

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

----- oOo -----



NGÔ VĂN TUẤN

**“NGHIÊN CỨU SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA CHÌ (Pb) ĐỐI VỚI
QUÁ TRÌNH PHÁT TRIỂN CỦA CÁ NGỰA VẼN
(*Danio rerio*)”**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH THÁI HỌC

Hà Nội, tháng 5/2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

----- oOo -----

NGÔ VĂN TUẤN

**“NGHIÊN CỨU SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA CHÌ (Pb) ĐỐI
VỚI QUÁ TRÌNH PHÁT TRIỂN CỦA CÁ NGỰA VẼN
(*Danio rerio*)”**

Chuyên ngành đào tạo : Sinh thái học

Mã số : 9 42 01 20

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH THÁI HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS.TS Nguyễn Thị Nga

Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

2. PGS.TS Nguyễn Thị Phương Thảo

Viện Sinh học Nhiệt đới

Hà Nội, tháng 5/2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án Tiến sĩ “Nghiên cứu sự ảnh hưởng chì (Pb) đối với quá trình phát triển của cá ngựa vằn (*Danio rerio*)” là công trình nghiên cứu của tôi với sự hướng dẫn khoa học của PGS.TS Nguyễn Thị Nga và PGS.TS Nguyễn Thị Phương Thảo.

Các số liệu và tài liệu trong luận án là trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ nghiên cứu nào trừ các bài báo tác giả liệt kê trong phụ lục. Tất cả những tham khảo và kế thừa đều được trích dẫn, tham chiếu đầy đủ.

Nghiên cứu sinh



Ngô Văn Tuấn

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc đến:

- PGS.TS Nguyễn Thị Nga và PGS.TS Nguyễn Thị Phương Thảo, người đã luôn hỗ trợ, động viên, khích lệ và hướng dẫn tôi tận tình trong suốt thời gian khi tôi bắt đầu nghiên cứu đến khi hoàn thành luận án.

- Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng đã tài trợ một phần kinh phí trong quá trình thực hiện luận án này.

- Phân Viện điều tra quy hoạch rừng Nam Trung Bộ và Tây Nguyên – Viện Điều tra quy hoạch rừng đã hỗ trợ một phần kinh phí và thời gian cho tôi hoàn thành luận án.

- Học Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thiện luận án.

- TS Lê Thành Long và anh, chị, em tại Phòng Công nghệ Sinh học động vật – Viện Sinh học nhiệt đới đã tận tình giúp đỡ, góp ý về chuyên môn cho tôi từ những ngày đầu tiên tôi bắt đầu nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến những người thân yêu trong gia đình đã luôn ở bên cạnh động viên, hỗ trợ và giúp đỡ tôi vững bước trong cuộc sống, phấn đấu trong học tập và công tác. Xin cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp đã luôn quan tâm, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt quá trình học tập.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 22 tháng 5 năm 2023



Ngô Văn Tuấn

MỤC LỤC

	Trang
LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH, ĐỒ THỊ	viii
TÓM TẮT	x
ABSTRACT	xi
MỞ ĐẦU	1
1. Giới thiệu	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
2.1. Mục tiêu tổng quát	2
2.2. Mục tiêu cụ thể	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
3.1. Xác định sự ảnh hưởng nồng độ chì (Pb^{2+}) lên sự phát triển lên phôi, ấu trùng cá ngựa vằn.	3
3.2. Xác định hàm lượng tích tụ chì (Pb^{2+}) trong cơ quan phát triển của cá ngựa vằn.	3
3.3. Xác định ảnh hưởng chì (Pb^{2+}) lên cấu trúc mô ruột và mô buồng trứng của cá ngựa vằn.	3
3.4. Xác định sự thay đổi biểu hiện các gen đáp ứng với chì (Pb^{2+}) và các gen kiểm soát tổn thương của cá ngựa vằn.	3
4. Ý nghĩa của đề tài	3
4.1. Ý nghĩa khoa học	3
4.2. Ý nghĩa thực tiễn	3
5. Những đóng góp mới của luận án	3
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. Tổng quan về chì (Pb^{2+})	5
1.1.1. Nguồn gốc của kim loại nặng	5
1.1.2. Định nghĩa về chì	6
1.1.3. Tác động của chì (Pb^{2+}) đến môi trường	7
1.1.4. Tác động của chì (Pb^{2+}) đến con người	8

1.1.5.Ảnh hưởng của kim loại nặng đến cá ngựa vằn.....	25
1.1.6.Các con đường tích lũy của chì (Pb^{2+}) trong cá	30
1.2.Tổng quan về cá ngựa vằn	31
1.2.1.Nhận biết giới tính.....	31
1.2.2.Sử dụng động vật thí nghiệm trong khảo sát độc tố.....	33
1.2.3.Tại sao sử dụng cá ngựa vằn trong khảo sát độc tố	34
1.3.Đánh giá mức độ biểu hiện các gen liên quan đến quá trình apoptosis	38
1.4.Lý do chọn đề tài.....	42
CHƯƠNG II. ĐỊA ĐIỂM, THỜI GIAN, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	44
2.1.Địa điểm:	44
2.2.Thời gian :	44
2.3.Đối tượng nghiên cứu.....	44
2.3.1.Cá	44
2.3.2. Giai đoạn Blastula – khoảng 3hpf.....	45
2.3.3. Giai đoạn Gastrula – khoảng 5hpf	45
2.3.4. Quá trình hình thành cơ quan.....	45
2.3.5. Giai đoạn ấu trùng sớm	47
2.3.6. Giai đoạn trưởng thành	47
2.3.7 Kim loại.....	48
2.3.8 Phạm vi nghiên cứu.....	48
2.4.Phương pháp nghiên cứu.....	48
2.4.1.Quy trình nghiên cứu	48
2.4.2.Thiết kế thí nghiệm độc tính	51
2.4.3.Phương pháp nuôi cá.....	51
2.4.4.Đánh giá ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên tỷ lệ phát triển phôi cá ở các giai đoạn khác nhau.....	52
2.4.5.Đánh giá ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên nhịp tim phôi cá ở các giai đoạn khác nhau	52
2.4.6.Xác định hàm lượng tích tụ chì (Pb^{2+}) trong cơ quan phát triển của cá.....	52
2.4.7.Đánh giá ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên cấu trúc mô ruột và mô buồng trứng .	55
2.4.8.Phương pháp tách chiết RNA.....	57
2.4.9.Phương pháp thống kê.....	60
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	61

3.1. Đánh giá ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên sự phát triển phôi cá ở các giai đoạn khác nhau.....	61
3.2.Đánh giá ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên nhịp tim phôi cá ở các giai đoạn khác nhau	67
3.3.Xác định hàm lượng tích tụ chì (Pb^{2+}) trong cơ quan phát triển của cá.....	70
3.4.Đánh giá ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên cấu trúc mô ruột.....	73
3.5.Đánh giá sự thay đổi biểu hiện các gen đáp ứng với chì (Pb^{2+}) và các gen kiểm soát tổn thương của cá ngựa vằn.....	77
3.5.1.Đánh giá sự thay đổi biểu hiện gen GADD45A và kiểm soát tổn thương	77
3.5.2.Đánh giá sự thay đổi biểu hiện gen GADD45G và kiểm soát tổn thương	79
3.5.3.Đánh giá sự thay đổi biểu hiện gen SOD1 và kiểm soát tổn thương.....	81
3.5.4.Đánh giá sự thay đổi biểu hiện gen SOD2 và kiểm soát tổn thương.....	83
3.5.5.Đánh giá sự thay đổi biểu hiện gen MT2 và kiểm soát tổn thương.	84
CHƯƠNG IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	87
4.1. Kết luận	87
4.2. Kiến nghị.....	87
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	90

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ALT	Alanin aminotransferase	Chỉ số xét nghiệm gan
AST	Aspartate aminotransferase	Chỉ số xét nghiệm gan
BBB	Blood-brain barrier	Tế bào ngăn chặn chất lạ vào cơ thể
BYT	Ministry of Health	Bộ y tế
ĐC	Contrast	Đối chứng
DNA	Deoxyribonucleic acid	DNA chứa thông tin di truyền
EC ₅₀	Ecotoxicology ₅₀	Nồng độ hiệu quả gây chết 50%
ECETOC	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals	Trung tâm Nghiên cứu Chất độc Sinh thái và Chất độc của Hóa chất Châu Âu
ECOTOX	Ecotoxicology	Độc học sinh thái
FSH	Follicle stimulating hormone	Hormone sinh dục
GI	Digestive system	Hệ thống tiêu hóa
GPx	Peroxidase	Nhóm kháng thể kháng enzyme peroxidase
GRP78	Production of glucose-regulating protein 78	Nhóm protein điều hòa glucose
GSH	Glutathione	Chất được sản xuất tự nhiên Glutathione
GSI	Gonadosomatic index	Chỉ số gonadosomatic
GSSG	Oxidized GSH dismutase	Chất chống oxy hóa và bảo vệ gan
Hb	Hemoglobin	Huyết sắc tố
HIS	Liver index	Chỉ số gan
JNTK	C-Jun N-terminal kinase	Enzyme kinase thuộc họ mitogen-activated protein kinase (MAPK)
LC ₅₀	Median lethal concentration ₅₀	Chỉ nồng độ của một chất độc có thể làm chết 50 % số động vật thí nghiệm

LH	Plasma	Huyết tương
MAPKs	Mitogen-activated protein kinases	Protein kinase được kích hoạt bằng mitogen
MS	Organic matter CH ₃ SO ₃ H or CSO ₃ H ₄	Chất hữu cơ CH ₃ SO ₃ H hoặc CSO ₃ H ₄
Na ⁺ /K ⁺	Ion Natri/ ion Kali	Ion natri và ion kali
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế
P53	Tumor protein P53	Protein khối u P53
Pb ²⁺	Lead ions	Ion chì
Ppm	Parts per milion	Đơn vị đo ppm
QCVN	Vietnam National Technical Regulation	Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia Việt Nam
ROS	Reactive oxygen species	Tình trạng oxy hóa
SGR	Mature growth rate	Tốc độ tăng trưởng
SOD	Superoxide dismutase	Enzym chống oxy hóa SOD
US EPA	United States Environmental Protection Agency	Cơ quan Bảo vệ Môi trường Mỹ
WBCs	White blood cell count	Chỉ số kiểm tra bệnh bạch cầu
WHO	World Health Organization	Tổ chức y tế Thế Giới
ZPP	Protoporphyrin	Tiền chất của hemoglobin có chứa sắt

DANH MỤC CÁC HÌNH, ĐỒ THỊ

<i>Hình 1.1.</i> Hình ảnh phân loại cá qua bụng.....	31
<i>Hình 1.2.</i> Hình ảnh phân biệt cá quá màu sắc.....	32
<i>Hình 1.3.</i> Xác định giới tính cá thông qua lỗ sinh dục.....	32
<i>Hình 1.4.</i> Phân biệt cá ngựa vằn giới tính cá trưởng thành	33
<i>Hình 2.1.</i> Phôi cá ngựa vằn giai đoạn blastula	45
<i>Hình 2.2.</i> Các cơ quan trong cơ thể cá ngựa vằn	46
<i>Hình 2.3.</i> Miệng phát triển và bắt đầu hình thành sắc tố	47
<i>Hình 2.4.</i> Sơ đồ quy trình nghiên cứu ảnh hưởng đến giai đoạn phôi, ấu	49
<i>Hình 2.5.</i> Sơ đồ xác định hàm lượng tích tụ ion chì trong cơ thể cá và ảnh hưởng đến cấu trúc mô	50
<i>Hình 2.6.</i> Sơ đồ bố trí thí nghiệm	51
<i>Hình 2.7.</i> Mổ cá thu nhận mẫu ruột và buồng trứng để cắt lớp mô	55
<i>Hình 3.1.</i> Hình thái của phôi cá ngựa vằn	61
<i>Hình 3.2.</i> Ấu trùng phát triển bất thường khi nhiễm chì (Pb^{2+}).	62
<i>Hình 3.3.</i> Thể hiện tỷ lệ % phôi sống giai đoạn 22 – 24h	62
<i>Hình 3.4.</i> Tỷ lệ phôi sống qua các nồng độ chì (Pb^{2+}) gây nhiễm trong 22 - 24h	63
<i>Hình 3.5.</i> Thể hiện tỷ lệ % phôi sống giai đoạn 48h.....	63
<i>Hình 3.6.</i> Tỷ lệ phôi sống qua các nồng độ chì (Pb^{2+}) gây nhiễm trong 48h.....	64
<i>Hình 3.7.</i> Thể hiện tỷ lệ % phôi sống giai đoạn 72h.....	64
<i>Hình 3.8.</i> Tỷ lệ phôi sống qua các nồng độ chì (Pb^{2+}) gây nhiễm trong 72h.	65
<i>Hình 3.9.</i> Thể hiện tỷ lệ % phôi sống giai đoạn 168h.....	65
<i>Hình 3.10.</i> Tỷ lệ phôi sống qua các nồng độ chì (Pb^{2+}) gây nhiễm trong 168h.....	66
<i>Hình 3.11.</i> Ấu trùng cá ngựa vằn cho thấy sự phù màng tim bất thường sau khi nhiễm độc chì.	68
<i>Hình 3.12.</i> Biểu đồ thể hiện nhịp tim của phôi cá ngựa vằn tại các nồng độ chì (Pb^{2+}) được thực nghiệm ở giai đoạn 48h và 72h.	68
<i>Hình 3.13.</i> Lượng Pb^{2+} tích tụ trong nội quan cá ngựa vằn.	70
<i>Hình 3.14.</i> Biểu đồ lượng Pb^{2+} tích tụ trong cơ và xương cá ngựa vằn.	71
<i>Hình 3.15.</i> Mổ cá thu nhận mẫu ruột và buồng trứng để cắt lớp mô	73

<i>Hình 3.16.</i> Thể hiện sự ảnh hưởng của các nồng độ Pb^{2+} cảm ứng lên ruột của cá ngựa vằn.	74
<i>Hình 3.17.</i> Hình cấu trúc ruột của cá ngựa vằn bằng phương pháp nhuộm HE	74
<i>Hình 3.18.</i> Thể hiện sự ảnh hưởng của các nồng độ Pb^{2+} cảm ứng chỉ lên buồng trứng của cá ngựa vằn.	75
<i>Hình 3.19.</i> Hình cấu trúc tế bào trứng của cá ngựa vằn bằng phương pháp nhuộm HE Thanh tỷ lệ $100\mu m$	75
<i>Hình 3.20.</i> Sự thay đổi mRNA của gen GADD45A giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm.	78
<i>Hình 3.21.</i> Sự thay đổi mRNA của gen GADD45A giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm.	78
<i>Hình 3.22.</i> Sự thay đổi mRNA của gen SOD1 giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm	79
<i>Hình 3.23.</i> Sự thay đổi mRNA của gen SOD1 giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm	80
<i>Hình 3.24.</i> Sự thay đổi mRNA của gen SOD2 giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm.	81
<i>Hình 3.25.</i> Sự thay đổi mRNA của gen SOD2 giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm.	82
<i>Hình 3.26.</i> Sự thay đổi mRNA của gen GADD45G giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm.	83
<i>Hình 3.27.</i> Sự thay đổi mRNA của gen GADD45G giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm.	83
<i>Hình 3.28.</i> Sự thay đổi mRNA của gen MT2 giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm.	85
<i>Hình 3.29.</i> Sự thay đổi mRNA của gen MT2 giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm.	85

TÓM TẮT

Nghiên cứu ảnh hưởng của chì (Pb) đối với quá trình phát triển của cá ngựa vằn (*Danio rerio*) đã được thực hiện bằng cách sử dụng các nồng độ chì khác nhau, bao gồm 0,1µg/L, 1µg/L, 10µg/L, 20µg/L, 100µg/L và đối chứng. Nghiên cứu này nhằm đánh giá tác động của chì (Pb²⁺) lên quá trình phát triển của cá ngựa ở giai đoạn 24h, 48h, 72h và 168h đến tỷ lệ phôi sống, nhịp tim, hàm lượng chì (Pb²⁺) trong cơ thể, ảnh hưởng lên mô ruột và buồng trứng, và sự thay đổi biểu hiện gen.

