

Nghiên cứu một số đặc điểm hồi hải mã và kết quả tiêm NaCl 0,9% hồi hải mã trên chuột thực nghiệm

Studying some hippocampal characteristics and the results of 0.9% NaCl injection in the hippocampus in rat

Nguyễn Xuân Kiên*, Nguyễn Hà Họa**,
Đỗ Trung Hiếu*, Đỗ Xuân Hai*

*Học viện Quân y,
**Cục Quân y

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định một số đặc điểm về kích thước, tọa độ tiêm hồi hải mã và nhận xét kết quả tiêm hồi hải mã trên chuột. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu thực nghiệm mô tả có đối chứng 18 chuột trưởng thành khỏe mạnh có trọng lượng 210-240g. **Kết quả:** Khoảng cách mũi kim đến bờ trong hải mã (1,71mm), bờ ngoài (1,56mm), đến lưng (1,22mm), bụng (1,38mm), đến đầu (2,21mm) và đuôi hải mã (2,3mm); khoảng cách từ lưng hải mã đến vỏ não đỉnh 2,11mm. **Kết luận:** Hồi hải mã có kích thước trước sau 4,26mm, giữa bên 3,15mm và lưng bụng 2,49mm. Tọa độ tiêm vào vùng CA1 hồi hải mã là AP = - (4,4 ± 0,8) mm; ML = ± (2,2 ± 0,2) mm; DV = - (3,1 ± 0,1) mm. Tiêm 2,5μl dung dịch vào hồi hải mã chưa thấy ảnh hưởng tới sức khỏe chuột.

Từ khóa: Hồi hải mã, CA1.

Summary

Objective: To determine some characteristics of hippocampal size and hippocampal injection coordinates and comment on hippocampal injection results in rat. **Subject and method:** A descriptive controlled experimental study of 18 healthy adult rats weighing 210-240g. **Result:** Distance of needle to hippocampal inner margin (1.71mm), outer margin (1.56mm), dorsal (1.22mm), ventral (1.38mm), head (2.21mm) and tail hippocampus (2.3mm); Distance from dorsal hippocampus to parietal cortex was 2.11mm. **Conclusion:** The hippocampal measures are antero-posterior of 4.26mm, medio-lateral of 3.15mm and dorso-ventral of 2.49mm. The coordinates inject into CA1 region of hippocampus is AP = - (4.4 ± 0.8) mm; ML = ± (2.2 ± 0.2) mm; DV = - (3.1 ± 0.1) mm. Injecting 2.5μl of solution into the hippocampus have not seen affect on the rat health.

Keywords: Hippocampus, CA1.

1. Đặt vấn đề

Những tổn thương hồi hải mã gây bệnh Alzheimer (AD) và một số bệnh lý thần kinh khác vì vậy được nghiên cứu kỹ về giải phẫu và đặc điểm của chúng [1]. Chuột cống trắng hiện nay được lựa

chọn chủ yếu gây mô hình bệnh Alzheimer với amyloid beta (Aβ) nhằm đánh giá hiệu quả các biện pháp can thiệp hoặc tiến triển bệnh lý, tuy nhiên xác định vị trí không gian hồi hải mã gặp nhiều khó khăn với các nhà nghiên cứu do sự phụ thuộc vào tuổi, cân nặng... Bộ môn Phẫu thuật thực hành, thực nghiệm là một trong số các cơ sở đầu tiên gây AD bằng tiêm Aβ vào hồi hải mã chuột trên hệ thống stereotaxic, đây là phương pháp được nhiều tác giả đánh giá là mô hình gây AD hiệu quả [2]. Mặc

