy từ các tế bào gốc hoặc tế bào mầm ở các mô cơ quan. Tuy nhiên đây là một phương pháp mới đòi hỏi kỹ thuật hiện đại. Bước đầu nghiên cứu ứng dụng các tiến bộ này, chúng tôi đã cố gắng tiến hành cô lập và ghép tụy cho chuột đái tháo đường typ I gây bằng streptozocin.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy: Bằng cách ghép các đảo tụy ngay sau khi cô lập, tình trạng đái tháo đường của chuột đã cải thiện rõ rệt. Nồng độ glucose máu sau ghép tụy 10 ngày đã giảm một cách đáng kể so với nhóm không ghép tụy. Tuy nhiên nồng độ này vẫn còn cao hơn so với chuột bình thường. Tỷ lệ sống sau 21 ngày của chuột đái tháo đường typ 1 là 0% nhưng số chuột được ghép tụy là 40%. Điều đó cho thấy phương pháp cô lập đảo tụy là có thể áp dụng trong việc cấy ghép tụy. Nồng độ insulin trong máu chuột sau ghép tụy 10 ngày cũng được cải thiện rõ rệt tuy không thể bằng nhóm chuột bình thường nhưng cũng cho thấy sau khi ghép đảo tụy có khả năng sống và bài tiết insulin vào máu. Như vậy việc đảm bảo để điều trị thành công cũng như đảm bảo duy trì hiệu quả của ghép cần phải tiến hành một nghiên cứu qui mô, đảm bảo điều kiện tốt nhất cho phẫu thuật cũng như nuôi cấy đảo tụy. Đường ghép hữu hiệu nhất

cũng cần được xem xét và nghiên cứu.

Nhiều nghiên cứu khác đã chỉ rõ các đường ghép tụy cho hiệu quả điều trị tốt nhất là các đường ghép qua tĩnh mạch cửa vào gan hoặc ghép vào vùng vỏ thận [5]. Một số thì chỉ ra đường ghép an toàn nhất là ghép vào thành bàng quang. Tuy nhiên, do điều kiện kỹ thuật còn rất hạn chế, chúng tôi chỉ có thể ghép đảo tụy vào mạc nối lớn. Có lẽ đây là nguyên nhân chính dẫn tới việc chuột chết sau 21 ngày ghép tụy. Khả năng nuôi sống tụy qua mạc nối lớn khá hạn chế. Do vậy nồng độ glucose máu của chuột sau ghép tụy có giảm nhưng không nhiều.

V. KẾT LUẬN

Phương pháp cô lập đảo tụy cải tiến theo hướng tiết kiệm một số công đoạn sử dụng dung dịch đất tiên và tự pha chế dung dịch Hank's dùng cho việc cô lập đảo tụy là các phương pháp có thể áp dụng được. Ghép đảo tụy cô lập cho chuột đái tháo đường typ 1 là phương án có thể thực hiện được và cải thiện được tình trạng của đái tháo đường. Tuy nhiên nghiên cứu cần được tiến hành nhiều hơn nữa để có thể đưa ra đường ghép hiệu quả, an toàn. Đồng thời cũng cần nghiên cứu thêm về khả năng biệt hóa thành tế bào beta đảo tụy ở các mô cơ khác để tạo nguồn đảo tụy cho công việc cấy ghép.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bertuzzi F, Secchi A, Di Carlo V. Islet transplantation in type 1 diabetic patients. *Transplant Proc* 2004; 36: 603Y604.
2. Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, et al. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia*. 1999;42: 1395Y1403.
3. Nguyễn Khánh Hòa, Đỗ Doãn Lợi, Đặng Thị Ngọc Dung (2006). Đặc điểm về chức năng và hình thái của đảo tụy cô lập sau thời gian nuôi cấy ngoài cơ thể. *Tạp chí nghiên cứu Y học. Trường Đại học Y Hà Nội*, 45(5). Trang 8 - 11.
4. Sutherland DE. *International Pancreas Transplant Registry (IPTR), 2003 Annual Report*. 2003.
5. Sutherland DE, Gruessner RW, Dunn DL, et al

Lessons learned from more than 1,000 pancreas transplants at a single institution. *Ann Surg.* 2001; 233: 463Y501.

replacement therapy (pancreas and islet transplantation) for treatment of diabetes mellitus.