Phương pháp nghiên cứu bao gồm định lượng và phân tích thống kê để đánh giá sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm. Kết quả cho thấy rằng tất cả các nồng độ chì (Pb²⁺) đều gây ảnh hưởng đến tỷ lệ phôi sống và nhịp tim của cá ngựa vằn, trong đó nồng độ 100µg/L gây ảnh hưởng nhiều nhất. Lượng chì (Pb²⁺) trong cơ thể cá ngựa vằn có xu hướng tăng khi nồng độ tăng, với lượng chì (Pb²⁺) tích tụ cao nhất ở nồng độ 100µg/L. Chì (Pb²⁺) đã gây tổn thương cho mô ruột và buồng trứng của cá ngựa vằn, mức độ tổn thương tỷ lệ thuận với nồng độ thí nghiệm. Mức độ biểu hiện gen và kiểm soát tổn thương GADD45A, SOD1, SOD2, GADD45G, MT2 có sự thay đổi, sự thay đổi biểu hiện gen thể hiện qua thời gian. Sự phơi nhiễm với chì (Pb²⁺) làm thay đổi sự biểu hiện mức phiên mã của các gen GADD45A, GADD45G, SOD1, SOD2, MT2. Real time RT-PCR đã cho thấy được sự sai lệch gen trong quá trình hấp thụ chì (Pb²⁺) của cá ngựa vằn ở giai đoạn 24h và 168h.

ABSTRACT

The study aimed to investigate the influence of lead (Pb) on the developmental process of zebrafish (*Danio rerio*) using different concentrations of Pb, including 0.1µg/L, 1µg/L, 10µg/L, 20µg/L, 100µg/L, and a control group. The study evaluated the effects of Pb²⁺ on zebrafish development at 24h, 48h, 72h, and 168h in terms of survival rate, heart rate, Pb²⁺ concentration in the body, impact on intestinal and ovarian tissues, and changes in gene expression.

The research method included quantitative and statistical analysis to evaluate the differences between the experimental groups. The results showed that all concentrations of lead (Pb²⁺) had an impact on the survival rate and heart rate of zebrafish, with the highest impact observed at a concentration of 100µg/L. The lead (Pb²⁺) content in the body of zebrafish tended to increase with increasing concentration, with the highest lead (Pb²⁺) accumulation observed at a concentration of 100µg/L. Lead (Pb²⁺) caused damage to the intestinal and ovarian tissues of zebrafish, with the degree of damage proportional to the experimental concentration. The level of gene expression and control of damage, including *GADD45A*, *SOD1*, *SOD2*, *GADD45G* and *MT2* changed over time. Exposure to lead (Pb²⁺) caused changes in the expression of *GADD45A*, *GADD45G*, *SOD1*, *SOD2* and *MT2* genes. Real-time RT-PCR showed gene aberrations in the absorption process of lead (Pb²⁺) by zebrafish at 24h and 168h stages.

MỞ ĐẦU

1. Giới thiệu

Hiện nay sự gia tăng dân số cùng với sự phát triển nhanh chóng của ngành công nghiệp làm gia tăng chất thải ra môi trường và chúng có thể tác động nguy hại lên sức khỏe của các sinh vật. Trong đó, ô nhiễm kim loại nặng được coi là một vấn đề cấp bách, đòi hỏi sự quan tâm của cộng đồng.

Kim loại nặng thải ra từ nước thải sinh hoạt, công nghiệp, khai thác mỏ và nông nghiệp đã làm cho môi trường bị ô nhiễm, trong đó hệ thống sông ngòi là nơi dễ bị tổn thương nhất. Ô nhiễm kim loại nặng có thể gây ra những ảnh hưởng đáng lo ngại đến cân bằng sinh thái và sự đa dạng của các sinh vật dưới nước. Trong số các loài động vật thủy sinh, cá là đối tượng không thể tránh khỏi tác động bất lợi của các chất ô nhiễm kim loại nặng này. Tác động của kim loại, cũng như các chất ô nhiễm khác, đối với hệ sinh vật thủy sinh có thể được đánh giá bằng thử nghiệm độc tính, được sử dụng để phát hiện và đánh giá tác động độc hại tiềm ẩn của hóa chất đối với sinh vật thủy sinh. Chì là một kim loại nặng thường được sử dụng trong các hoạt động sản xuất công nghiệp khác nhau. Chì độc hại đối với các hệ thống sống và có thể tồn tại trong môi trường trong một thời gian dài, dựa vào tính chất hóa học chì tồn tại như một kim loại tự do trong các hợp chất khác nhau. Việc nghiên cứu tác động của chì (Pb^{2+}) lên sự sống sinh vật có thể sử dụng nhiều mô hình *in vivo* hoặc *in vitro*. Tuy nhiên để đánh giá tác động ảnh hưởng một cách toàn diện, mô hình *in vivo* có nhiều ưu điểm hơn và một trong những mô hình phổ biến để đánh giá tác động của chì (Pb^{2+}) đó chính là mô hình cá ngựa vằn (*Danio rerio*) [1].

Một câu hỏi được đặt ra đó là vì sao cá ngựa vằn được sử dụng như là một mô hình nghiên cứu độc chất môi trường? Cá ngựa vằn từ lâu đã được chứng minh là mô hình phù hợp về sự phát triển của động vật có xương sống và về tiến trình bệnh, thậm chí là giúp làm sáng tỏ ảnh hưởng gây bệnh còn bí ẩn ở một số bệnh như bệnh Alzheimer và chứng lão hóa sớm. Trong thực tế, mô hình cá ngựa vằn đã và đang được ứng dụng ở nhiều mảng nghiên cứu trong lĩnh vực độc chất học môi trường và việc sử dụng mô hình này ngày càng được sử dụng rộng rãi.

Ở Việt Nam, việc đánh giá tác động của chì (Pb^{2+}) lên động vật thủy sinh chủ yếu bằng các phương pháp hóa lý, đã có một ít công trình nghiên cứu nhưng chưa có sự đánh giá một cách toàn diện, sâu sắc lên sự phát triển của các động vật thủy sinh nhất là động vật có xương sống.

Để hiểu sâu hơn về ảnh hưởng tác động của Chì (Pb^{2+}) lên cá ngựa vằn cần có nhiều nghiên cứu về tác động của nó lên tất cả quá trình phát triển từ giai đoạn phôi cho đến cá trưởng thành, sự thay đổi cấu trúc gen, sự thay đổi của gan, hệ thống tuần hoàn, nhịp tim... từ đó rút ra ảnh hưởng tác động của Chì (Pb^{2+}) lên cơ thể con người. Nên tác giả đề xuất đề tài nghiên cứu là “Nghiên cứu sự ảnh hưởng chì (Pb^{2+}) đối với quá trình phát triển của cá ngựa vằn (*Danio rerio*)” là hết sức cấp thiết, có ý nghĩa về khoa học và thực tiễn cao nhằm cung cấp các cơ sở khoa học cho việc đánh giá ảnh hưởng kim loại nặng lên động vật thủy sinh, động vật có xương sống đặc biệt là con người. Đồng thời đó cũng là tiền đề sử dụng cá ngựa vằn như một sinh vật mô hình thử nghiệm, đánh giá độc học, tính kháng thuốc trong y khoa, sử dụng nghiên cứu trong y học.

2. Mục tiêu nghiên cứu

2.1. Mục tiêu tổng quát

Đánh giá ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên quá trình phát triển của cá ngựa vằn (*Danio rerio*) giai đoạn phôi, ấu trùng và cá trưởng thành thông qua những thay đổi về mặt hình thái học, mô học, mức độ biểu hiện gen.

2.2. Mục tiêu cụ thể

Để thực hiện mục tiêu tổng quát trên, tác giả đã tiến hành thực hiện các mục tiêu cụ thể sau:

Đánh giá sự ảnh hưởng nồng độ chì lên sự phát triển của phôi cá ngựa vằn và đồng thời xác định hàm lượng tích tụ chì (Pb^{2+}) trong cơ quan phát triển của cá ngựa vằn (*danio rerio*).

Đánh giá ảnh hưởng chì (Pb^{2+}) lên cấu trúc mô ruột và mô buồng trứng của cá ngựa vằn (*danio rerio*) dùng phương pháp thu nhận mẫu, cắt lát mô.

Đánh giá sự thay đổi biểu hiện các gen đáp ứng với chì (Pb^{2+}) và các gen kiểm soát tổn thương của cá ngựa vằn (*danio rerio*).

3. Nội dung nghiên cứu

- 3.1. Xác định sự ảnh hưởng nồng độ chì (Pb^{2+}) lên sự phát triển lên phôi, ấu trùng cá ngựa vằn.
- 3.2. Xác định hàm lượng tích tụ chì (Pb^{2+}) trong cơ quan phát triển của cá ngựa vằn.
- 3.3. Xác định ảnh hưởng chì (Pb^{2+}) lên cấu trúc mô ruột và mô buồng trứng của cá ngựa vằn.
- 3.4. Xác định sự thay đổi biểu hiện các gen đáp ứng với chì (Pb^{2+}) và các gen kiểm soát tổn thương của cá ngựa vằn.

4. Ý nghĩa của đề tài

4.1. Ý nghĩa khoa học

Kết quả đề tài cung cấp một số dữ liệu khoa học về ảnh hưởng tác động của chì (Pb^{2+}) đối với quá trình phát triển của cá ngựa vằn có ý nghĩa quan trọng trong việc hiểu được tác động của chì (Pb^{2+}) đến sinh sản và phát triển của động vật.

Nghiên cứu này sẽ giúp định lượng được mức độ tác động của chì đến quá trình phát triển của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn, bao gồm nội quan, cơ và xương.

Nghiên cứu này là cơ sở để đánh giá khả năng phơi nhiễm và khả năng chống chịu của cá ngựa vằn với chì (Pb^{2+}), từ đó có thể dùng cá ngựa vằn làm đối tượng để thử nghiệm các loại thuốc trong y học của động vật có xương sống và con người.

4.2. Ý nghĩa thực tiễn

Nghiên cứu này sử dụng cá ngựa vằn làm đối tượng để đánh giá sự ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) đối với môi trường sống và bảo vệ sức khỏe con người.

Luận án là tiền đề sử dụng cá ngựa vằn như một sinh vật mô hình thử nghiệm, đánh giá độc học, tính kháng thuốc trong y khoa, sử dụng nghiên cứu trong y học.

5. Những đóng góp mới của luận án

Luận án nghiên cứu đầy đủ có hệ thống chì (Pb^{2+}) ảnh hưởng đến một số đặc điểm sinh học trong giai đoạn phát triển của cá ngựa vằn. Lần đầu tiên có nghiên cứu ảnh hưởng chì (Pb^{2+}) đến mức độ phân tử của cá ngựa vằn.

Nghiên cứu này đóng góp mới về việc nghiên cứu tác động của chì (Pb^{2+}) lên sự phát triển của cá ngựa vằn, một loài cá được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu sinh học. Nó cung cấp thông tin mới về các cơ chế phản ứng sinh học và ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) đến các giai đoạn phát triển của cá và cung cấp cơ sở cho việc phát triển các phương pháp đánh giá rủi ro đối với sự phát triển của cá và các loài sinh vật khác trong môi trường bị ô nhiễm chì (Pb^{2+}).

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về chì (Pb^{2+})

1.1.1. Nguồn gốc của kim loại nặng

Kim loại nặng là một trong những thành phần tự nhiên của lớp vỏ trái đất, chúng tồn tại dưới nhiều dạng khác nhau như: dạng sunfua như sắt, arsen, chì, chì-kẽm, coban, vàng, bạc và niken; hoặc ở dạng oxit như nhôm, mangan, selen và antimon. Một số ít tồn tại dưới dạng sunfua và oxit như sắt, đồng và coban. Quặng khoáng sản có xu hướng tồn tại theo kiểu nhóm nguyên tố, theo đó kim loại tồn tại dạng sulfua sẽ chủ yếu ở cùng với nhau, tương tự như vậy đối với các oxit. Do đó, sunfua chì, cadimi, arsen và thủy ngân tự nhiên được tìm thấy cùng với sulfua sắt (pyrit, FeS_2) và đồng (chalcopyrit, $CuFeS_2$) [2]. Các kim loại trong đất sẽ đi trực tiếp vào môi trường nước thông qua sự phong hóa đá, sự bào mòn do nước, pH của môi trường nước thấp là nguyên nhân làm hòa tan một số kim loại nặng. Quá trình sản xuất công nông nghiệp góp phần gia tăng một lượng lớn hàm lượng kim loại nặng trong nước. Các loại phân bón, các loại hóa chất bảo vệ thực vật đặc biệt là phân lân có chứa các kim loại nặng như As, Pb, Hg. Hóa chất bảo vệ thực vật thường chứa nhiều kim loại nặng như: As, Pb, Hg. Một số loại thuốc như: Macozeb, $CuSO_4$, Zineb,... chứa các kim loại nặng như Mn, Cu, Zn. Thông qua hoạt động bón thuốc, phun thuốc làm tăng sự hiện diện kim loại nặng có mặt trong nước [3]. Quá trình đô thị hóa, công nghiệp hóa ngày càng phát triển một cách nhanh chóng làm cho môi trường nước ngày bị ô nhiễm bởi kim loại nặng [4].

