

DOI: 10.58490/ctump.2024i77.2806

XÂY DỰNG MÔ HÌNH MÔ PHÒNG LO ÂU, TRẦM CẢM TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÔ LẬP

Võ Thuý An, Nguyễn Lan Thuý Ty*, Nguyễn Thị Linh Tuyền

Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

*Email: nlty@ctump.edu.vn

Ngày nhận bài: 17/5/2024

Ngày phản biện: 19/6/2024

Ngày duyệt đăng: 02/8/2024

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Cách ly xã hội ở chuột là một trong các biện pháp tạo tình trạng áp lực căng thẳng dưới sự thay đổi đặc tính sinh sống của loài; từ đó gây ra các biểu hiện tương tự rối loạn lo âu, trầm cảm. Xây dựng mô hình mô phỏng lo âu, trầm cảm trên chuột có thể phục vụ cho các nghiên cứu dược lý như đánh giá tác dụng của thuốc hoặc trị liệu mới. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xác định các điều kiện thiết lập mô hình mô phỏng lo âu, trầm cảm trên chuột nhắt và đánh giá tác dụng của mô hình. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Chuột nhắt Swiss albino, giống đực, 5 – 6 tuần tuổi, trọng lượng 20 ± 2 g được nuôi cô lập mỗi con riêng hoặc theo bầy 5 con một lồng. Các điều kiện môi trường nuôi nhốt khác đều tương đồng. Sau mỗi 7 ngày, thử nghiệm bơi gắng sức, treo đuôi và các thử nghiệm vận động trực quay, hoạt tính vận động tự nhiên được thực hiện. **Kết quả:** Sau 4 tuần cô lập, chuột có biểu hiện của trạng thái lo âu, trầm cảm với thời gian bất động tăng có ý nghĩa trong thử nghiệm bơi gắng sức và treo đuôi ở nhóm nuôi cô lập so với nhóm chứng. Sự giảm hoạt động vận động ở nhóm nuôi riêng biệt biểu hiện qua sự giảm thời gian bám trên trục quay và thời gian di chuyển ở máy đo hoạt tính vận động tự nhiên. Điều trị bằng diazepam cải thiện các biểu hiện này về trạng thái tương tự ở nhóm chứng. **Kết luận:** Nghiên cứu đã xây dựng thành công mô hình mô phỏng lo âu, trầm cảm trên chuột và tác dụng của mô hình được chứng minh khi điều trị với diazepam.

Từ khóa: Lo âu, trầm cảm, cô lập xã hội, cách ly, thử nghiệm hành vi.

ABSTRACT

ANXIETY AND DEPRESSION INDUCED BY SOCIAL ISOLATION IN MICE

Võ Thuý An, Nguyễn Lan Thuý Ty*, Nguyễn Thị Linh Tuyền

Can Tho University of Medicine and Pharmacy

Background: Social isolation is one of several methods used to induce anxious-depressive-like behavior in mice. However, the model is rarely used in domestic research due to lacking of information to establish such as conditions, isolation length of time and how to measure behavioral alterations. The model is valuable for preclinical experiments on evaluating the effectiveness of anxiety and depression treatment. **Objectives:** To determine the conditions, requirements and procedures to build an anxiety-depression model in mice and evaluate the function of the model. **Materials and methods:** Swiss albino male mice weighed 20 ± 2 g at 5 to 6 weeks old were kept in the same conditions of dietary, light-dark cycle, temperature and quiet background. In the isolated group, each mouse was caged separately, while the control group was put together as 5 mice per cage. Anxious-depressive-like behaviors as well as locomotor activities were assessed via some behavioral tests such as forced swimming test, tail-suspension test, rota-rod test and activity meter test at several time points (at the beginning and at every 7 days). **Results:** After four weeks, socially isolated (SI) mice showed significantly higher immobility time in the forced swimming test and in