Ngày nhận bài: 16/5/2023, ngày chấp nhận đăng: 18/7/2023

Người phản hồi: Đỗ Xuân Hai

Email: doxuanhai@vmmu.edu.vn - Học viện Quân y

dù đã có nhiều kinh nghiệm gây AD tuy nhiên để xác định vị trí không gian ba chiều của hồi hải mã và là cơ sở khoa học để các nghiên cứu khác có thể thực hiện hiệu quả, chúng tôi tiến hành nghiên cứu một số đặc điểm giải phẫu, tọa độ không gian qua hệ thống stereotaxic. Nghiên cứu nhằm mục tiêu: *Xác định một số đặc điểm về kích thước hồi hải mã, tọa độ tiêm và kết quả tiêm hồi hải mã.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Gồm 18 chuột cống trắng chủng Wistar trưởng thành, khỏe mạnh, có trọng lượng 210-240g. Thí nghiệm gồm 6 chuột nghiên cứu giải phẫu, xác định tọa độ tiêm và 12 chuột nghiên cứu kết quả tiêm hồi hải mã tại Bộ môn phẫu thuật thực hành, thực nghiệm - Học viện Quân y từ ngày 25/9/2022 đến ngày 25/02/2023.

2.2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm, mô tả, có đối chứng.

Cỡ mẫu xác định theo công thức: $n = DF/k + 1$ [3]. Cỡ mẫu $n = 18$.

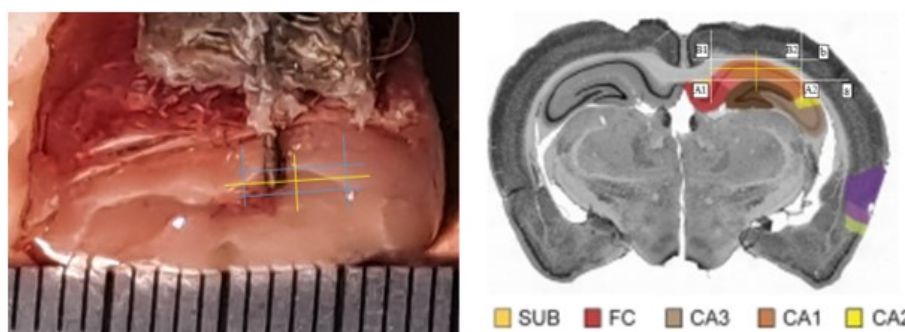
Quy trình nghiên cứu: (1) Nghiên cứu giải phẫu và xác định tọa độ tiêm hồi hải mã: Gây mê chuột bằng ketamin, lấy tọa độ trước sau [antero-posterior (AP) = -4mm], giữa bên [medio-lateral (ML) = $\pm 2,2$ mm, lưng bụng [dorso-ventral (DV) = -3,2mm]] [0] trên hệ thống Stereotaxic (Hình 1 E; A), lưu kim, cố định kim vào hộp sọ bằng composit nha khoa (Hình 1B), bóc lộ lấy não chuột, cắt coronal và sagittal qua vị trí tiêm (hình 1C), các lát cắt được chụp dưới kính hiển vi 10x, hồi hải mã xác định theo bản đồ kỹ thuật số (Hình 1D) [0]. Kích thước hồi hải mã, vị trí đầu mũi kim trong hồi hải mã, tọa độ tiêm vùng CA1 được đo bằng phần mềm ImageJ.



Hình 1. Quy trình tiêm và nghiên cứu giải phẫu hồi hải mã

(2) Xác định tọa độ tiêm CA1: Vùng CA1 (chiếm phần lớn nửa mặt lưng hồi hải mã) [5], [6]), chia hồi hải mã thành 2 phần (lưng, bụng) bằng đường thẳng (a), đường (b) // (a) và đi qua bờ lưng hồi hải, (a) cắt bờ trong và ngoài hồi hải tại A1, A2. Từ A1 kẻ đường vuông (a) cắt (b) tại B1, từ A2 kẻ đường

vuông góc (a) cắt (b) tại B2; 2 đường thẳng đi qua trung điểm của B1B2, A1A2 và A1B1, A2B2 cắt nhau tại O điểm giữa vùng CA1. Tọa độ tiêm CA1 được hiệu chỉnh từ tọa độ AP, ML, DV ban đầu với khoảng cách từ mũi kim đến điểm O theo 3 chiều tương ứng (Hình 2).