Hiện nay, các ngành công nghiệp đa số đổ trực tiếp chất thải chưa qua xử lý vào môi trường, thành phần đặc trưng của các chất thải công nghiệp là kim loại nặng và độc tố. Theo kết quả quan trắc và phân tích môi trường ở các vùng nước ven biển gần các thị trấn và trung tâm công nghiệp thì hàm lượng đồng, chì, adimi và coban,... ở trung tâm công nghiệp lớn nhiều hơn so với mức tự nhiên của chúng trong nước biển. Hơn nữa, khí thải các nhà máy nhiệt điện, các lò hỏa táng, khí thải phương tiện giao thông chứa một lớn lượng kim loại đi vào môi trường không khí và sau đó là môi trường nước [2], [5]. Hoạt động khai thác khoáng sản cũng góp phần rất lớn vào việc thải các kim loại nặng vào môi trường nước [1], [6]. Nước thải ngành khai thác khoáng sản chứa một lượng lớn kim loại nặng, phần lớn thải ra môi trường không qua hệ thống xử lý nước thải.

1.1.2. Định nghĩa về chì

Chì ký hiệu là Pb, là một kim loại nặng và là một nguyên tố hóa học trong bảng tuần hoàn hóa học. Pb có hóa trị II và IV, chì (Pb^{2+}) thì bền vững trong các hợp chất hữu cơ và vô cơ. Tiếp xúc với môi trường có chì, chì (Pb^{2+}) có thể gây nhiễm độc cho người và sinh vật,... [7].

Nguồn gây ô nhiễm do hoạt động của con người như chì được sử dụng trong bình ắc quy, trong pin, một số loại dụng cụ dẫn điện, ngoài ra chì (Pb^{2+}) còn được dùng như một chất tạo màu, chất ổn định hay chất gắn kết, Xăng cũng được thêm chì (Pb^{2+}) ở những quốc gia đang phát triển đã làm tăng lượng kim loại độc hại vào môi trường sống [7].

Khi tiếp xúc chì (Pb^{2+}) ở mức độ nhất định, nó gây ra tổn thương hệ thần kinh và gây ra rối loạn não cho con người và động vật. Tiếp xúc với chì (Pb^{2+}) ở mức độ cao sẽ gây ra rối loạn máu ở động vật. Chì (Pb^{2+}) tích tụ trong mô mềm và trong xương [7].

Khả năng xâm nhập của chì (Pb^{2+}) vào cơ thể sinh vật sống trong nước phụ thuộc vào tính chất hoá học của môi trường nước (pH, độ cứng, thành phần anion của nước), các tính chất lý hoá của cặn lắng (thành phần khoáng, kích thước hạt rắn, độ rỗng của lớp cặn), thành phần hữu cơ trong nước, nồng độ và tính chất hoá lý của các chất rắn lơ lửng [8].

Khả năng tích lũy của chì (Pb^{2+}) phụ thuộc vào loài sinh vật [9], cấu tạo các cơ quan [10], nồng độ Pb^{2+} gây ô nhiễm môi trường,... Khả năng đào thải chì (Pb^{2+}) tùy thuộc vào cơ quan và thời gian đào thải. Khả năng đào thải nhanh nhất thuộc các mô mềm như ruột và thịt, khả năng đào thải chậm nhất thuộc về các mô cứng như vảy và xương [11]. Chì (Pb^{2+}) làm giảm sự trao đổi ion trong máu; độ hoạt động của enzym $Na^+ /K^+ ATPase$ trong mang giảm hơn nhóm đối chứng sau 6 h và hồi phục sau 96 h; hàm lượng cacbon hydrat cũng không thay đổi trong các nhóm cá ô nhiễm Pb^{2+} [12]. Chì (Pb^{2+}) được biết đến là một muối của kim loại nặng, một chất gây ô nhiễm môi trường nguy hiểm và gây ngộ độc cho con người và sinh vật. Nó còn gây ra sự thay đổi sinh lý như hệ thống miễn dịch, hệ thần kinh trung ương, thận, Vấn đề quan trọng nữa là chì (Pb^{2+}) có thể ảnh hưởng mạnh đến trí thông minh và sự phát triển của trẻ nhỏ [13].

Những công việc có liên quan đến chì như: nấu chảy, xây dựng, sản xuất hay sửa chữa những vật liệu có chứa chì (bình ắc quy, pin,...) là nguồn gây ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe của con người tại nơi làm việc.

1.1.3. Tác động của chì (Pb^{2+}) đến môi trường

Kim loại nặng thải ra từ nước thải sinh hoạt, công nghiệp, khai thác mỏ và nông nghiệp đã làm cho môi trường bị ô nhiễm, trong đó hệ thống sông ngòi là nơi dễ bị tổn thương nhất. Ô nhiễm kim loại nặng có thể gây ra những ảnh hưởng đáng lo ngại đến cân bằng sinh thái của môi trường tiếp nhận và sự đa dạng của các sinh vật dưới nước. Trong số các loài động vật, cá là đối tượng cư trú không thể tránh khỏi tác động bất lợi của các chất ô nhiễm này. Tác động của kim loại, cũng như các chất ô nhiễm khác, đối với hệ sinh vật thủy sinh có thể được đánh giá bằng thử nghiệm độc tính, được sử dụng để phát hiện và đánh giá tác động độc hại tiềm ẩn của hóa chất đối với sinh vật thủy sinh. Tuy nhiên, có rất ít nghiên cứu được thực hiện về tác động của ô nhiễm đối với các hệ sinh thái nhiệt đới. Cá được sử dụng rộng rãi để đánh giá sức khỏe của hệ sinh thái thủy sinh vì các chất ô nhiễm tích tụ trong chuỗi thức ăn và là nguyên nhân gây ra các tác động tiêu cực và tử vong trong hệ thống thủy sinh. Cá có thể thu nhận các nguyên tố vi lượng trực tiếp từ nước qua mang hoặc gián tiếp từ thức ăn qua đường ăn uống. Kim loại nặng đã được công nhận là chất độc sinh học mạnh vì bản chất dai dẳng, có xu hướng tích tụ trong sinh vật và trải qua quá trình khuếch đại chuỗi thức ăn, chúng cũng gây hại cho hệ động vật thủy sinh. Việc ô nhiễm nước ngọt với một loạt các chất ô nhiễm đã trở thành một vấn đề được quan tâm nhiều trong vài thập kỷ qua.

Chì là một kim loại bền thường được sử dụng trong các quy trình công nghiệp khác nhau. Chì độc hại đối với các hệ thống sống và có thể tồn tại trong môi trường một thời gian dài, nó tồn tại như một kim loại tự do trong các hợp chất khác nhau. Chì là một chất độc hại trong môi trường gây nguy hiểm cho con người và các hệ sinh thái. Sự tiếp xúc của ion chì với con người chủ yếu là qua đường ăn uống, qua đường miệng và hít phải khói và bụi trong khí quyển. Tiếp xúc với ion chì lâu dài ảnh hưởng đến trí não, suy giảm hệ miễn dịch,... [14].

Khả năng xâm nhập của chì (Pb^{2+}) vào cơ thể sinh vật sống trong nước phụ thuộc vào tính chất hoá học của môi trường nước (pH, độ cứng, thành phần anion

của nước), các tính chất lý hoá của cặn lắng (thành phần khoáng, kích thước hạt rắn, độ rỗng của lớp cặn), thành phần hữu cơ trong nước, nồng độ và tính chất hoá lý của các chất rắn lơ lửng [8].

1.1.4. Tác động của chì (Pb^{2+}) đến con người

Nguồn gây ô nhiễm do hoạt động của con người như: chì được sử dụng trong bình ắc quy, trong pin, một số loại dụng cụ dẫn điện, ngoài ra chì còn được dùng như một chất tạo màu, chất ổn định hay chất gắn kết,... Xăng cũng được thêm chì ở những quốc gia đang phát triển đã làm tăng lượng kim loại độc hại vào môi trường sống [15].

Chì được coi là một trong những chất ô nhiễm môi trường nguy hiểm nhất việc tích lũy ion chì làm ảnh hưởng đến tất cả các hệ thống sinh học khi tiếp xúc với không khí, nước và nguồn thực phẩm. Việc tiếp xúc với chì gây ra những thay đổi bệnh lý thông qua độc tính xảy ra trong hệ thống nội tiết và thận. Khi tiếp xúc chì ở mức độ nhất định, nó gây ra tổn thương hệ thần kinh và gây ra rối loạn não con người và động vật. Tiếp xúc với chì ở mức độ cao sẽ gây ra rối loạn máu ở động vật. Chì tích tụ trong mô mềm và trong xương [14].

Khả năng tích lũy của chì cũng phụ thuộc vào loài sinh vật [9], cấu tạo các cơ quan [10], nồng độ Pb gây ô nhiễm môi trường,... Khả năng đào thải chì tùy thuộc vào cơ quan và thời gian đào thải. Khả năng đào thải nhanh nhất thuộc các mô mềm như ruột và thịt, khả năng đào thải chậm nhất thuộc về các mô cứng như vẩy và xương [11]. Chì (Pb^{2+}) làm giảm sự trao đổi ion trong máu; độ hoạt động của enzym Na^+/K^+ 22 ATPase trong mang giảm hơn nhóm đối chứng sau 6h và hồi phục sau 96h; hàm lượng cacbon hydrat cũng không thay đổi trong các nhóm cá ô nhiễm Pb [12].

Con người bị nhiễm độc chì do môi trường và thực phẩm bị ô nhiễm. Nước uống và thực phẩm có tính axit sẽ hòa tan chì từ các dụng cụ lưu trữ. Trẻ em cũng có thể bị nhiễm độc chì từ đồ chơi, đồ trang sức và các bức tường của tòa nhà cũ. Mặc dù mức độ phơi nhiễm của trẻ em Nhật Bản đương đại thuộc hàng thấp nhất trên thế giới, người ta mong muốn giảm mức phơi nhiễm càng nhiều càng tốt một cách hợp lý do không có ngưỡng phơi nhiễm đối với các tác dụng phụ. Trong bài đánh giá này, thông tin về mức độ chì trong milieus của môi trường gần chúng ta,

chẳng hạn như khí quyển, nước uống, đất, bụi nhà, chế độ ăn uống và những thứ khác. Dữ liệu giám sát cho thấy nồng độ chì trong khí quyển và lượng chì từ việc tiêu thụ thực phẩm đã giảm đáng kể từ những năm 1970. Chì hầu như không được phát hiện trong nước máy trong một cuộc khảo sát giám sát toàn quốc gần đây. Ngược lại, nồng độ chì cao được phát hiện trong đất bề mặt và bụi nhà là một trong những nghiên cứu về mức độ phơi nhiễm hàng ngày với chì từ tất cả các nguồn tiềm năng và cả hai nguồn này đều được các tác giả coi là những yếu tố góp phần đáng kể vào việc phơi nhiễm chì đối với trẻ em Nhật Bản nói chung [16].

Chì (Pb^{2+}) ảnh hưởng đến nhiều quá trình sinh trưởng của tế bào và hệ thống enzym trên toàn cơ thể con người. Hầu hết các nghiên cứu về ngộ độc chì tập trung nhiều hơn vào tác động độc tính của nó đối với huyết học, tim mạch, thận và nhiễm độc thần kinh với trọng tâm là tác động thần kinh của ngộ độc chì. Tuy nhiên, các lĩnh vực quan tâm khác cũng rất phong phú từ nghiên cứu này [17]. Ở mức độ lý thuyết, ảnh hưởng của chì đối với hệ thống sinh sản của nam giới vẫn chưa được giải thích đầy đủ. Nhiều con đường có thể làm rõ việc tiếp xúc với chì có thể làm giảm khả năng sinh sản ở nam giới như thế nào. Ví dụ, nhiều đồng dạng kênh kali và canxi trong tinh trùng và tinh hoàn của con người có thể góp phần vào các hoạt động sớm hơn của phản ứng acrosome [18]. Hơn nữa, trong các cơ quan sinh sản của chuột tiếp xúc với chì, hoạt động của một số enzym, chẳng hạn như natri kali ATPase và phosphatase kiềm (ALP), đã được chứng minh là giảm [19]. Một vấn đề khác về độc tính sinh sản của chì có thể liên quan đến việc tạo ra quá nhiều ROS, một vấn đề gần đây đã được chú ý nhiều. Việc sản xuất chất chống oxy hóa sulfhydryl bị ức chế bởi ROS, làm hỏng axit nucleic, ức chế quá trình sửa chữa DNA và ức chế các phản ứng của enzyme, đồng thời cũng ức chế quá trình peroxy hóa lipid khởi đầu trong màng tế bào. Ứng suất oxy hóa được tạo ra bởi chì, khuyến khích tạo ra hydrogen peroxide [20]. Các tác động tiêu cực trên phạm vi rộng, do sự gia tăng nồng độ ROS trong các mô, được cho là một nguyên nhân gây rối loạn chính liên quan đến việc tiếp xúc với chì [21]. Một nghiên cứu dịch tễ học về hệ thống sinh sản nam giới đã chứng minh mối tương quan thuận giữa lượng chì trong huyết tương và mức ROS của tinh trùng [22]. Ngoài ra, sự gia tăng hoạt động của superoxide dismutase (*SOD*) đã được quan sát thấy ở những người tiếp xúc với chì

kéo dài và nó đề xuất một cơ chế làm tăng sản xuất ROS do tiếp xúc với chì [23]. Điều này có thể dẫn đến tổn thương tế bào oxy hóa trong các mô sinh sản có liên quan chặt chẽ đến việc sản xuất ROS. Ví dụ, nghiên cứu về tinh trùng của chuột trong điều kiện phơi nhiễm ROS trong ống nghiệm giảm tốc độ xâm nhập vào buồng trứng nguyên vẹn của zona và cho thấy phản ứng acrosome sớm [24]. Tuy nhiên, stress oxy hóa do chì có các phản ứng khác nhau từ liều thấp đến liều cao ở nhiều vị trí đích, ngoài tinh trùng [25]. Bằng chứng khác về những động vật đã tiếp xúc lâu dài với chì là sự gia tăng nồng độ lipid peroxide trong cơ quan sinh sản [26]. Do đó, một số nghiên cứu đã đề xuất rằng sự gia tăng sản xuất ROS do chì gây ra là một cơ chế phân tử quan trọng gây ra rối loạn sinh sản ở nam giới trong quá trình sinh tinh hoặc trong các giai đoạn nội tiết tố. ROS là sản phẩm phụ của nhiều phản ứng thoái hóa trong nhiều mô. Chúng sẽ ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất thường xuyên và làm hỏng các thành phần tế bào, vì phân tử này có một hoặc nhiều điện tử chưa ghép đôi, làm cho nó phản ứng cao với các phân tử khác. ROS có thể làm hỏng cấu trúc tế bào của carbohydrate, axit nucleic, lipid và protein, đồng thời làm thay đổi chức năng của chúng và phá hủy các tế bào sống. Sự thay đổi cân bằng giữa chất oxy hóa và chất chống oxy hóa có lợi cho chất oxy hóa được gọi là “stress oxy hóa” [27]. Khả năng sản xuất ROS của chì (Pb^{2+}) dẫn đến đứt sợi DNA và thay thế kẽm trong các protein liên kết DNA [28]. Do đó, gần đây người ta đã quan tâm đến vai trò và việc sử dụng các chất chống oxy hóa tự nhiên như trái cây và rau quả như một chiến lược để ngăn ngừa tổn thương oxy hóa trong các rối loạn sức khỏe khác nhau do stress oxy hóa [29]. Tác động độc tính của chì axetat được xác nhận bởi nghiên cứu trước đây của Elgawish và Abdelrazek cho thấy *SOD* đã giảm ở những con chuột được điều trị bằng chì axetat so với các nhóm khác [30]. Chì (Pb^{2+}) được báo cáo là gây ra stress oxy hóa bằng cách tạo ra sự giải phóng ROS như các gốc superoxide, hydrogen peroxide và hydroxyl, và lipid peroxid. Các nhà trị liệu thực vật ngày càng quan tâm đến việc sử dụng các cây thuốc có hoạt tính chống oxy hóa để bảo vệ chống lại độc tính kim loại nặng [31].