*the tail suspension test compared to group-housed (GH) mice. Withdrawal from exploring and movement habit was also the sign of anxiety or depression status. The time spent on the rota-rod and the vertical and horizontal movements were reduced in the SI mice compared to the GH mice. Treating with diazepam ameliorated the anxious-depressive-like behavior in isolated mice after 7 and 14 days of treatment. **Conclusion:** In the study condition, mice that were isolated for at least 4 weeks manifested anxiety and depression signs. The effective treatment of diazepam in the socially isolated group suggested that the anxious-depressive-like behaviors were the subsequence of the stress induced by isolation, i.e. the anxious-depressive-like model was established successfully and could be applied in further preclinical studies.*

Keywords: Anxiety, depression, social isolation, behavioral test.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rối loạn lo âu, trầm cảm là một dạng rối loạn tâm lý thể hiện sự lo lắng và sợ hãi quá mức trước một tình huống xảy ra và không thể kiểm soát được [1]. Đây là loại rối loạn tâm thần phổ biến với ước tính tỷ lệ mắc rối loạn lo âu trên toàn cầu khoảng 4% dân số. Rối loạn lo âu thường kết hợp với các rối loạn phức tạp khác như rối loạn hành vi giấc ngủ, trầm cảm, ảnh hưởng đến các hoạt động hằng ngày và làm giảm chất lượng cuộc sống của con người [2].

Việc phát triển các thuốc điều trị lo âu, trầm cảm luôn được nghiên cứu, xu hướng hiện nay hướng tới các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên để giảm tác dụng phụ cũng như sự lệ thuộc thuốc. Pha thử nghiệm tiền lâm sàng là một trong các bước nghiên cứu quan trọng, đòi hỏi cần có các mô hình dược lý ổn định và tin cậy trên động vật. Có nhiều phương pháp tạo mô hình mô phỏng rối loạn lo âu, trầm cảm bằng cách gây áp lực căng thẳng như mô hình cách ly xã hội [3] hoặc mô hình gây stress bằng corticosterone [4]. Trong đó, nuôi cô lập là một trong những mô hình giúp mô phỏng được những dấu hiệu tương tự biểu hiện rối loạn lo âu, trầm cảm [5]. Tuy nhiên, mô hình này vẫn chưa được nghiên cứu và phát triển tại Việt Nam. Do đó, nhằm xây dựng được một mô hình thực nghiệm có giá trị trong nghiên cứu cũng như có khả năng áp dụng để đánh giá tác dụng chống trầm cảm, giải lo âu của các thuốc hoặc trị liệu mới, nghiên cứu được thực hiện với mục đích xác định các điều kiện nuôi, thời gian và các thử nghiệm đánh giá sự thay đổi hành vi nhằm xây dựng mô hình mô phỏng lo âu, trầm cảm trên chuột nhắt bằng phương pháp nuôi cô lập.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chuột nhắt trắng, giống đực, chủng Swiss albino, 5 – 6 tuần tuổi, trọng lượng trung bình 20 ± 2 g, cung cấp bởi Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- **Điều kiện tiến hành:** Chuột khoẻ mạnh, không có biểu hiện bất thường, được nuôi thích nghi 1 tuần trước khi tiến hành nghiên cứu. Chuột được cung cấp thức ăn, nước uống theo tiêu chuẩn nuôi động vật thực nghiệm. Điều kiện môi trường bao gồm: Nhiệt độ và độ ẩm theo điều kiện phòng nuôi và không thay đổi ở các nhóm, chu kỳ sáng tối là 12/12 giờ (chu kỳ sáng từ 7 giờ đến 19 giờ). Thời gian thử nghiệm trong ngày từ 8 giờ - 17 giờ. Tất cả các thí nghiệm đều được tiến hành trong phòng riêng biệt, yên tĩnh tại Đơn vị nghiên cứu động vật thực nghiệm của Trường Đại học Y Dược Cần Thơ.

Sau khi nuôi ổn định, mô hình gây stress được triển khai theo Watanabe và CS [3]. Chuột được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm: Nhóm chuột nuôi theo bầy 20 con, nhốt 5 con

trong lồng kích thước dài 264 cm x rộng 186 cm x cao 136 cm; nhóm chuột nuôi cách ly 10 con với mỗi chuột nhốt riêng biệt trong từng lồng kích thước dài 132 cm x rộng 93 cm x cao 68 cm. Chuột cách ly không thể tiếp xúc với nhau hoặc nhìn thấy môi trường bên ngoài lồng. Trong thời gian thực hiện mô hình, hạn chế tiếng ồn tối thiểu. Khi tiến hành các thử nghiệm hành vi, đặt chuột vào hộp vận chuyển và nhẹ nhàng đưa từng chuột sang phòng thực hiện và trả về lồng nuôi cũ sau khi kết thúc.