6. Sutherland DE. Current status of beta - cell

7. *Transplant Proc.* 2003; 35: 1625Y1627.

Summary

DEVELOP PROCEDURE OF ISLET ISOLATION CONSISTENT WITH VIETNAM'S CONDITION AND PRE EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF ISLET TRANSPLANTATION ON MOUSE INDUCED TYPE I DIABETES

Diabetes mellitus type 1 is a form of diabetes mellitus that results from autoimmune destruction of insulin producing beta cells of the pancreas leading to loss of pancreatic insulin secretion to maintain blood glucose concentrations. Islet transplantation is the transplantation of isolated islets from a donor pancreas and into another person. It is a new treatment is being conducted in several research centers. Objective: Develop methods of islet isolation consistent with Vietnam's conditions. Preliminary evaluation of the effectiveness of islet transplantation method for mouse type 1 diabetes on peritoneal dialysis. Research Methodology: Comparison of two methods of confronting islet isolation. Monitor the effectiveness of pancreas transplants for type 1 diabetic mice caused streptozocin. Results: Building the form of Hank's solution used for islet isolation. Simplifying some steps of the process of islet isolation standards learning from Karolinska, Sweden, without affecting the morphology and function of the islet. Preliminary transplant islet for five serious type 1 diabetic mice and monitoring for 30 days. Conclusion: The simplification of method of islet isolation saves the cost up to 70% while maintaining normal islet morphology and function. Pancreatic grafting via peritoneal improve the status of mice's blood glucose status but only in short period.

Keywords: pancreas islet, Diabetes type I, beta cell

HCV RNA VÀ KIỂU GEN VIRUS VIÊM GAN C (HCV) Ở BỆNH NHÂN CHẠY THẬN NHÂN TẠO (TNT) TẠI BỆNH VIỆN BẠCH MAI

Vũ Thị Tường Vân
Bệnh viện Bạch Mai

Xác định tỷ lệ HCV - RNA ở bệnh nhân chạy thận nhân tạo (TNT) có anti - HCV (+) và mô tả kiểu gen của virus viêm gan C ở bệnh nhân chạy TNT có HCV - RNA (+). Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu được tiến hành trên 70 bệnh nhân chạy thận nhân tạo có anti - HCV (+) tại bệnh viện Bạch Mai trong thời gian 2 năm (2006 – 2008). Phương pháp nghiên cứu điều tra ngang, HCV - RNA được xác định bằng kỹ thuật Real - time RT - PCR với bộ sinh phẩm COBAS® AmpliPrep/ COBAS® TaqMan® HCV Test. (Roche). Kiểu gen HCV được xác định bằng kỹ thuật Real - time RT - PCR. Kết quả và kết luận: Trong số 70 bệnh nhân chạy TNT có anti - HCV (+), 64 trường hợp có HCV - RNA chiếm 91,43% cho thấy mỗi nguy cơ lớn lây nhiễm chéo cho những bệnh nhân ở cùng một trung tâm lọc máu. 36 trường hợp (56,25%) có tải lượng virus (viral load - ước lượng số virus có trong máu) > 10⁶ copies/ml. Kiểu gen 6 (50%) chiếm tỷ lệ cao nhất, kiểu gen 1 (43,75%), có 4 trường hợp nhiễm phối hợp hai kiểu gen: một trường hợp nhiễm phối hợp 1 và 2 (1,56%) và 3 trường hợp nhiễm phối hợp 6 và 2 (4,69%).

Từ khóa: HCV, kiểu gen HCV, bệnh nhân chạy thận nhân tạo, bệnh viện Bạch Mai

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh nhân chạy thận nhân tạo (TNT) và truyền máu nhiều lần là đối tượng nguy cơ bị nhiễm virus

viêm gan C (HCV) rất cao chiếm tỷ lệ từ 5 - 94% tùy theo từng vùng và khu vực [2]. Tỷ lệ nhiễm HCV ở nhóm bệnh nhân này tăng dần theo thời gian, theo số lần lọc máu [3, 7]. Bệnh nhân suy thận ngay khi