Chì can thiệp vào sự phát triển nội sinh của hệ thống opiate [32]. Nhiều đặc tính độc hại của chì là do nó có khả năng bắt chước hoặc cạnh tranh với canxi. Ở nồng độ picomolar, chì (Pb^{2+}) cạnh tranh thành công với canxi (Ca^{2+}) để tìm các vị

trí liên kết trên phosphokinase C của tiểu não và do đó ảnh hưởng đến tín hiệu tế bào thần kinh [33]. Chì có tác động kép đến sự giải phóng chất dẫn truyền thần kinh: Sự phóng thích chất dẫn truyền thần kinh tự phát được tăng cường, trong khi sự phóng thích được kích thích bị ức chế [34]. Con đường tổng hợp của heme cũng được coi là một trong những vị trí đích của độc tính chì (Pb^{2+}). Delta aminolevulinic acid mất nước (ALAD) có độ nhạy cao với chì. Tuy nhiên, sự ức chế của enzym này dường như được tìm thấy trong sự gia tăng ALA tuần hoàn, được biết đến như một chất chủ vận axit gamma-aminobutyric (GABA) yếu, làm giảm giải phóng GABA thông qua ức chế trước synap. Tăng ALA tuần hoàn có thể là lý do đằng sau việc quan sát thấy một số rối loạn trong hành vi nhận thấy ở bệnh nhân rối loạn chuyển hóa porphyrin và có thể do độc tính của chì (Pb^{2+}). Những thay đổi về hành vi phụ thuộc vào việc tiếp xúc với chì (Pb^{2+}) ở động vật linh trưởng và động vật gặm nhấm cũng tương tự như ở người. Một nghiên cứu cho thấy những con khỉ tiêu thụ thực phẩm có chứa chì axetat từ khi mới sinh đến 200 ngày tuổi đã đạt mức chì trong máu từ 3 đến 25 $\mu\text{g}/\text{dL}$. Ở độ tuổi từ 7 đến 8 tuổi, chúng được làm một bài kiểm tra về sự luân phiên muôn, trong đó kích thích tích cực quan trọng được xen kẽ, và do đó, những con khỉ được điều trị có biểu hiện kém hơn về khả năng học tập, chủ yếu là những khoảng thời gian trì hoãn dài hơn [35]. Trong dân chúng, tiếp xúc với chì chủ yếu qua đường miệng, trong khi tiếp xúc trong công nghiệp chủ yếu qua đường hô hấp. Chì (Pb^{2+}) có cùng độc tính không liên quan đến phương pháp tiếp cận vào cơ thể; do đó, dữ liệu độc tính sẽ không phụ thuộc vào con đường tiếp xúc [17]. Theo nhiều thí nghiệm trong phòng thí nghiệm trên động vật, chì có một loạt các ảnh hưởng độc hại thông qua các hệ thống khác nhau của cơ quan. Tuy nhiên, chì (Pb^{2+}) có thể ảnh hưởng đến hệ tiêu hóa (GI), tim mạch, hệ miễn dịch, hemolymphatic, sinh sản, tiết niệu, thần kinh và cũng gây ra khối u ở động vật thí nghiệm. Các nghiên cứu quan trọng nhất liên quan đến mức độ chì được tạo ra trong máu với liều uống. Ở chuột đực, Chowdhury và cộng sự phát hiện rằng số lượng tinh trùng, với mức độ chì 72 $\mu\text{g}/\text{dL}$ trong máu, đã giảm [36]. Tuy nhiên, không có tác dụng đáng kể nào ở chuột đực, chuột có hàm lượng chì (Pb^{2+}) trong máu là 54 $\mu\text{g}/\text{dL}$. Ở chuột cái, có hàm lượng chì trong máu là 30 $\mu\text{g}/\text{dL}$, chúng có chu kỳ động dục không cân bằng. Kết quả là u nang buồng trứng ở chuột cái có nồng độ chì trong máu là 53 $\mu\text{g}/\text{dL}$. Ở những con chuột đực có nồng độ chì trong máu là 19

$\mu\text{g/dL}$, trọng lượng tuyến tiền liệt đã tăng lên đáng kể. Ngoài ra, một tổn thương tinh hoàn ở chuột đực có nồng độ chì trong máu là $30 \mu\text{g/dL}$ đã được phát hiện [36]. Davidovics và DiCicco-Bloom đã phát biểu một *in vitro* thay đổi định giá đối với sự hình thành thần kinh của động vật có vú thông qua một mô hình về tiền chất vỏ não được đặc trưng tốt sau khi tiếp xúc với chì [37]. Trong thận chuột, ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) đối với quá trình peroxy hóa lipid, chức năng thận và biểu hiện của quá trình oxy hóa heme đã được đánh giá bởi Vargas và cộng sự [38]. Như đã nêu bởi Qian cộng sự [39] việc sản xuất protein điều chỉnh glucose 78 (GRP78) trong phản ứng bảo vệ với chì đã được nâng lên. Các nhà nghiên cứu đã trình bày các tế bào u thần kinh đệm C6 được nuôi cấy ở chuột, một dòng tế bào giống như tế bào con, để dẫn axetat $1 \mu\text{g}$ trong một tuần. Họ phát hiện ra rằng mức độ nội bào của hai loại protein đã được tăng lên; trong đó, một chiếc đã được GRP78. Đối với GRP78, sự tích tụ bắt đầu trong vòng 24 h và tiếp tục trong thời gian phơi sáng. Thiệt hại do gốc tự do gây ra bởi Pb và Cd được thực hiện bởi hai cơ chế độc lập nhưng có liên quan với nhau [40]. Một cơ chế khác gây ra stress oxy hóa do Pb và Cd là tác động của chúng lên hệ thống bảo vệ tế bào chống oxy hóa. Pb và Cd có ái lực cao với các nhóm SH trong các enzym của hệ thống bảo vệ chống oxy hóa như glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glutathione (GSH) peroxidase (GPx), catalase (CAT) và SOD, và sau đó, ức chế hoạt động của họ [41], [42]. Ở tất cả những con chuột được điều trị bằng chì, không có sự khác biệt lớn nào về trọng lượng gan tuyệt đối. Ngoài ra, trọng lượng gan so sánh đã được nâng lên đáng kể ở những động vật được tiếp xúc với nồng độ PbAc cao nhất ($P < 0,05$) so với nhóm đối chứng. Độc tính của chì gây ra sự gia tăng đáng kể các hoạt động của alanin aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) trong huyết thanh, và giảm đáng kể tổng số protein huyết thanh so với nhóm đối chứng tương ứng [43].

Đối với những thay đổi về tim mạch, các hệ thống thần kinh và nội tiết tố quan trọng đã bị ảnh hưởng bởi chì. Các hệ thống này đóng góp vào quy luật sức cản của mạch ngoại vi, cung lượng tim và nhịp tim. Cơ trơn mạch máu có thể bị ảnh hưởng trực tiếp bởi chì thông qua việc hạn chế hoạt động của Na-K-ATPase, kéo theo sự gia tăng liên quan của nồng độ canxi nội bào [44]. Ion chì cũng ảnh hưởng đến huyết áp. Bagchi và Preuss [45] cho biết huyết áp toàn thân ở chuột Sprague-

Dawley con đã thay đổi và mật độ khoáng xương giảm sau khi tiếp xúc với 1% axetat chì trong 40 ngày trong nước uống. Sau khi điều trị tiếp tục, mức huyết áp toàn thân tăng cao và cuối cùng trở lại bình thường. Tuy nhiên, sau vài tháng tiếp xúc với chì kết thúc, nó lại tăng lên trên mức được chấp nhận. Ở chuột, tăng huyết áp do ion chì có liên quan đến quá trình khử nitric oxide có liên quan đến: (1) điều hòa giảm của enzyme hòa tan guanylate cyclase tạo ra cyclic guanosine monophosphate (một chất trung gian giãn mạch gây ra nitric oxide); (2) điều hòa huyết áp; (3) thay đổi hệ thống adrenergic (tức là, tăng norepinephrine trong huyết tương, làm giảm mật độ của thụ thể β -adrenergic mạch máu và nâng cao hoạt động của hệ thần kinh giao cảm trung ương) [17].

Nhiễm độc chì cấp tính và mãn tính góp phần gây tổn thương mạch và tim cũng như các hậu quả có thể gây tử vong như bệnh tim mạch và tăng huyết áp [46]. Tiếp xúc với mức độ ion chì thấp có thể gây tăng huyết áp ở cả người và động vật [17]. Tai biến mạch máu não, bệnh mạch máu ngoại vi và bệnh mạch vành do thiếu máu cục bộ cũng có thể được coi là những rối loạn lớn, mặc dù chỉ định về mối quan hệ nguyên nhân của tăng huyết áp và phơi nhiễm với ion chì, nhưng nó chỉ được áp dụng trong các trường hợp kết quả tim mạch do nhiễm độc của ion chì. Ở động vật, tác động lên tim mạch sau khi tiếp xúc với ion chì đã được nghiên cứu gần đây bởi Vaziri và Sica [20], Kilikdar và cộng sự [47] cho thấy rằng những con chuột khi nhận (15 $\mu\text{g/g}$ BW) chì axetat gây tổn thương tim rõ ràng là do tăng hoạt động của glutamat oxaloacetat transaminase trong huyết thanh và lactate dehydrogenase.

Tiếp xúc với mức độ chì cao ($>60\mu\text{g/dL}$) có thể gây rối loạn chức năng thận. Ngay cả mức chì thấp ($\sim 10\mu\text{g/dL}$) cũng có thể gây ra vấn đề tương tự [48]. Có hai loại bất thường về chức năng thận: Bệnh thận cấp tính và mãn tính. Bệnh thận cấp tính có thể được phân loại về mặt hình thái thông qua những thay đổi thoái hóa hiện diện trong biểu mô ống kèm theo sự hiện diện của các thể bao bọc nhân, chứa phức hợp protein chì và về mặt chức năng thông qua cơ chế suy giảm vận chuyển ở ống. Tuy nhiên, nó không phải là lý do đằng sau sự xuất hiện của protein trong nước tiểu mà nó có thể làm tăng sự bài tiết không chuẩn của axit amin, photphat và glucose, một hỗn hợp được gọi là hội chứng Fanconi. Tuy nhiên, bệnh thận

mãn tính đơn giản hơn nhiều và có thể gây ra những thay đổi về hình thái và chức năng không thể đảo ngược. Tuy nhiên, nó được phân loại theo các biến thể mô kẽ và cầu thận, dẫn đến tăng axit uric máu, tăng huyết áp và suy thận [49]. Carmignani và cộng sự [50] đã tuyên bố trong bài tổng quan của mình rằng ảnh hưởng bệnh lý của việc tiếp xúc với ion chì trên hệ thống thận của cả nam giới và động vật dưỡng như dẫn đến sự phát triển độc tính trên thận dưới ảnh hưởng của stress oxy hóa mà nó gây ra. Tuy nhiên, nghiên cứu trước đây cho rằng tác động như vậy chỉ làm tổn thương thận trong trường hợp phơi nhiễm mãn tính trở nên đáng kể về mặt lâm sàng và tổn thương thận thường không xảy ra trong các trường hợp không có triệu chứng cấp tính.