- **Đánh giá biểu hiện lo âu, trầm cảm và vận động:** Các thử nghiệm hành vi được tiến hành tại thời điểm ban đầu t_0 và sau 7, 14, 21, 28 ngày (tương ứng với thời điểm t_1 , t_2 , t_3 và t_4).

Thử nghiệm bơi gắng sức (Forced swimming Test – FST) theo mô tả của R. D. Porsolt và cộng sự [6]: Chuột được thả bơi tự do trong bể chứa bằng thủy tinh (cao 20 cm x Ø 10 cm) chứa nước có độ cao 10 cm, giữ ở nhiệt độ 25°C. Trong 6 phút, thời gian chuột bất động được ghi nhận.

Thử nghiệm treo đuôi (Tail suspension test – TST) theo mô tả của Steru [7]: Trong hộp cao 55 cm x rộng 15 cm x sâu 11,5 cm, chuột được kẹp đuôi treo lơ lửng vào thanh sắt đường kính 1cm, cách mặt sàn 20 – 25 cm. Thời gian bất động của chuột được ghi nhận trong 5 phút thử nghiệm. Trạng thái bất động trong hai thử nghiệm FST và TST được xác định khi chuột hoàn toàn không có chuyển động nào ngoài cử động hô hấp thông thường.

Thử nghiệm vận động trên trục quay (Rota-rod test) theo Shiotsuki H và cộng sự [8] Trong 2 phút đầu, chuột được đưa lên thanh quay với vận tốc cố định 4 vòng/phút để làm quen. Sau khi nghỉ 30 phút, tiến hành thử nghiệm với tốc độ tăng dần từ 4 – 40 vòng/phút trong 1 phút và ghi lại thời gian chuột bám trên thanh quay, tối đa 10 phút.

Đo hoạt tính vận động tự nhiên: Theo phương pháp của Obese và CS (2021) [9]. Chuột được thả vào buồng để làm quen với môi trường trong 1 phút. Sau 30 phút nghỉ, tiến hành thử nghiệm, thả lần lượt từng chuột vào buồng tại 1 vị trí cố định, ghi lại số lượt di chuyển ngang và số lượt di chuyển theo chiều dọc trong 2 phút.

Sau 28 ngày thực hiện cách ly, chọn ngẫu nhiên ½ số chuột trong nhóm nuôi cách ly và tiến hành điều trị bằng diazepam liều 2,4 mg/kg x 1 lần/ngày (PO). Tiếp tục thực hiện FST và TST sau 7 ngày và 14 ngày điều trị (tương ứng với thời điểm t_5 và t_6).

- **Phương pháp xử lý số liệu:** Kết quả trình bày dạng trung bình cộng \pm sai số chuẩn (Mean \pm SE). Dùng phép kiểm Two-way repeated ANOVA với phần mềm SPSS 26. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$.

2.3. Thiết bị và hoá chất thí nghiệm

Diazepam viên nén 5 mg, tên biệt dược Seduxen (của công ty Gedeon Richter, Hungary, số đăng ký VN-19162-15).

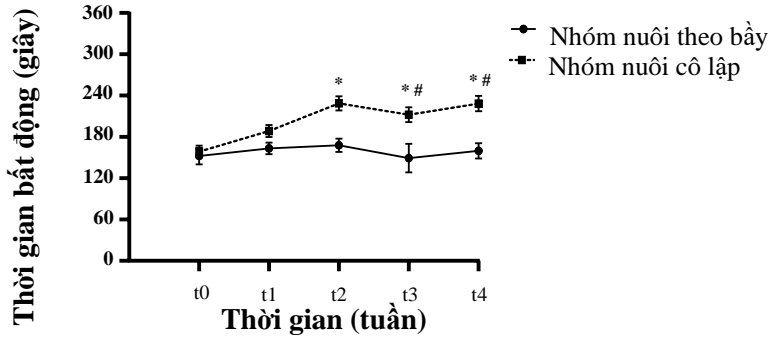
Thiết bị đo vận động trục quay Rotarod 7650 (hãng Ugo-Basile, Ý).