Hình 2. Điểm giữa vùng CA1 hồi hải mã

(3) Nghiên cứu kết quả tiêm hồi hải mã: Gây mê chuột bằng ketamin, tiêm hồi hải mã trên hệ thống định vị ở tọa độ (AP = -4mm, ML = $\pm 2,2$ mm, DV = -3,2mm) [4] bằng bơm Hamilton theo quy trình của Facchinetti (2018) [2] bơm 2,5 μ l NaCl 0,9%, nhóm chứng chỉ tiêm và lưu kim hồi hải mã (không sử dụng dung dịch). Theo dõi toàn trạng chuột đến 30 ngày.

Một số chỉ tiêu nghiên cứu: (1) Kích thước hồi hải mã: (i) Kích thước (mm) hồi hải mã gồm chiều trước sau, giữa bên, lưng bụng và lưng hải mã-vỏ não đỉnh được đo ở vị trí lớn nhất của hồi hải mã bằng phần mềm ImageJ. (ii) Tương quan giữa trọng lượng với kích thước hộp sọ và hồi hải mã, đánh giá thông qua so sánh r với $p < 0,05$. (2) Vị trí mũi kim

trong hồi hải mã: Là khoảng cách (mm) mũi kim đến đầu, đuôi, lưng, bụng, bờ trong và bờ ngoài hồi hải mã đo bằng phần mềm imageJ. (3) Tọa độ tiêm vùng CA1 trên hệ thống Stereotaxic: Là tọa độ 3 chiều (AP, ML, DV) trên hệ thống định vị sao cho đầu mũi kim ở giữa vùng CA1. (4) Kết quả sau tiêm hồi hải mã: (i) Trọng lượng trước và sau thí nghiệm (so sánh cặp $p < 0,05$); (ii) Tỷ lệ chuột sống; (iii) Kết quả giải phẫu bệnh vi thể sau 30 ngày.

Xử lý số liệu: Số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0.

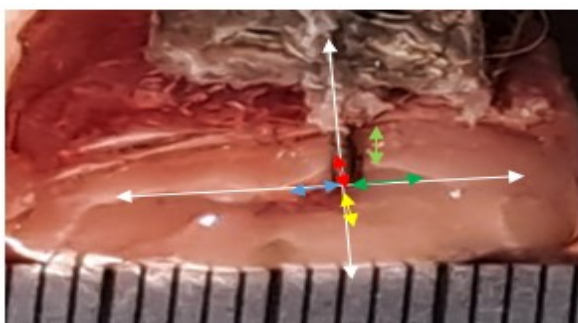
Nghiên cứu được sự chấp thuận của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học số IRB-A-2201.

3. Kết quả

3.1. Một số đặc điểm về kích thước hồi hải mã và tọa độ tiêm hồi hải mã

Bảng 1. Kích thước hồi hải mã và khoảng cách mũi tiêm đến hải mã (n = 6)

Biến số (mm)	($\bar{X} \pm SD$)	Biến số (mm)	($\bar{X} \pm SD$)
Chiều trước sau hải mã	$4,26 \pm 0,31$	Mũi kim - đuôi hải mã	$2,3 \pm 0,28$
Chiều giữa bên hải mã	$3,15 \pm 0,41$	Mũi kim - lưng hải mã	$1,22 \pm 0,37$
Chiều lưng bụng hải mã	$2,49 \pm 0,16$	Mũi kim - bụng hải mã	$1,38 \pm 0,3$
Lưng hải mã - vỏ não đỉnh	$2,11 \pm 0,61$	Mũi kim - bờ trong hải mã	$1,71 \pm 0,12$
Mũi kim - đầu hải mã	$2,21 \pm 0,67$	Mũi kim - bờ ngoài hải mã	$1,56 \pm 0,15$



Hình 4. Một số đặc điểm giải phẫu hồi hải mã

Trên lát cắt coronal và sagittal qua tọa độ (AP = -4; ML = 2,2; DV = -3,2) hồi hải mã có kích thước trung bình là: 4,26mm; 3,15mm; 2,49mm; khoảng cách từ mũi kim đến các phần của hải mã là: Bờ trong (1,71mm), bờ ngoài (1,56mm), lưng (1,22mm), bụng (1,38mm), đầu (2,21mm) và đuôi (2,3mm); khoảng cách từ lưng hải mã đến vỏ não thùy đỉnh 2,11mm (Hình 4 trái). Hình ảnh vi thể cho thấy đầu mũi kim (dấu +) nằm trong vùng CA1 (vòng trắng) hồi hải mã (vòng xanh) (Hình 4 phải).