Dữ liệu tài liệu về ảnh hưởng của phơi nhiễm Pb^{2+} cấp tính gây ra stress oxy hóa ở thận của động vật là rất hiếm. Việc sử dụng chì axetat cho thấy nồng độ urê và creatinin tăng đáng kể ($P < 0,05$) so với các nhóm khác [51]. Sharma và Singh [52] gần đây đã báo cáo rằng 24 h tiếp xúc với 10 và 150 $\mu\text{g/g}$ BW của Pb axetat gây ra tăng hàm lượng các chất phản ứng axit thiobarbituric (TBARS) ở thận, hoạt động như một chỉ báo về quá trình peroxy hóa lipid, cũng như các hoạt động *SOD* và *CAT* trong thận của Chuột Balb-c. Một số tác giả cũng đã xác nhận rằng có sự gia tăng quá trình peroxy hóa lipid trong thận của động vật tiếp xúc với Pb^{2+} . Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng tiêm Pb-axetat trong màng bụng (IP) 20 mg/kg BW trong 5 ngày và tiêm IP 5 $\mu\text{g/g}$ BW Pb axetat trong thời gian 30 ngày có thể làm tăng quá trình peroxy hóa lipid ở thận [53], [54]. Những phát hiện này phù hợp với Sharma và cộng sự [55] người đã báo cáo sự gia tăng đáng kể mức TBARS ở chuột được điều trị bằng đường uống trong 40 ngày với Pb-nitrat với liều 50 $\mu\text{g/g}$ BW cũng như với kết quả của Wang và cộng sự [56] đã chứng minh sự tăng cường quá trình peroxy hóa lipid được đo bằng mức malondialdehyde (MDA) trong thận của những con chuột tiếp xúc với 500 mg Pb^{2+}/L qua nước uống trong 8 tuần. Các nghiên cứu gần đây được thực hiện trên chuột [57], [58] cũng đã chỉ ra rằng tiếp xúc lâu dài với Pb^{2+} có thể dẫn đến sự hình thành gốc tự do và quá trình peroxy hóa lipid trong thận, điều này sẽ gây tổn hại cho tính toàn vẹn của màng và ức chế các thành phần tế bào hình ống. Hầu hết các tác giả đều đồng ý rằng Pb^{2+} tạo ra quá trình peroxy hóa lipid chủ yếu thông qua quá trình tạo ROS như H_2O_2 và OH , mặc dù dữ liệu

thực nghiệm cũng cho thấy sự tham gia của các loại nitơ. Điều này được hỗ trợ bởi một nghiên cứu cho thấy tiêm IP Pb-acetate (20 $\mu\text{g/g}$ BW) trong 5 ngày gây tăng NO ở thận do tăng hoạt tính của tổng hợp NO cảm ứng [53]. Mức độ tăng cường của ROS cũng có thể là do sự gián đoạn do Pb^{2+} gây ra trong hệ thống phòng thủ chống oxy hóa. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng Pb^{2+} làm thay đổi hoạt động của các enzym chống oxy hóa như SOD, CAT, GPx, GST và G6PD cũng như hàm lượng GSH ở động vật và người, có nghĩa là phơi nhiễm axetat trong màng bụng hoặc Pb^{2+} qua đường miệng kéo dài trong các nghiên cứu thực nghiệm đã làm giảm đáng kể hoạt động của các enzym chống oxy hóa trong các mô thận [56], [53], [55]. Cơ chế tác động của Pb^{2+} lên các enzym này có thể phức tạp, vì Pb^{2+} có thể ức chế cạnh tranh sự hấp thụ và / hoặc thay thế chúng trong các vị trí hoạt động của enzym hoặc liên kết với nhóm SH của protein [56]. Ngoài stress oxy hóa là cơ chế gây độc Pb^{2+} ở thận, các nghiên cứu thực nghiệm đã chỉ ra rằng tiếp xúc với Pb^{2+} gây ra sự gia tăng quá trình apoptosis không chỉ ở gan mà còn ở thận [59]. Đã chứng minh rằng điều trị mãn tính trên chuột với Pb-acetate trong thời gian 12 tuần đã làm tăng số lượng cơ thể apoptotic trong các tế bào ống. Do đó, có thể giả thuyết rằng nhiễm độc Pb^{2+} ảnh hưởng đến biểu hiện gen của các protein apoptosis. Sau khi hấp thụ, chì được chuyển đến nhiều mô trong cơ thể. Nó gây ra hiện tượng ứ đọng bazơ trong máu vì ảnh hưởng ức chế của nó đối với enzym α -amino levulinate mất nước đã ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp heme [60]. Độc tính trên thận phát sinh theo hai cách, có thể hồi phục thường được phát hiện sau khi trẻ em tiếp xúc nghiêm trọng với chì axetat hoặc do bệnh thận kẽ không hồi phục thường nhận thấy khi tiếp xúc lâu dài với chì [60]. Những thay đổi mô bệnh học ở biểu mô ống thận gần bắt nguồn từ nhiễm độc ion chì và những thay đổi này gây ra viêm thận kẽ và thường liên quan đến tăng huyết áp. Nó tích tụ trong các ống gần không bị nhiễm độc của vỏ thận tạo ra cả bằng chứng sinh hóa và hình thái học về độc tính của chì. Một công trình nghiên cứu sâu rộng về ảnh hưởng nghiêm trọng của độc tính chì đối với thận đã được ghi nhận đầy đủ [61]. Một nguyên nhân khác gây ra nhiễm độc thận do chì là do tiếp xúc với nhiễm độc chì trong môi trường và nhanh chóng trở thành gánh nặng sức khỏe gia tăng cho cả động vật và con người [62]. Khi tiếp xúc này, tổn thương thận cấp tính do chì có thể xảy ra nếu không có nhiễm độc cấp tính, do đó bệnh thận do nhiễm chì có thể không được nhận biết như vậy [62]. Trong khi ở

trạng thái tích tụ mãn tính chì (Pb^{2+}) trong cơ thể cuối cùng dẫn đến suy giảm chức năng thận [63]. Urê và creatinin là sản phẩm thải ra của quá trình chuyển hóa axit amin mà chúng loại bỏ qua thận [64]. Stress oxy hóa đường như có liên quan đến sự phát triển độc tính trên thận do tiếp xúc với chì trong môi trường gây ra các tổn thương bệnh lý đáng kể trên hệ thống thận của nam giới và động vật [65]. Conterato và cộng sự [66] đã điều tra nồng độ Pb^{2+} và Cd^{2+} trong máu và các thông số về stress oxy hóa ở công nhân sản xuất pin, thợ sơn từ ngành công nghiệp ô tô và công nhân không tiếp xúc nghề nghiệp với những kim loại này, những người làm công việc kiểm soát. Mặc dù mức MDA không tăng ở các nhóm tiếp xúc, nhưng hoạt động gia tăng của GST đã được quan sát thấy ở cả công nhân sản xuất pin và thợ sơn. Các phân tích tương quan cho thấy Cd^{2+} và Pb^{2+} góp phần vào việc nâng cao hoạt động của enzym này, điều này được giải thích là do khả năng của các kim loại này để gây ra biểu hiện gen GST. Mặt khác, các hoạt động GPx và *SOD* tăng lên, chỉ quan sát thấy ở các công nhân sản xuất pin, tương quan với sự gia tăng nồng độ Pb^{2+} trong máu, trong khi hoạt động CAT chỉ thay đổi ở các họa sĩ, tương quan nghịch với nồng độ Cd^{2+} trong máu. Những thay đổi này cho thấy tác động cộng gộp của Cd^{2+} và Pb^{2+} lên nồng độ GST trong máu, trong khi những thay đổi khác trong các thông số stress oxy hóa có liên quan rõ ràng với nồng độ Pb^{2+} hoặc Pb^{2+} trong máu. Do đó, có thể thiếu sự tương tác giữa Pb^{2+} và Cd^{2+} về mức độ tình trạng oxy hóa trong máu sau khi tiếp xúc qua đường hô hấp. Một cuộc điều tra khác với các kết quả hỗ trợ khả năng đối kháng giữa Pb^{2+} và Cd^{2+} đã được thực hiện trên chuột đồng, động vật được coi là mô hình tốt cho việc phơi nhiễm chì trong môi trường. Động vật được tiếp xúc với Pb^{2+} và Cd^{2+} trong chế độ ăn trong 6 tuần ($Cd-60$; $Pb-300$; $Cd-60 + Pb-300 \mu g/g$ nồng độ trọng lượng khô cao gấp hai lần so với dự kiến ở các khu vực bị ô nhiễm cao). Không có thay đổi đáng kể nào về nồng độ kim loại độc hại trong gan. Mức TBARS hoặc GSH được quan sát thấy giữa nhóm được xử lý bằng một kim loại đơn lẻ và nhóm được xử lý bằng hỗn hợp [67] được sử dụng cho chuột bằng thiết bị đo trong 90 ngày, ba liều khác nhau, theo tỷ lệ hỗn hợp độc tố, trong đó liều cao nhất là 1/10 của LD_{50} được thiết lập trước đó đối với hỗn hợp Pb^{2+} nitrat và Pb^{2+} clorua. Kết quả cho thấy sự gia tăng mạnh mẽ, đáng kể MDA và giảm hàm lượng GSH trong gan và thận cùng với sự giảm hoạt động của các enzym chống oxy hóa *SOD*, CAT, GPx. Tuy nhiên, nghiên cứu thực nghiệm

này không cung cấp thông tin về các ảnh hưởng riêng lẻ của việc xử lý Pb^{2+} hoặc Cd^{2+} trong cùng điều kiện thí nghiệm và do đó rất khó để thảo luận về các tương tác có thể xảy ra giữa các kim loại này. Trong cùng một thí nghiệm, các biểu hiện gen *MT1* và *MT2* đã được khảo sát ở gan, võ thận chuột và khả năng điều chỉnh tăng đáng kể của chúng ở cả gan và thận. Sự kích hoạt các hệ thống phòng thủ được giải thích bởi tác dụng chống oxy hóa của MT, sự sẵn có của cysteine trong MT để tổng hợp GSH, và bởi phản ứng phiên mã MT mRNA được kích hoạt bởi ROS. Họ cũng suy đoán rằng những thay đổi này có thể liên quan đến sự ức chế hoạt động của enzym hữu cơ steroid và ảnh hưởng đến mức testosterone, số lượng và khả năng vận động của tinh trùng sau khi tiếp xúc với Pb^{2+} và Cd^{2+} . Dữ liệu tài liệu chỉ ra rằng, tương tự như tiếp xúc với Pb^{2+} hoặc Cd^{2+} , việc tiếp xúc với các kim loại độc hại này sẽ gây ra hiện tượng apoptosis. Trong một nghiên cứu về độc tính đường uống dưới điện tử kéo dài 90 ngày, nồng độ chì và cadmium tương đối thấp và thực tế với môi trường đã gây ra quá trình apoptosis ở gan và thận đáng kể, do đó làm suy giảm chức năng của chúng [68]. Độc tính với gan, ion chì có liên quan đến sự gia tăng nồng độ men gan trong huyết thanh AST, ALT và ALP [69] và những thay đổi trong chuyển hóa cholesterol ở gan [70]. Do vai trò cụ thể của nó trong cơ quan, ngoài máu, gan còn là mục tiêu chính của stress oxy hóa do Pb^{2+} gây ra. Sử dụng IP cấp tính 15 mgPb-acetate/kg BW trong 7 ngày [71] và 25 mg Pb-acetate/kg BW trong 5 ngày đã làm giảm hoạt tính *SOD* và *CAT* và giảm hoạt tính *GPx* hai lần. Những thay đổi này được theo sau bởi sự giảm đáng kể nồng độ GSH, một phần là kết quả của việc bài tiết Pb^{2+} qua mật liên kết với các nhóm SH của GSH, như đề xuất của Abdou và Hassan [70]. Điều tra về sự phục hồi từ stress oxy hóa do Pb^{2+} gây ra ở gan chuột được thực hiện bởi Omobowale và cộng sự [69]. Động vật được cho 0,25, 0,5 và 1,0 mg Pb-acetate/mL trong 6 tuần và sau đó không được điều trị trong 6 tuần nữa. Tăng các thông số xét nghiệm chức năng gan, ALT, AST, ALP, cũng như MDA và H_2O_2 nồng độ trong gan và giảm hoạt động của các enzym chống oxy hóa *SOD*, *CAT*, *GPx*, *GST* và hàm lượng GSH được quan sát thấy sau 6 tuần điều trị Pb^{2+} . Vào cuối thử nghiệm, chỉ có hoạt tính *SOD* được phục hồi và nằm trong phạm vi được chấp nhận, chỉ ra sự phục hồi không hoàn toàn do ảnh hưởng của stress oxy hóa do Pb^{2+} gây ra đối với các enzym khác. Tác động quan trọng nhất của stress oxy hóa do Pb^{2+} gây ra ở gan là quá trình peroxy hóa lipid [69]

gây ra sự thay đổi tính toàn vẹn của màng và thành phần axit béo có liên quan đến sự gia tăng mức MDA trong gan [72]. Trong một thí nghiệm khác, với mục tiêu điều tra giới tính, liều lượng và cách thức phụ thuộc vào thời gian của stress oxy hóa do Pb^{2+} gây ra bên cạnh việc quan sát sự gia tăng nồng độ MDA ở gan phụ thuộc vào thời gian và liều lượng; mối tương quan giữa stress oxy hóa, quá trình apoptosis và kinase protein hoạt hóa mitogen (MAPKs) trong tế bào gan đã được quan sát thấy. Các tác giả kết luận rằng quá trình apoptosis có thể được gây ra thông qua các thay đổi qua trung gian stress oxy hóa trong MAPKs [73]. Kilikdar và cộng sự [74] tuyên bố rằng khi những con chuột nhận được axetat chì ở liều 15 $\mu\text{g/g}$ BW IP và cho thấy hoạt động ALP tăng lên đáng kể 62% so với hoạt động đo được ở động vật đối chứng và chuột khi được điều trị bằng axetat chì trong 7 ngày liên tiếp. Từ nghiên cứu tương tự, mức độ bilirubin huyết thanh tăng đáng kể 38% so với giá trị thu được ở chuột đối chứng cũng được ghi nhận. Không có sự khác biệt đáng kể khi so sánh với nhóm đối chứng về hoạt động huyết thanh của LDH, ALP, ALT, AST trong khi đường huyết cao hơn một chút ở chuột tiếp xúc với 0,3% PbAc, nhưng albumin và mức TP thấp hơn ở tất cả các nhóm được điều trị bằng chì [75].

Những con chuột được tiêm IP với axetat chì với liều 10 mg/kg cho thấy ALT huyết thanh tăng nhẹ có ý nghĩa chỉ sau 24h ($P < 0,05$) trong khi ở 100 $\mu\text{g/g}$, nó gây ra sự gia tăng đáng kể ALT huyết thanh phụ thuộc vào thời gian ($P < 0,001$), khi so sánh với nhóm đối chứng [76].

Độc tính thần kinh của chì ở mức độ tiếp xúc cao đã được ghi nhận rõ ràng đối với cả con người và động vật. Cả hệ thống thần kinh ngoại vi và trung ương đều chịu ảnh hưởng của việc tiếp xúc với chì (Pb^{2+}). Ở trẻ em, hệ thần kinh trung ương chịu ảnh hưởng nhiều hơn so với ở người lớn, hệ thống thần kinh ngoại biên bị ảnh hưởng nhiều hơn [77]. Bệnh não (một sự thoái hóa nâng cao của một số bộ phận của não) là một tình trạng biểu hiện đáng kể khi tiếp xúc với chì và các triệu chứng chính bao gồm ảo giác, cáu kỉnh, kém chú ý, đờ đẫn, mất trí nhớ, run cơ và đau đầu. Ở mức phơi nhiễm cao, các biểu hiện đơn giản hơn nhiều xuất hiện và bao gồm tê liệt, mê sảng, hôn mê, co giật, mất điều hòa và thiếu phối hợp [78]. Tuy nhiên, trẻ nhỏ cũng như trẻ chưa sinh đặc biệt dễ bị ảnh hưởng thần kinh do nhiễm độc chì (Pb^{2+}) vì hệ thần kinh phát triển hấp thụ nhiều chì (Pb^{2+}) hơn. So với người lớn,

lượng chì (Pb^{2+}) lưu thông có hệ thống khi tiếp xúc với não trẻ em là cao hơn một cách có ý nghĩa [79]. Trẻ em có thể hiếu động, dễ bị kích động và không chú ý ngay cả khi tiếp xúc với chì ở mức độ thấp. Tuy nhiên, trẻ em nhiễm độc chì ở mức độ cao hơn có thể bị giảm trí thông minh, chậm phát triển, mất thính giác và chỉ có khả năng ghi nhớ ngắn hạn. Tổn thương não vĩnh viễn và thậm chí tử vong có thể là kết quả của việc tiếp xúc nhiều hơn với chì [80]. Một số bằng chứng cho thấy chỉ số thông minh với sự chú ý, hành vi của trẻ và khả năng tập trung bị ảnh hưởng đáng kể đến mức độ tiếp xúc chì thấp. Tác động của việc phơi nhiễm chì đối với hệ thần kinh ngoại vi được phát hiện dưới dạng bệnh thần kinh ngoại vi, bao gồm giảm hoạt động vận động do mất lớp vỏ myelin cô lập các dây thần kinh, do đó làm hỏng hoàn toàn quá trình truyền xung thần kinh, dẫn đến thiếu phối hợp cơ, mệt mỏi và yếu cơ, đặc biệt là các cơ bên ngoài [81]. Như đã nêu bởi Mustafa và Hussein [82], tuy nhiên, sử dụng chì acetate cho bốn con chuột trong nhóm có nhiều tín hiệu tiêu cực về thần kinh, chẳng hạn như giảm sức sống; suy nhược khối lượng cơ; chân động, cùng với sự thiếu ổn định và cân bằng; một dáng đi bất thường. Một sự kiện quan trọng trong quá trình biệt hóa tế bào hình sao là sự thay đổi trong biểu hiện của dấu hiệu thần kinh đệm được gọi là protein axit rung thần kinh đệm [83]. Axetat chì có thể được lưu trữ trong tiểu não, làm rối loạn sinh lý của nó cũng như gây nhiễm độc thần kinh, suy giảm tế bào và có thể gây chết tế bào [84].