Máy đo hoạt tính vận động tự nhiên Activity Cage 47420 (hãng Ugo-Basile, Ý).

Dụng cụ bơi gắng sức, treo đuôi: như mô tả ở phương pháp nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

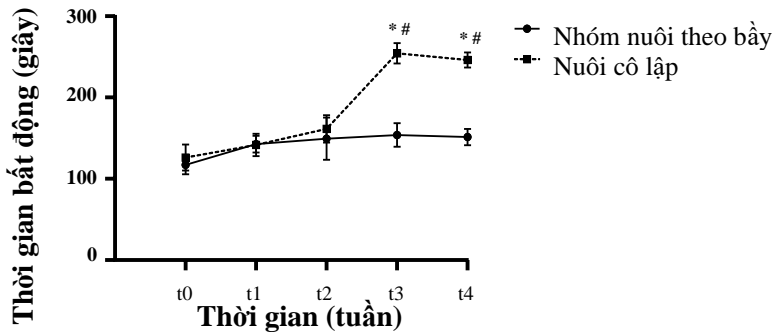
3.1. Thử nghiệm bơi gắng sức (Forced swimming Test – FST)



Hình 1. Ảnh hưởng của nuôi cô lập lên thời gian bất động của chuột ở mô hình bơi gắng sức

Nhận xét: Nuôi cô lập sau 4 tuần làm tăng hành vi lo âu trên động vật thí nghiệm, thể hiện thông qua tăng có ý nghĩa thời gian bất động của chuột ở nhóm nuôi cô lập so với nhóm nuôi theo bầy, tại thời điểm tương ứng ($p^* < 0,05$). Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở nhóm nuôi cô lập so với thời điểm ban đầu t₀ ($p^{\#} < 0,05$).

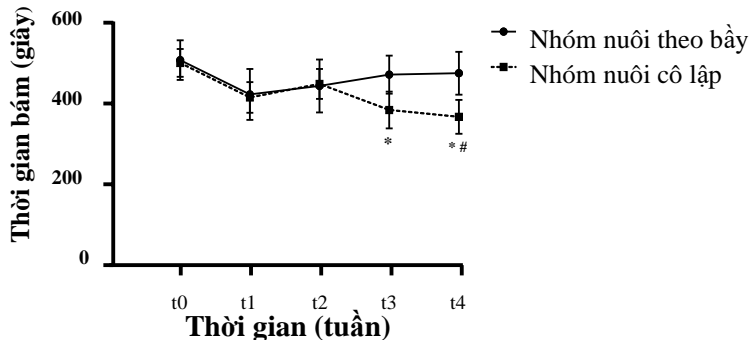
3.2. Thử nghiệm treo đuôi (Tail suspension test – TST)



Hình 2. Ảnh hưởng của nuôi cô lập lên thời gian bất động của chuột ở mô hình treo đuôi

Nhận xét: Từ tuần thứ 3 và tuần thứ 4 sau khi cách ly, thời gian bất động của chuột ở nhóm nuôi cô lập tăng có ý nghĩa so với nhóm nuôi theo bầy tại từng thời điểm tương ứng và so với chính nhóm này thời điểm ban đầu t₀ ($p^*, \# < 0,05$).