Bảng 2. Tương quan giữa trọng lượng với kích thước hộp sọ và hồi hải mã

Biến số	$\bar{X} \pm SD$ (n = 6)	r	p
Cân nặng (1)	219,7 ± 14,8	$r_{1-2} = 0,76$	<0,05
Lamda - Bredma (2)	10,54 ± 0,66		
Chiều trước sau hải mã (3)	4,26 ± 0,31	$r_{1-3} = -0,37$	>0,05
Chiều giữa bên hải mã (4)	3,15 ± 0,41	$r_{1-4} = 0,94$	>0,05
Chiều lưng bụng hải mã (5)	2,49 ± 0,16	$r_{1-5} = 0,2$	>0,05

Khoảng cách Lamda-Bredma là 10,54mm, có mối tương quan thuận khá chặt giữa trọng lượng với khoảng cách Lamda-Bredma (với $r = 0,76$, $p < 0,05$). Tuy nhiên, chưa thấy mối tương quan giữa cân nặng và chiều dài, chiều rộng của hồi hải mã với $p > 0,05$.

Bảng 3. Tọa độ tiềm vùng CA1

Tọa độ	$\bar{X} \pm SD$ (n = 6)
AP	-(4,4 ± 0,8)
ML	±(2,2 ± 0,2)
DV	-(3,1 ± 0,1)

Tọa độ tiềm vùng CA1 trên hệ thống định vị stereotaxic xác định bởi AP, ML, DV trung bình là AP = -4,4mm; ML = ±2,2mm; DV = -3,1mm.

3.2. Kết quả tiềm hồi hải mã

3.2.1. Một số đặc điểm chung

Bảng 4. Trọng lượng chuột nghiên cứu trước và sau can thiệp

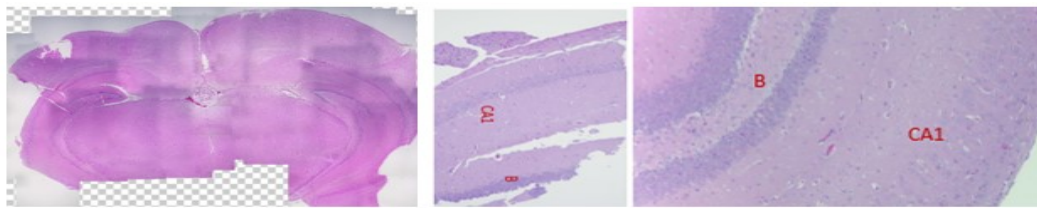
Nhóm chứng (n = 6) ($\bar{X} \pm SD$)		Nhóm tiêm NaCl 0,9% (n = 6) ($\bar{X} \pm SD$)	
Trước (a)	Sau (a')	Trước (b)	Sau
219,2 ± 9,2	218,3 ± 9,8	214,2 ± 16,9	217,5 ± 15,7
$p_{a-a'} > 0,05$, $p_{a-b} > 0,05$		$p > 0,05$	

Chuột nghiên cứu có trọng lượng trung bình 219,7g. Nhóm tiêm NaCl 0,9% là 214,2g (214,2 ± 16,9) không khác biệt với nhóm chứng có trọng lượng trung bình 219,2g (219,2 ± 9,2) với $p = 0,54$. Trọng lượng chuột không thay đổi trước và sau can thiệp với $p > 0,05$.

Bảng 5. Tình trạng chung sau can thiệp

Nhóm chuột	Chuột sống	p
Nhóm tiêm NaCl 0,9% (n = 6)	6 (100%)	>0,05
Nhóm chứng (n = 6)	6 (100%)	

100% số chuột tham gia nghiên cứu sống trong thời gian theo dõi. Giải phẫu bệnh không xuất hiện tình trạng viêm, xuất huyết tại vị trí tiêm.