Ảnh hưởng huyết học đã được xác minh ở động vật và con người sau khi tiếp xúc với chì (Pb^{2+}). Những ảnh hưởng này bao gồm mức tăng porphyrin trong nước tiểu, δ -ALA, coproporphyrin, protoporphyrin hồng cầu và protoporphyrin kẽm. Kết quả là kết quả của sự thay đổi ba enzym, liên quan đến quá trình sinh tổng hợp heme: δ -aminolevulinic dehydrase, ferrochelatase, và δ -ALA synthetase (ALAS) [17]. Hệ thống tạo máu sẽ bị ảnh hưởng trực tiếp bởi chì bằng cách hạn chế sự tổng hợp hemoglobin (Hb) thông qua việc ngăn chặn một số enzym quan trọng, là một phần của con đường tổng hợp heme. Tuy nhiên, nó làm giảm tuổi thọ của hồng cầu tuần hoàn thông qua việc nâng cao tính mong manh của màng tế bào. Do đó, thiếu máu sẽ là kết quả chung của hai quá trình này [49]. Chì gây độc hại ở nhiều cơ quan, gây suy giảm hệ thống thần kinh, tạo máu, thận, tim mạch và sinh sản sau khi ăn, hít hoặc hấp thụ qua da [49]. Có hai loại thiếu máu do nhiễm độc chì (Pb^{2+}):

Thiếu máu Frank, chỉ xảy ra khi mức độ chì trong máu tăng lên đáng kể trong một thời gian dài và thiếu máu tan máu, có liên quan đến mức độ phơi nhiễm chì nghiêm trọng [85]. Con đường tổng hợp heme được đề xuất là bị ảnh hưởng bởi chì (Pb^{2+}) theo cách phụ thuộc vào liều lượng thông qua ba enzyme chính điều hòa đi trong quá trình tổng hợp heme; enzyme ferrochelatase của ty thể xúc tác việc đưa sắt vào protoporphyrin để tạo ra heme, δ -ALAD, enzyme cytosolic mà nhờ đó, sự hình thành porphobilinogen từ δ -ALA được xúc tác, và cuối cùng, ALAS, một enzyme ty thể bởi mà sự hình thành ALA được xúc tác [86].

Ứng suất oxy hóa có thể hiểu là cơ chế chính của độc tính chì. Một trong những tác động chính của độc tính chì trong hệ thống tạo máu liên quan đến sự suy giảm con đường tổng hợp Hb thông qua sự biểu hiện gián đoạn của các gen mã hóa δ -ALAD, ferrochelatase và ALAS [86]. Trong ty thể, các bước cuối cùng, cũng như các bước ban đầu, của quá trình tổng hợp heme xảy ra, trong khi các bước trung gian xảy ra trong tế bào chất. Tuy nhiên, ba enzyme quan trọng của con đường này, đã được đề cập ở trên, bị ức chế bởi chì nhưng chỉ được sử dụng trong lâm sàng để đo mức độ nhiễm độc chì và ảnh hưởng của nó lên ALAD cao hơn. Sự tích tụ ALA dẫn đến hạn chế ALAD, có thể nhận thấy trong nước tiểu và huyết tương ngay cả khi lượng chì trong máu $<10 \mu\text{g/dL}$. Trong khi sự ức chế ALAD được biết đến sớm hơn ở nồng độ chì $10 - 20 \mu\text{g/dL}$ trong máu, quá trình sinh tổng hợp heme không giảm cho đến khi hoạt động của ALAD bị hạn chế 80-90% diễn ra ở nồng độ chì cao hơn khoảng $55 \mu\text{g/dL}$ trong máu [87].

Sự ức chế men ferrochelatase dẫn đến tích tụ protoporphyrin trong hồng cầu và tăng tiết coproporphyrin trong nước tiểu. Hơn nữa, sự hạn chế của enzyme này là kết quả khi sắt được thay thế bởi kẽm trong vòng porphyrin để tạo thành kẽm protoporphyrin (ZPP). Do đó, nồng độ ZPP tăng lên, và điều này có thể được sử dụng như một tín hiệu để theo dõi mức độ phơi nhiễm chì [88]. Do đó, việc sản xuất heme bị chặn lại bởi sự hạn chế hợp tác của ba enzyme quan trọng đó theo con đường tổng hợp heme. Cơ chế gây ra việc rút ngắn vòng đời của hồng cầu chưa được thiết lập tốt. Tuy nhiên, một trong những ảnh hưởng huyết học cơ bản nhất quan sát được từ ngộ độc chì cho thấy sự xáo trộn cơ bản của các tế bào hồng cầu trong máu (sự tồn tại của vật chất dày đặc trong các tế bào máu đỏ), đó có thể là

một dấu hiệu sinh học có thể xảy ra ngộ độc chì. Những tập hợp đó là sản phẩm của quá trình phân giải axit ribonucleic [21]. Kilikdar và cộng sự [74] đã nêu khi chuột được điều trị bằng LA IP trong 7 ngày liên tục; Hàm lượng Hb trong máu giảm đáng kể 25% so với giá trị quan sát được ở chuột đối chứng. Erythrocytes được coi là những tế bào dễ bị tổn thương nhất đối với stress oxy hóa từ chì vì chúng có rất ít nguồn dự trữ các enzym chống oxy hóa để chống lại tác động của ROS. Ngoài ra, chúng không thể bổ sung các enzym chống oxy hóa vì chúng thiếu lưới nội chất thô và dễ bị tổn thương bởi ROS. Một số tế bào màu đỏ được sử dụng để chỉ tình trạng thiếu máu do nhiễm độc chì [89]. Độc tính của chì cũng góp phần làm giảm tổng lượng Hb, số lượng tế bào hồng cầu (RBCs) và cả mức độ T3 và T4 trong huyết tương mà không có những thay đổi đáng kể đối với số lượng bạch cầu (WBCs) [90]. Phát hiện này được hỗ trợ bởi Ibrahim và cộng sự [91] trong đó nó nói rằng chì axetat khi dùng đường uống cho chuột cái với liều 10 $\mu\text{g/g}$ BW cho thấy sự giảm đáng kể nồng độ Hb, nồng độ Hb thể trung bình, số lượng hồng cầu và thể tích tế bào đóng gói, trong khi cho thấy sự gia tăng đáng kể tỷ lệ phần trăm của bạch cầu đơn nhân và thể tích tiểu thể trung bình, tổng số protein và số lượng bạch cầu.

Trong cơ thể con người, xương là vị trí chủ yếu để dự trữ ion chì [92]. Chì (Pb^{2+}) được cho là được lưu trữ trong hai phần trong xương. Vùng không thể trao đổi nằm sâu trong vỏ xương và vùng trao đổi được nằm ở bề mặt xương. Vì chì (Pb^{2+}) có thể dễ dàng tiếp cận với huyết tương từ nhóm trao đổi, nó đang tích cực được hấp thụ lại, nó có thể chuyển lên bề mặt sau khi rời khỏi nhóm không thể trao đổi [21]. Ở người lớn, quy trình đồng vị cho chì ổn định cho thấy xương đóng góp gần 40-70% lượng chì thải ra trong máu. Khoảng 85-95% chì (Pb^{2+}) được lưu trữ trong xương của người lớn, trong khi ở trẻ em; khoảng 70% chì (Pb^{2+}) ở nồng độ cao được phát hiện trong các mô mềm. Cách thức huy động và lưu trữ chì trong xương của cơ thể phụ thuộc vào một số yếu tố như tuổi, mức độ tiếp xúc với chì, chủng tộc, liều lượng/tỷ lệ khi mang thai và giai đoạn thai kỳ. Al Naimi và cộng sự [93] cho biết rằng việc sử dụng chì axetat ở mức 75 $\mu\text{g/g}$ BW ở 20 và 40 ngày gây ra sự tăng sản vừa phải của mô tạo máu với sự gia tăng của các tế bào megakaryocytes và sự hiện diện của các mảng mỏng sụn vô hóa được bao phủ bởi

một lớp xương mỏng. Các thanh sụn khoáng hóa do suy giảm khả năng hấp thu của tế bào hủy xương sẽ rộng ra và phóng xạ sâu hơn vào khoang tủy siêu hình so với xương khỏe mạnh bình thường.

Elgawish và Abdelrazek [94] tuyên bố rằng chì axetat gây ra sự suy giảm đáng kể chức năng của các cơ quan sinh sản nam giới cũng như sự xuất hiện của các thay đổi mô tinh hoàn trong mô học của viêm tinh hoàn. Các mẫu tinh dịch và máu đã được phân tích từ các công nhân của nhà máy sản xuất pin và cho thấy mối liên hệ ngược chiều giữa nồng độ, thể tích tinh trùng và mức độ chì trong huyết tương. Các mối liên hệ quan trọng đã được quan sát thấy giữa các mức độ protoporphyrin, mật nước và các thông số sinh sản cho thấy sự giảm khả năng vận động, mật độ của tinh trùng, số lượng khả năng sống và tăng hình thái của đầu tinh trùng bất thường [95]. Ở cả phụ nữ và nam giới, những tác động xấu đến hệ sinh sản là do tác dụng của chì (Pb^{2+}). Các tác động chung được tìm thấy ở nam giới bao gồm: sinh tinh bất thường (giảm số lượng và khả năng vận động), giảm ham muốn tình dục, chức năng tuyến tiền liệt bất thường, tổn thương nhiễm sắc thể, thay đổi testosterone huyết thanh và vô sinh. Ở phụ nữ, nhiễm độc chì (Pb^{2+}) nhiều hơn gây sảy thai, tăng huyết áp thai nghén, vô sinh, vỡ màng ối sớm, đẻ non và tiền sản giật [96]. Hơn nữa, ảnh hưởng trực tiếp của chì đối với các giai đoạn tiến triển của thai nhi cũng đã được nghiên cứu trong thời kỳ mang thai [97]. Kết quả thử nghiệm cho thấy động vật tiếp xúc với chì có mức độ hormone hoàng thể hóa huyết tương (LH) thấp hơn sau khi được kích thích bằng hormone giải phóng gonadotropin so với đối chứng cũng như giảm tỷ lệ hormone ức chế / hormone kích thích nang trứng (FSH) [98]. Những con chuột được điều trị bằng chì với liều 30 $\mu\text{g/g}$ BW giảm đáng kể nồng độ T3, T4 và TSH trong huyết thanh, và các phát hiện mô bệnh học cho thấy nang giáp mở rộng liên quan đến biểu mô dẹt so với những con đối chứng âm tính [99]. Saleh và cộng sự [100] cho biết rằng có một sự giảm quan trọng trong chỉ số giao phối và chỉ số sinh sản ở những con cái được giao phối với những con đực tiếp xúc với chì. Những con chuột tiếp xúc với chì (Pb^{2+}) được quản lý bằng testosterone mất ít thời gian bắt đầu hơn để tắm bỏ cho con cái. Sự gia tăng cận biên về số lần cấy và giảm tỷ lệ hao hụt trước và sau khi cấy ở chuột cái giao phối với chuột đực dùng chung với chì (Pb^{2+}) và testosterone cho thấy hiệu quả sinh sản tăng lên. Tuy nhiên, không có sự

cải thiện quan trọng nào về khả năng sinh sản được phát hiện ở những con chuột bình thường được tiêm testosterone một mình so với những con chuột đối chứng [100]. Trong khi đó, chì axetat dùng đường uống cho chuột đực trưởng thành khi tiếp xúc với 273 hoặc 819 mg/L gây giảm đáng kể trọng lượng của cơ quan sinh sản, giảm số lượng tinh trùng mào tinh, tinh trùng di động và tinh trùng sống sót cho thấy sự sản xuất tinh trùng giảm đáng kể và chất lượng tinh trùng bị suy giảm và nồng độ testosterone trong huyết thanh ở chuột đực điều trị cho thấy sự hình thành steroid giảm [101]. Chì axetat dùng đường uống cho chuột với liều 8 $\mu\text{g/g}$ BW cho thấy sự giảm đáng kể ($P < 0,05$) trong cơ quan sinh sản, một số tuyến phụ và cũng cho thấy ảnh hưởng đến nồng độ LH và hormone testosterone, số lượng tinh trùng kèm theo sự gia tăng ($P < 0,05$) về chỉ số phân bào và tỷ lệ phần trăm tinh trùng bất thường [102]. Hammed và cộng sự [103] cho biết việc tiếp xúc với chì axetat cho chuột bằng đường uống ở liều 10 $\mu\text{g/g}$ BW cho thấy tác động giảm đáng kể mức LH và FSH khi so sánh với nhóm đối chứng.