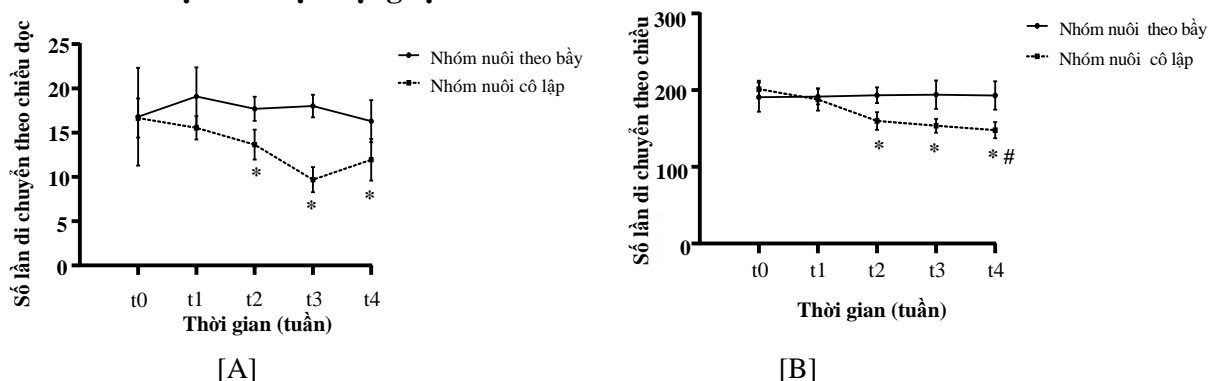
3.3. Thử nghiệm vận động trên trục quay (Rota-rod test)



Hình 3. Ảnh hưởng của nuôi cô lập lên thời gian chuột bám trên trục quay Rota-Rod

Nhận xét: Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về thời gian bám trên trục quay tại các thời điểm t_0, t_1, t_2, t_3 ở 2 nhóm nghiên cứu. Tuy nhiên, ở tuần thứ 4 sau cách ly (t_4), nhóm nuôi cô lập có thời gian bám trung bình $367,10 \pm 41,99$ giây, thấp hơn 1,29 lần so với nhóm nuôi theo bầy $475,30 \pm 53,09$ giây ($p^* < 0,05$).

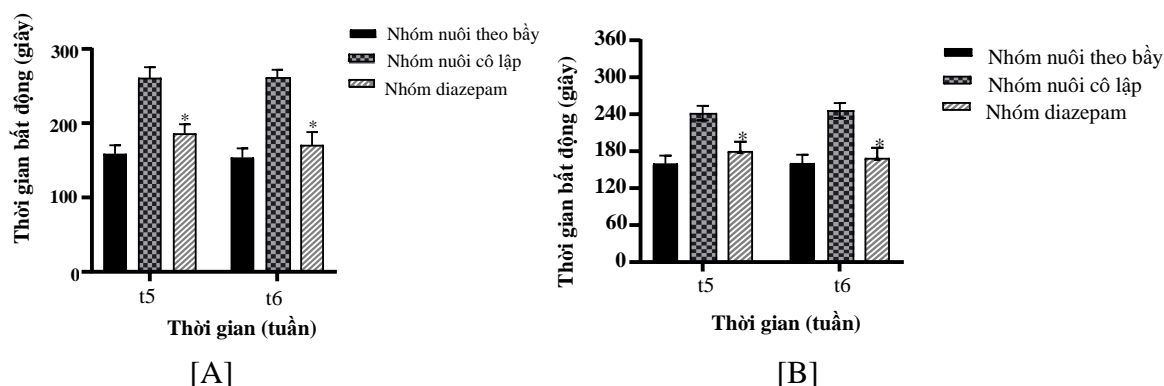
3.4. Đo hoạt tính vận động tự nhiên



Hình 4. Ảnh hưởng của nuôi cô lập lên [A] số lần đi chuyển theo chiều ngang và [B] số lần đi chuyển theo chiều dọc trên mô hình đo hoạt tính vận động tự nhiên

Nhận xét: Số lần đi chuyển theo chiều ngang và chiều dọc không có sự khác biệt giữa các thời điểm trong từng nhóm tương ứng. Tuy nhiên, kết quả này ở nhóm nuôi cô lập có sự giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm nuôi theo bầy ($p^* < 0,05$). Đồng thời, sự giảm số lần đi chuyển theo chiều ngang hoặc chiều dọc cũng có ý nghĩa tại các thời điểm tuần thứ 3 và tuần thứ 4 so với thời điểm ban đầu ở nhóm nuôi cô lập ($p^{\#} < 0,05$).