Hình 5. Hình ảnh vi thể não và hồi hải mã bình thường
Não và hồi hải mã (trái), CA1 ở chuột tiêm NaCl và nhóm chứng (phải)

Trên giải phẫu vi thể cho thấy không có tổn thương xuất huyết hay thâm nhiễm viêm ở hồi hải mã và các vùng não trên nhóm chuột nghiên cứu.

4. Bàn luận

4.1. Đặc điểm hồi hải mã và tọa độ tiêm hồi hải mã

Ở người lớn, hồi hải mã dài 4-5cm, rộng khoảng 1cm [7], ở loài gặm nhấm, hồi hải mã là một cấu trúc tương đối lớn, hình hạt điều nằm ngay dưới tân vỏ não gồm 2 phần: Hồi răng (dentate gyrus: DG) và sừng Ammon (cornu ammonis: CA) có 4 vùng (CA1, CA2, CA3, CA4) [1]. Các kết nối thần kinh trong CA tạo thành vòng lặp trisynaptic có vai trò trong chuyển đổi trí nhớ ngắn hạn thành dài hạn và duy trì trí nhớ dài hạn bởi sự tiến triển một chiều của các kết nối synap thông qua vòng lặp [1]. Hơn nữa, hồi hải mã kết nối với hồi đai thông qua thể vú và đồi thị trước tạo thành mạch Papez, mang tên nhà khoa học đã mô tả đầu tiên (1937), mạch Papez liên quan đến các chức năng ghi nhớ, trí nhớ ngắn hạn về không gian và các quá trình nhận thức (Rao YL - 2022) [8]. Bệnh Alzheimer đã được chứng minh với các bất thường ở hồi hải mã gồm mất tế bào thần kinh, lắng đọng mảng A β và sợi tơ thần kinh [8]. Gây mô hình AD bằng tiêm A β trên hệ thống Stereotaxic vào hồi hải mã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu về AD. Cuốn sách "Bộ não chuột trong tọa độ không gian" là cơ sở để xác định tọa độ các vùng não chuột [9], theo Franklin và Paxinos (2007) [10] trên chuột Wistar tiêu chuẩn (290g) hồi hải mã có kích thước 3 chiều là 3,22mm, 3,6mm, 3,96mm và tọa độ tiêm hồi hải mã là $0,94 \leq AP \leq 4,16$, $0,04 \leq ML \leq 3,72$, $1,25 \leq DV \leq 5$. Tuy nhiên, Yang P (2018) [9] cho thấy giống chuột và trọng lượng khác nhau có sự khác biệt về tọa độ các vùng trong não, tác giả

cũng đã thiết lập phương trình tương quan giữa tọa độ hồi hải mã với trọng lượng ở chuột Wistar và chuột Sprague-Dawley (SD); các nghiên cứu tiêm hồi hải mã ở các tọa độ khác nhau trên giống chuột, có trọng lượng khác nhau như Facchinetti (2018) [2] trên chuột C57BL/6J ở tọa độ (AP = -3; ML = $\pm 2,2$; DV = -2,8) hay Wang DL (2004) [4] ở tọa độ (AP = -4; ML = $\pm 2,2$; DV = -3,2) trên chuột Wistar 250 ± 30 g.

Chúng tôi nghiên cứu trên chuột cống trắng có trọng lượng 210-240g, hồi hải mã có kích thước 3 chiều là 4,26mm; 3,15mm; 2,49mm. Tiêm ở tọa độ (AP = -4mm, ML = $\pm 2,2$ mm, DV = -3,2mm) mũi kim vào hồi hải mã với khoảng cách từ mũi kim đến các phần của hải mã là bờ trong (1,71mm), bờ ngoài (1,56mm), lưng (1,22mm), bụng (1,38mm), đầu (2,21mm) và đuôi (2,3mm). Tọa độ AP = - (4,4 $\pm$ 0,8) mm; ML = $\pm$ (2,2 $\pm$ 0,2) mm; DV = - (3,1 $\pm$ 0,1) mm là tọa độ tiêm để mũi kim trong vùng CA1. Ngoài ra, chúng tôi cũng tìm thấy mối tương quan thuận giữa cân nặng với kích thước hộp sọ như được mô tả bởi Yang P [9], xong không thấy tương quan giữa kích thước hồi hải mã với cân nặng.