Stress oxy hóa đóng một vai trò quan trọng trong ngộ độc chì (Pb^{2+}) là do sự mất cân bằng trong việc sản xuất các gốc tự do và làm giảm khả năng giải độc cơ thể của hệ thống, dẫn đến tổn thương tế bào [96], [104]. Nó bắt đầu với sự khởi đầu của stress oxy hóa đã được đề xuất xảy ra theo hai con đường đồng thời; đầu tiên, việc tạo ra ROS như hydro peroxit, oxy đơn và hydro peroxit (H_2O_2). Thứ hai, sự cạn kiệt nguồn dự trữ chất chống oxy hóa có trong tự nhiên [104]. Hệ thống enzym chống oxy hóa của cơ thể hoạt động để vô hiệu hóa quá trình tạo ROS, với enzym quan trọng nhất của tế bào là GSH. GSH là một tripeptide (chứa các nhóm sulfhydryl) được tìm thấy trong các mô của động vật có vú, có tác dụng tiêu diệt các gốc tự do [105]. GSH tồn tại ở hai dạng; khử (GSH) và oxy hóa GSH dismutase (GSSG). Ở trạng thái giảm, GSH tăng các đương lượng giảm ($\text{H}^+ + \text{e}^-$) từ các nhóm thiol của nó trong dư lượng cysteine thành ROS, do đó làm cho chúng ổn định. Sau khi cho điện tử của nó, nó sẽ dễ dàng kết hợp với một phân tử khác của chính nó để tạo thành GSH disulfide (GSSG) với sự hiện diện của GPx. Phản ứng ngược/ngược lại tạo ra GSH GSSG khi có mặt của GSH reductase (GR). Thông thường, chỉ có khoảng 10% GSH tồn tại ở dạng oxy hóa (GSSG), phần còn lại tồn tại ở dạng khử

là GSH. Tuy nhiên, nồng độ GSSG cao hơn nhiều so với GSH trong quá trình stress oxy hóa.

Chì (Pb^{2+}) cho thấy đặc tính chia sẻ electron mạnh mẽ, hỗ trợ việc hình thành các liên kết cộng hóa trị. Các liên kết cộng hóa trị này được hình thành giữa gốc chì và các nhóm sulfhydryl trong các enzym chống oxy hóa, làm cho các enzym này trở thành mục tiêu nhạy cảm nhất với chì, cuối cùng khiến chúng không hoạt động. Mặt khác, chì làm bất hoạt GSH bằng cách liên kết với sulfhydryl của nó. Quá trình này làm phát sinh sự tổng hợp GSH từ cysteine thông qua chu trình γ -glutamyl, nhưng thông thường sẽ không đủ hiệu quả để bổ sung nguồn cung cấp GSH [106]. Hơn nữa chì làm bất hoạt các enzym δ -ALAD, GR, GPx, GSH-S-transferase và tiếp tục làm giảm mức GSH [107], [108]. Những thứ khác là *SOD* và *CAT*. Nồng độ *SOD* giảm làm giảm độ thanh thải của gốc superoxide, trong khi *CAT* giảm làm giảm khả năng thu gom gốc superoxide. Chì cũng có thể thay thế các ion kẽm đóng vai trò là đồng yếu tố quan trọng đối với các enzym chống oxy hóa này trong việc cố gắng vô hiệu hóa các enzym [109], điều này ngoài việc nhắm mục tiêu các nhóm sulfhydryl của chúng.

Quá trình peroxy hóa lipid được coi là dấu ấn sinh học đối với stress oxy hóa và là một trong những hậu quả được nghiên cứu nhiều nhất của ROS trên màng lipid. ROS lấy các điện tử từ màng tế bào và làm tổn thương tế bào bằng cách làm biến tính lipid hình thành màng. Ngoài quá trình peroxy hóa lipid, chì còn gây ra quá trình oxy hóa thành Hb, dẫn đến sự tan máu của hồng cầu. Điều này xảy ra do sự ức chế ALAD và làm tăng nồng độ cơ chất ALA trong máu, cũng như trong nước tiểu, mức ALA tăng cao sẽ tạo ra hydro peroxit và gốc superoxide tương tác với oxy-Hb, dẫn đến việc tạo ra các gốc hydroxyl [21]. Cơ chế nói trên làm cho tế bào rất dễ bị tổn thương do stress oxy hóa và cũng có thể dẫn đến chết tế bào. Các cation hóa trị hai như Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} và các cation đơn hóa trị như Na^+ , cũng có thể được thay thế bằng Pb^{2+} , do đó ảnh hưởng đến các quá trình sinh học cơ bản khác nhau [110] trong cơ chế được gọi là cơ chế ion của chì. Các quá trình cơ bản của tế bào như truyền tín hiệu trong và gian bào, kết dính tế bào, gấp và trưởng thành protein, apoptosis, vận chuyển ion, điều hòa enzym, giải phóng chất dẫn truyền thần kinh đã bị ảnh hưởng đáng kể bởi cơ chế ion nói trên [111]. Cơ chế này

chủ yếu góp phần vào sự thiếu hụt thần kinh sau khi chì thay thế các ion canxi; nó có khả năng vượt qua hàng rào máu não (BBB) với một tốc độ đáng kể. Sau đó, chì tích tụ trong các tế bào biểu bì (chứa các protein liên kết chì). Ảnh hưởng của độc tính chì rõ ràng hơn ở các tế bào thần kinh chưa trưởng thành (hệ thần kinh đang phát triển) thiếu các protein liên kết chì. Chì (Pb^{2+}) dễ dàng làm hỏng các tế bào biểu mô và cản trở sự hình thành vỏ myelin, cả hai đều liên quan đến sự phát triển của BBB.

Các chất dẫn truyền thần kinh quan trọng như protein kinase C có thể bị ảnh hưởng bởi sự thay thế chì của canxi như nồng độ picomolar, protein kinase C điều chỉnh kích thích thần kinh dài hạn và lưu trữ trí nhớ. Chì (Pb^{2+}) cũng ảnh hưởng đến nồng độ ion natri, chịu trách nhiệm cho các hoạt động sinh học quan trọng như tạo ra điện thế hoạt động trong các mô kích thích nhằm mục đích giao tiếp giữa tế bào với tế bào, hấp thu chất dẫn truyền thần kinh (choline, dopamine và GABA) và điều hòa sự hấp thu giữ canxi của các synaptosomes. Sự tương tác này giữa chì và natri làm suy yếu nghiêm trọng hoạt động bình thường của các quá trình phụ thuộc natri nói trên [112].

1.1.5. Ảnh hưởng của kim loại nặng đến cá ngựa vằn

Trong những năm qua có rất nhiều tài liệu nghiên cứu khác nhau về sự ảnh hưởng của kim loại nặng lên cá thể ngựa vằn.

Năm 2003, khi nghiên cứu sự tích lũy của kẽm, đồng và metallothionein trong tế bào trứng cá ngựa vằn thì Riggio và cộng sự cho rằng cả đồng và kẽm đều tích lũy trong quá trình tăng trưởng của tế bào trứng, kẽm tập trung trong suốt các giai đoạn phát triển và xâm nhập vào tế bào trứng ngựa vằn [113]. Kết quả chứng minh rằng hàm lượng kim loại tăng lên trong quá trình phát triển của noãn bào. Kẽm tăng từ 30 ng lên 100 ng/oocyte (giai đoạn 3 tế bào trứng); đồng thay đổi từ 1 ng đến 3,5 ng/oocyte (giai đoạn 3 tế bào trứng). Trong quá trình phát triển của phôi thai, hàm lượng kẽm và đồng tăng lên đáng kể sau khi thụ tinh xung quanh giai đoạn 512 tế bào, sau đó từ từ giảm xuống đến giai đoạn giữa gastrula. Trong quá trình tăng trưởng noãn bào, sự thay đổi hàm lượng metallothionein tương ứng với

hàm lượng kim loại nói trên, trong khi trong quá trình phát triển phôi, mô hình tích tụ metallothionin không tương quan với hai kim loại nói trên.

Các thí nghiệm độc tính Zhao và cộng sự cho thấy hạt ZnO làm chậm phôi nở và tăng dị tật ở cá ngựa vằn. Nghiên cứu này cũng cho thấy nano ZnO có thể làm thay đổi các biểu hiện gen oxy hóa liên quan trong các giai đoạn hình thành và phát triển phôi cá ngựa vằn [114].

Ảnh hưởng của kim loại nặng trên phôi và ấu trùng của cá ngựa vằn cũng được nghiên cứu bởi [115]. Cá ngựa vằn dùng để theo dõi sự sinh sản có chiều dài $3,62 \pm 0,04$ cm và trọng lượng cơ thể $1,00 \pm 0,48$ g. Trước khi đẻ trứng, cá được phân chia theo tỷ lệ 1:2 (đực:cái), cá thể đực và cái được nuôi riêng trong vòng 5 ngày. Trứng được thu được bằng cách đặt viên bi giữa cá và đáy của bể cá. Trứng sinh ra được giữ ở giữa các khe viên bi, do đó ngăn ngừa các cá trưởng thành ăn trứng. Sau đó kiểm tra kết quả thụ tinh dưới kính hiển vi, trứng không được thụ tinh, phôi không hoạt động đã được gỡ bỏ. Tiến hành cho cá ngựa vằn tiếp xúc với 1,0 mg/L kẽm clorua, kết quả cho thấy cá ngựa vằn nở sau 7 ngày thay vì 4 ngày đối với nhóm đối chứng không tiếp xúc với kẽm clorua, và các phôi còn lại chết mà không nở sau 11 và 12 ngày. Phôi phát triển bất thường, tỷ lệ trứng nở thấp, chậm nở, tỷ lệ ấu trùng mới nở và tỷ lệ sống của ấu trùng thấp cũng được quan sát ở những cá ngựa vằn có tiếp xúc với kẽm clorua [115]. Sự hiện diện của kim loại nặng trong các hệ sinh thái thủy sinh có thể gây trở ngại đáng kể với sự phân bố của các loài, chủ yếu là do độc tính cao của chúng tích tụ trong phôi cá và ấu trùng. Vì vậy, giai đoạn phôi và ấu trùng của cá ngựa vằn cung cấp một mô hình lý tưởng để nghiên cứu các tác hại của các kim loại nặng. Điều này cũng đưa ra khuyến cáo rằng con người nên có một biện pháp phòng ngừa cần thiết khi sử dụng các kim loại nặng để bảo vệ cá và động vật thủy sinh khác. Những thông tin này cũng rất hữu ích trong các nghiên cứu tiếp theo về hiệu ứng kim loại nặng lên cá hoặc xác định các tiêu chuẩn chất lượng nước để bảo vệ các sinh vật thủy sản cũng như giải quyết các vấn đề của chất độc thủy sản. Rõ ràng những nghiên cứu chuyên sâu về tác động lâu dài của các kim loại nặng trên cá ngựa vằn cần được khuyến khích và đầu tư.

Một nghiên cứu khác của Anandhan và cộng sự [116], cho thấy nhôm cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của cá ngựa vằn. Nồng độ thấp nhất của nhôm cũng có

thể gây hiệu ứng không thể phục hồi trong một thời gian dài cho các sinh vật thử nghiệm, các kim loại nặng trong môi trường là nguyên nhân làm giảm sự phát triển và gây phát triển bất thường như vẹo cột sống và hóa xương ức ở cá ngựa vằn.

Theo Govind và cộng sự [117] cho rằng Pb^{2+} gây độc tính ở động vật và cá. Chỉ xâm nhập vào trong các hệ thống nước thông qua dòng chảy, dòng chất thải công nghiệp và nước thải. Tiếp xúc với Pb^{2+} có thể gây ra nhiều tác hại khác nhau, phụ thuộc vào mức độ và thời gian tiếp xúc. Nồng độ Pb^{2+} tăng cao trong nước có thể gây thiệt hại cho sinh sản của một số động vật thủy sinh, cũng như gây ra các thay đổi trong hệ thần kinh và huyết học của động vật, cá.

Các nghiên cứu của Ansari cũng cho thấy cá ngựa vằn mà đặc biệt là giai đoạn đầu của nó rất nhạy cảm với các kim loại nặng (Zn, Ni và Cr) ở mức rất thấp và ảnh hưởng đáng kể tỷ lệ sinh sống. Nghiên cứu này cho rằng các kim loại có thể gây ra sự ức chế acetylcholinesterase, gây ảnh hưởng mạnh đến sự tăng trưởng, tỷ lệ nở, sinh tồn, nuôi dưỡng và sinh sản của cá [118].

Theo Zheng [119] khi cho cá ngựa vằn tiếp xúc với kẽm, cadmium sẽ gây ra các phản ứng khác nhau đối với quá trình oxy hóa trong gan của cá ngựa vằn. Trước khi thử nghiệm, cá ngựa vằn được duy trì trong thùng 20L trong 2 tuần để quen dần với môi trường sống. Sau đó cho cá ngựa vằn tiếp xúc với Zn và Cd ở nồng độ khoảng 30 và 5 mg/L (tương ứng 461,54mmol/L Zn và 44,48mmol/L Cd) trong 96h. Các thông số chất lượng nước trong quá trình thí nghiệm: nhiệt độ nước được duy trì tại $26,2 \pm 0,5^{\circ}C$; thời gian chiếu sáng là 12L:12D; oxy hòa tan và độ pH lần lượt là $7,26 \pm 0,64mg/L$ và $7,31 \pm 0,27$. Nồng độ Zn của nhóm đối chứng và nhóm xử lý là 16 ± 2 và $187 \pm 11mg/L$ (tương ứng là $0,25 \pm 0,03$ và $2,88 \pm 0,17mmol/L$). Nồng độ Cd cho nhóm đối chứng và nhóm xử lý là 0 và $28 \pm 2mg/L$ (tương ứng là 0 và $0,25 \pm 0,02mmol/L$). Thí nghiệm được lặp lại bốn lần, cá ngựa được cho ăn 3 lần mỗi ngày với thành phần thức ăn gồm 10,6% lipid, 42,4% protein, 7.83 $\mu g/g$ Zn và 0.03 $\mu g/g$ Cd. Sau 5 tuần, cá ngựa vằn đã tích lũy được 180mg/L Zn và 30 mg/L Cd (tương đương với 2,77mmol/L Zn và 0,27mmol/L Cd) trong cơ thể. Vào cuối giai đoạn 5 tuần, 24h sau khi cho ăn lần cuối, tất cả cá ngựa vằn được gây chết bằng 0,02% tricaine methanesulfonate (MS-222). Cân trọng

lượng và đo chiều dài cơ thể cá để xác định tỷ lệ tăng trưởng (SGR) và tỷ lệ sống ở hai nhóm nghiệm thức. Sau đó, một số mẫu gan được đông lạnh ở nitơ lỏng và lưu trữ ở -80°C cho đến khi thực hiện các thí nghiệm sinh hóa và RNA tách chiết.

Kết quả cho thấy tiếp xúc Zn mãn tính không ảnh hưởng trọng yếu đến sự tăng trưởng (trọng lượng cơ thể, chiều dài cơ thể, và SGR) và tỷ lệ sống. Ngược lại, tiếp xúc với Cd mãn tính ức chế trọng lượng cơ thể, SGR và tỷ lệ sống. Có một sự khác biệt trọng yếu trong chiều dài cơ thể giữa Zn nhóm tiếp xúc và Cd nhóm tiếp xúc.