3.5. Đánh giá tác dụng gây lo âu-trầm cảm của mô hình



Hình 5. Tác dụng của diazepam lên thời gian bất động của chuột ở [A] thử nghiệm bơi găng sức và [B] thử nghiệm treo đuôi

Nhận xét: Sau khi điều trị với diazepam liều 2 mg/kg (PO), thời gian chuột bất động trong FST (Hình 5A) và TST (Hình 5B) giảm có ý nghĩa ở nhóm nuôi cô lập tại từng thời điểm tương ứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p^* < 0,05$). So với nhóm nuôi theo bầy, thời gian chuột bất động ở nhóm điều trị không có sự khác biệt, cho thấy tác dụng giải lo âu – trầm cảm của diazepam.

IV. BÀN LUẬN

Mô hình mô phỏng lo âu, trầm cảm bằng phương pháp nuôi cô lập được triển khai trong nghiên cứu áp dụng theo phương pháp của Saki Watanabe [3]. Nghiên cứu đã xác định được các điều kiện xây dựng mô hình mô phỏng lo âu, trầm cảm trên chuột nhắt trắng bằng phương pháp nuôi cô lập trong ít nhất 4 tuần và các điều kiện nuôi nhốt, chăm sóc và thực hiện thử nghiệm như mô tả ở phần phương pháp nghiên cứu. Thời gian và tần suất điều trị cũng có thể được điều chỉnh để phù hợp với nhu cầu hoặc mục đích thử nghiệm. Tuy nhiên, không nên giảm thời gian cách ly dưới 4 tuần nhằm đảm bảo các biểu hiện giống lo âu-trầm cảm ở nhóm cô lập có sự khác biệt ý nghĩa so với nhóm chứng nuôi theo bầy.

Mô hình nuôi cách ly chuột thể hiện một số ưu điểm hơn các mô hình gây lo âu khác bằng corticosterone hoặc lipopolysaccharides (LPS) [10], [11] như không can thiệp, ít tổn kém về hóa chất thử nghiệm, giảm nguy cơ mất mẫu do đáp ứng quá mức với sự can thiệp hoặc hóa chất có thể dẫn đến tử vong. Tuy nhiên, nhược điểm của mô hình là thời gian và không gian thực hiện: cần ít nhất 4 tuần mới xây dựng được mô hình, và điều kiện phòng nuôi nhốt cần rộng để cách ly riêng biệt từng cá thể. Ngoài ra, cần đảm bảo các điều kiện khác tương đồng ở từng cá thể cách ly để giảm các sai số.

Gây stress bằng phương pháp nuôi cô lập đã chứng minh được khả năng gây lo âu trên chuột nhắt hoặc chuột cống trắng và được sử dụng như một mô hình thực nghiệm của bệnh lý rối loạn lo âu [12]. Để kiểm tra tác dụng của mô hình, nghiên cứu này thực hiện đánh giá so sánh sự thay đổi hành vi liên quan đến tình trạng lo âu-trầm cảm giữa nhóm chuột nuôi theo bầy (nhóm chứng) và nhóm chuột nuôi cô lập (nhóm bệnh). Bằng các thử nghiệm đánh giá hành vi tuyệt vọng như thử nghiệm treo đuôi (TST) hoặc thử nghiệm bơi gắng sức (FST), thời gian chuột bất động tăng chứng tỏ biểu hiện lo âu, căng thẳng. Nghiên cứu đã cho thấy biểu hiện giống lo âu-trầm cảm đã xuất hiện ở nhóm chuột nuôi cô lập sau 4 tuần tương ứng với sự tăng thời gian bất động trong hai thử nghiệm trên. Ở nhóm nuôi nhốt theo bầy, thời gian bất động không có sự thay đổi trong suốt 4 tuần so với thời điểm ban đầu, chứng tỏ khi đảm bảo điều kiện sinh sống theo tập tính loài sẽ không gây ra stress ở chuột. Để chứng minh chặt chẽ hơn, trị liệu tiêu chuẩn giải lo âu-trầm cảm với diazepam được sử dụng cho ½ số chuột nuôi cô lập sau 4 tuần. Sau khi điều trị, hành vi giống lo âu-trầm cảm của chuột được cải thiện và có biểu hiện tương tự nhóm không cách ly tương ứng với sự giảm thời gian bất động ở nhóm điều trị diazepam so với nhóm không điều trị; đồng thời không có sự khác biệt ở nhóm diazepam so với nhóm chứng.