4.2. Kết quả tiêm hồi hải mã

Đặc điểm trước thử nghiệm: 12 chuột nghiên cứu có trọng lượng trung bình 219,7g nhỏ hơn không đáng kể so với chuột Wistar trong nghiên cứu của Wang DL (2004) (250 ± 30) [4], không có sự khác biệt về trọng lượng ở 2 nhóm chuột với $p > 0,05$. 100% chuột nghiên cứu biểu hiện toàn trạng bình thường về vận động, ăn uống.

Đặc điểm chung sau can thiệp: Tiêm hồi hải mã được thực hiện dưới kính hiển vi (10x) trong suốt quá trình khoan sọ, đưa kim xuống hồi hải mã, tiêm và rút kim; quá trình khoan sọ liên tục được phun nước muối sinh lý lên vị trí tiêm để làm giảm nhiệt

lượng sinh ra do ma sát trong qua trình khoan. Chuột được theo dõi nhịp thở, dấu hiệu xù lông trong suốt quá trình thực hiện kỹ thuật, nếu có bất thường, kỹ thuật sẽ dừng lại, sau khi chuột ổn định tiếp tục thực hiện. Thể tích dịch tiêm hồi hải mã có khác nhau giữa các nghiên cứu. Chúng tôi tiêm 2,5µl dung dịch NaCl 0,9% vào hồi hải mã ở nhóm tiêm dung dịch và không tiêm ở nhóm chứng, theo dõi sau can thiệp đến 30 ngày thấy rằng 100% chuột sống và cân nặng thay đổi không đáng kể. Kết quả giải phẫu vi thể cho thấy không có thâm nhiễm viêm, xuất huyết ở hồi hải mã và các vùng não trên nhóm chuột nghiên cứu.

5. Kết luận

Kích thước hồi hải mã ở chuột cống trắng chủng Wistar là 4,26mm, 3,15mm, 2,49mm. Trên hệ thống stereotaxic, tọa độ tiêm vào vùng CA1 hồi hải mã là AP = - (4,4 ± 0,8) mm; ML = ± (2,2 ± 0,2) mm; DV = - (3,1 ± 0,1) mm. Thực nghiệm tiêm 2,5µl NaCl 0,9% và tổn thương do lưu kim tiêm không thấy xuất huyết, thâm nhiễm viêm và động vật khỏe mạnh cho thấy đây là vị trí gây bệnh Alzheimer thực nghiệm an toàn, hiệu quả.

Tài liệu tham khảo

- Knierim JJ (2015) *The hippocampus*. Curr Biol 25(23): 1116-1121.
- Facchinetti R, Bronzuoli MR, & Scuderi C (2018) *An Animal Model of Alzheimer Disease Based on the Intrahippocampal Injection of Amyloid β -Peptide (1-42)*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 1727: 343-352.
- Arifin WN, Zahiruddin WM (2017) *Sample size calculation in animal studies using resource equation approach*. Malays J Med Sci 24(5): 101-105.
- Wang DL, Ling ZQ, Cao FY et al (2004) *Melatonin attenuates isoproterenol-induced protein kinase A overactivation and tau hyperphosphorylation in rat brain*. J Pineal Res 37(1): 11-16.
- Kjonigsen LJ, Leergaard TB, Witter MP et al (2011) *Digital atlas of anatomical subdivisions and boundaries of the rat hippocampal region*. Frontiers in neuroinformatics 5: 2.
- Chauhan P, Jethwa K, Rathawa A et al (2021) *The Anatomy of the Hippocampus*. Cerebral Ischemia.
- Tatu L, Vuillier F (2014) *Structure and vascularization of the human hippocampus*. Front Neurol Neurosci 34: 18-25.
- Rao YL, Ganaraja B, Murlimanju BV et al (2022) *Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: A review*. Biotech 12(2):55.
- Yang P, Wang Z, Zhang Z et al (2018) *The extended application of The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates in rats of various body weight*. J Neurosci Methods 307: 60-69.
- Franklin & Paxinos (2007) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier, 3rd Edition.