Ngoài ra, nghiên cứu còn đánh giá vận động của chuột trên mô hình Rota-Rod và đo hoạt tính vận động tự nhiên. Kết quả cho thấy ở nhóm chuột nuôi cách ly có thời gian bám trên trục quay giảm và giảm hoạt động tự nhiên như di chuyển theo chiều dọc, chiều ngang. Sự giảm hành vi vận động ở chuột tương tự như sự rút khỏi các hoạt động và tương tác xã hội ở người mắc rối loạn lo âu – trầm cảm. Qua các kết quả thực nghiệm đã khẳng định sự áp lực bằng nuôi cách ly liên tục trong 4 tuần trên chuột đã tạo được trạng thái mô phỏng rối loạn lo âu-trầm cảm. Xây dựng mô hình mô phỏng lo âu-trầm cảm bằng phương pháp mô tả trong nghiên cứu này có thể được sử dụng trong các thử nghiệm dược lý tiền lâm sàng.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được các điều kiện xây dựng mô hình mô phỏng lo âu, trầm cảm trên chuột nhắt trắng bằng phương pháp nuôi cô lập trong ít nhất 4 tuần. Tác dụng của mô hình được xác định khi áp dụng điều trị với diazepam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5th edition: DSM-5. American Psychiatric Publishing. 2013. 189-195.
2. World Health Organization. Anxiety disorders. Accessed April 25, 2024. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/anxiety-disorders>.
3. Watanabe, S., Al Omran, A., Shao, A. S., & Liang, J. Social Isolation Model: A Noninvasive Rodent Model of Stress and Anxiety. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2022. (189), e64567, doi:10.3791/64567.
4. Lim, D. W., Yoo, G., & Lee, C. Dried Loquat Fruit Extract Containing Chlorogenic Acid Prevents Depressive-like Behaviors Induced by Repeated Corticosteroid Injections in Mice. *Molecules*. 2023. 28(14), 5612, <https://doi.org/10.3390/molecules28145612>.
5. Magalhães, D. M., Mampay, M., Sebastião, A. M., Sheridan, G. K., & Valente, C. A. Age-related impact of social isolation in mice: Young vs middle-aged. *Neurochemistry International*. 2024. 174, 105678, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105678>.
6. Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N., & Jalfre, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European journal of pharmacology*. 1978. 47(4), 379-391, [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90118-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90118-8).
7. Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*. 1985. 85, 367-370, doi: 10.1007/BF00428203.
8. Shiotsuki, H., Yoshimi, K., Shimo, Y., Funayama, M., Takamatsu, Y., Ikeda, K., ... & Hattori, N. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *Journal of neuroscience methods*. 2010. 189(2), 180-185, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.026>.
9. Obese, E., Ameyaw, E. O., Biney, R. P., Adakudugu, E. A., & Woode, E. Neuropharmacological assessment of the hydroethanolic leaf extract of *Calotropis procera* (Ait). R. Br.(Apocynaceae) in mice. *Scientifica*. 2021. 2021, 10, <https://doi.org/10.1155/2021/5551380>.
10. Liu, W. Z., Zhang, W. H., Zheng, Z. H., Zou, J. X., Liu, X. X., Huang, S. H., ... & Pan, B. X. Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety. *Nature communications*. 2020. 11(1), 2221, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15920-7>.
11. Zheng, Z. H., Tu, J. L., Li, X. H., Hua, Q., Liu, W. Z., Liu, Y., ... & Zhang, W. H. Neuroinflammation induces anxiety-and depressive-like behavior by modulating neuronal plasticity in the basolateral amygdala. *Brain, behavior, and immunity*. 2021. 91, 505-518, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.007>.
12. Matsumoto, K., Pinna, G., Puia, G., Guidotti, A., & Costa, E. Social isolation stress-induced aggression in mice: a model to study the pharmacology of neurosteroidogenesis. *Stress*. 2005. 8(2), 85-93, <https://doi.org/10.1080/10253890500159022>.