Tại Việt Nam đã có rất nhiều công trình nghiên cứu kim loại nặng được công bố trên các lĩnh vực khác nhau nhưng ảnh hưởng của kim loại nặng lên động vật thủy sinh là rất ít, một vài công trình có thể kể đến như sau:

-Đánh giá tác động cadmium lên quá trình phát triển phôi cá ngựa vằn của Nguyễn Thị Thu Giang và cộng sự, 2012 [120]. Nhóm nghiên cứu đã đánh giá ảnh hưởng Cd qua nhịp tim, nhịp quẫy mình ở các nồng độ 0,1; 1; 5; 10; 20; 50 và $100\mu\text{g/L}$ [120]. Kết quả cho thấy các nồng độ này vẫn chưa phải là nồng độ gây chết phôi, phôi có tỉ lệ sống cao, cadmium làm tăng nhịp tim, đồng thời làm giảm nhịp quẫy mình [120].

-Khảo sát khả năng tích tụ cadmium trên cá ngựa vằn – *Danio rerio* (Hamilton, 1822) của tác giả Nguyễn Thị Thương Huyền và cộng sự, 2013 [121]. Khảo sát hàm lượng Cadmium tích tụ trên cơ thể cá ngựa vằn. Cá bột 7 ngày tuổi (đã gây nhiễm Cd trước đó) được nuôi trong môi trường nước chứa Cd với các nồng độ: $0\mu\text{g/L}$, $1\mu\text{g/L}$, $5\mu\text{g/L}$, $10\mu\text{g/L}$, $20\mu\text{g/L}$, $50\mu\text{g/L}$ trong 3 tháng [121]. Kết quả cho thấy hàm lượng Cd tích tụ trên toàn cơ thể và từng phần có xu hướng tỉ lệ thuận theo nồng độ [121]. Hàm lượng Cd tích tụ trong các mô giảm theo thứ tự sau: nội quan > xương > cơ, cụ thể hàm lượng này lần lượt là $10,813 \pm 0,263 \text{ mg/kg}$ đạt giá trị cao nhất ở nồng độ $50\mu\text{g/L}$; $2,053 \pm 0,031 \text{ mg/kg}$ và $0,607 \pm 0,015 \text{ mg/kg}$ đạt giá trị cao nhất khi cá được gây độc ở nồng độ $20\mu\text{g/L}$ [121].

-Đánh giá sự tác động của chì lên quá trình phát triển phôi cá ngựa vằn - *Danio rerio* (Hamilton, 1822) của tác giả Trần Thị Phương Dung, 2014 [122]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các nồng độ chì khảo sát trong nghiên cứu này chưa đủ mạnh để làm ngưỡng gây chết (LC₅₀) phôi cá ngựa vằn [122]. Tỷ lệ sống của phôi vẫn còn cao (88,28 – 92,81%). Tại các nồng độ chì khảo sát, nhịp tim tăng tuyến tính theo thứ tự các nồng độ khảo sát, trong khi nhịp quấy mình và tỉ lệ nở lại giảm tuyến tính [122].

-Đánh giá ảnh hưởng của kẽm lên sự sống cá ngựa vằn giai đoạn ấu trùng (1 - 7 ngày tuổi) của tác giả Nguyễn Thị Thương Huyền, Đoàn Lê Minh Hiền, 2016 [123]. Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ kẽm lên sự sống của ấu trùng cá ngựa vằn (1-7 ngày tuổi). Phôi cá ngựa vằn mới thụ tinh cho tiếp xúc với dung dịch muối kẽm ở 10 nồng độ khác nhau (1-10 mg/L) và lô đối chứng (0 mg/L) trong môi trường nước máy, sau khi nở, ấu trùng được nuôi trong môi trường có các nồng độ Zn tương ứng [123]. Kết quả cho thấy: (i) nồng độ 1 mg/L là ngưỡng ảnh hưởng đến tỉ lệ sống của ấu trùng; (ii) đã lập được phương trình tiên đoán tỉ lệ sống của ấu trùng cá ngựa vằn theo ảnh hưởng tương tác của nồng độ Zn và thời gian nuôi, xác định được giá trị LC_{t50} gây chết 50% ấu trùng từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7; (iii) Nhịp tim và kích thước ấu trùng cá ngựa vằn giảm tuyến tính theo sự gia tăng của nồng độ Zn khảo sát và thời gian nuôi [123].

-Đánh giá ảnh hưởng của asen lên sự phát triển phôi cá ngựa vằn (*Danio rerio*) của tác giả Nguyễn Thị Thương Huyền, Trần Thị Trúc Đào, Hoàng Nghĩa Sơn, 2018 [124]. Nhóm nghiên cứu đã đánh giá tác động của asen (As) lên quá trình phát triển phôi cá ngựa vằn, *Danio rerio*, ở các giai đoạn phân cắt, phôi nang, phôi vị, phân đốt, hình thành hầu họng và nở (thoát nang) [124]. Phôi cá ngựa vằn mới thụ tinh được gây nhiễm as ở 9 nồng độ (20, 50, 80, 110, 140, 170, 200, 230, 260 µg/L và lô đối chứng (0 µg/L) trong môi trường Hank's phôi. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống giảm theo sự tăng dần nồng độ as và các giai đoạn của phôi, tuy nhiên các nồng độ as khảo sát chưa phải là ngưỡng gây chết LC_{t50} của phôi cá ngựa vằn [124]. Tại các nồng độ khảo sát, nhịp tim tăng theo thứ tự các nồng độ khảo sát, đạt cao nhất tại nồng độ 260µg/L ở giai đoạn nở của phôi ($237,73 \pm 1,87$ nhịp/phút so với $197,60 \pm 2,20$ nhịp/phút ở lô đối chứng, $p < 0,05$). As làm giảm tần số quấy

minh của mỗi giai đoạn theo chiều tăng dần nồng độ, thấp nhất ở giai đoạn hậu hộng (2,53 nhip/phút so với 5,50 nhip/phút ở lô đối chứng, $p < 0,05$); đồng thời, As làm chậm và làm giảm tỷ lệ nở của phôi (tỷ lệ nở còn 77,78% ở nồng độ 260 $\mu\text{g/L}$ so với 98,86% ở lô đối chứng, sau 72h thụ tinh, $p < 0,05$) [124].

Từ các công trình nghiên cứu trên thế giới và tại Việt Nam nhiều tác giả đã đánh giá tác động kim loại nặng như cadmium, asen, chì, kẽm đối với sự phát triển của phôi và ấu trùng của cá ngựa vằn ở các nồng độ (0,1, 1, 5, 10, 20, 50, 80, 100, 110, 140, 170, 200, 230, 260 $\mu\text{g/L}$). Nhưng hiện nay vẫn chưa có công trình nghiên cứu độc học nào nghiên cứu đầy đủ các giai đoạn phát triển của cá ngựa vằn (giai đoạn 24h, 48h, 72h, 168h) để xác định tỷ lệ sống, tích tụ, cấu trúc mô ruột và buồng trứng, sự thay đổi cấu trúc gen và nhịp tim. Vì vậy, tác giả đã tiến hành thử nghiệm để đánh giá tác động của chì (Pb^{2+}) đến các nồng độ khác nhau (0,1, 1, 10, 20, 100 $\mu\text{g/L}$) trong quá trình phát triển của cá ngựa vằn, đồng thời sử dụng nước không chứa chì (Pb^{2+}) làm đối chứng.

Để hiểu sâu hơn về ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên cá ngựa vằn cần có nghiên cứu về tác động của nó lên tất cả quá trình phát triển từ phôi cho đến cá trưởng thành như: tỷ lệ sống, tích tụ, cấu trúc mô ruột và buồng trứng, sự thay đổi cấu trúc gen, nhịp tim,... từ đó rút ra ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên cơ thể con người.

1.1.6. Các con đường tích lũy của chì (Pb^{2+}) trong cá

Chì được tích lũy trong cá thông qua quá trình hô hấp, tiêu hóa, qua da, qua các cơ quan bị tổn thương.

Qua đường hô hấp: Chì được xâm nhập vào cơ thể cá qua mang, độc tố sẽ thấm chủ yếu qua các mạch máu trong mang. Độc chất chì theo máu trực tiếp đi đến các bộ phận khác của cơ thể mà không qua gan để giải độc.

Qua đường tiêu hóa: Độc tố chì tồn tại trong thức ăn, trong nước sẽ đi vào khoan miệng, sau đó đến dạ dày, ruột non, gan,... Trong ruột các phân tử có kích thước nhỏ sẽ đi qua khe hở tế bào chất của ruột non để đi vào máu. Một phần độc chất sẽ đi vào gan, gan sẽ nhiễm độc một phần và chuyển qua mật, mật trả về hệ tiêu hóa và thải ra bên ngoài qua hệ thống ruột già.

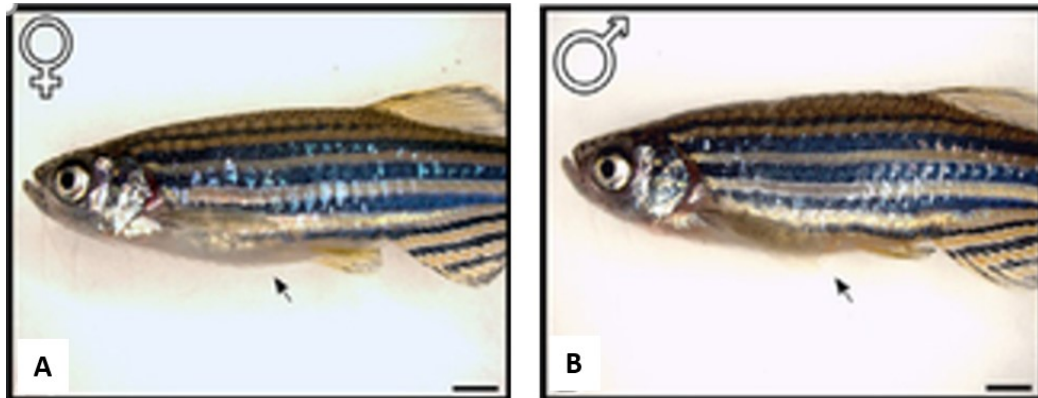
Qua da: Da bảo vệ cơ thể khỏi các tác động của sinh học, hóa học và vật lý. Đối với cá tùy theo độ dày của da và hàm lượng độc tố có trong môi trường mà độc chất xâm nhập qua da nhanh hay chậm. Nếu da mỏng hoặc bị tổn thương thì khả năng xâm nhập độc chất vào cơ thể càng nhanh.

1.2. Tổng quan về cá ngựa vằn

1.2.1. Nhận biết giới tính

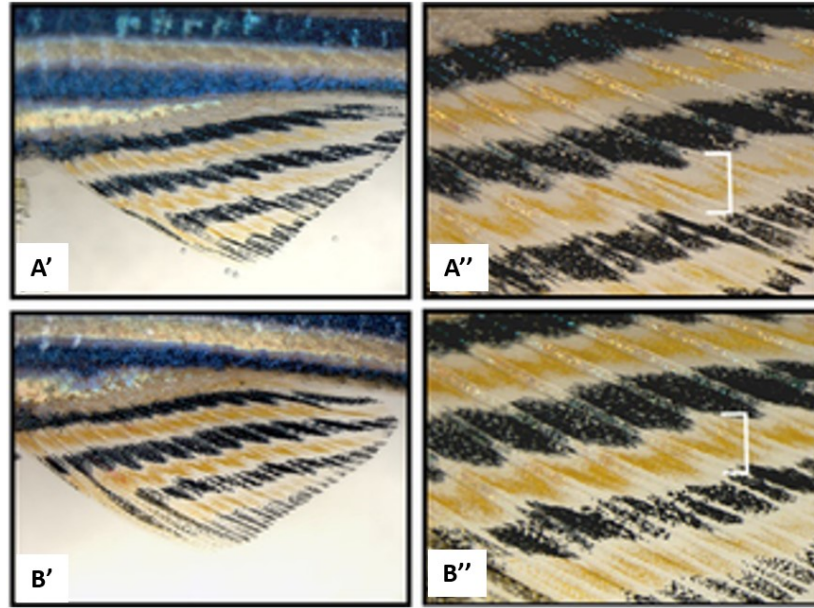
Phân biệt cá ngựa vằn trưởng thành đực và cái dựa trên đặc điểm về hình thái, giới tính. Dựa vào hình bên ngoài để xác định giới tính của cá ngựa vằn trưởng thành được mô tả ở đây.

Thứ nhất, bởi vì buồng trứng lớn hơn đáng kể so với tinh hoàn, cá cái có bụng lớn hơn cá đực.



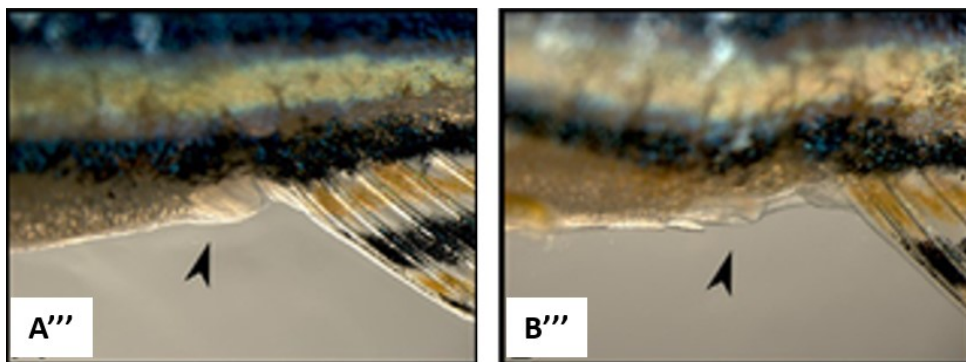
Hình 1.1. Hình ảnh phân loại cá qua bụng; A-Hình cá cái; B-Hình cá đực

Thứ hai là màu sắc lưỡng hình của vây hậu môn và bụng. Một trong những loại tế bào sắc tố chính ở cá ngựa vằn là xanthophores, tạo thành một dải sắc tố màu vàng nằm giữa các sọc sắc tố đen đặc trưng do melanophores tạo thành nên tên gọi của chúng là cá ngựa vằn. Trong khi xanthophores có ở cả con đực và con cái, con đực tạo ra nhiều sắc tố màu vàng hơn con cái, và do đó nó có màu vàng hơn khi nhìn dưới ánh sáng thích hợp, sự khác biệt màu sắc rõ nhất ở vây hậu môn.



Hình 1.2. Hình ảnh phân biệt cá quá màu sắc

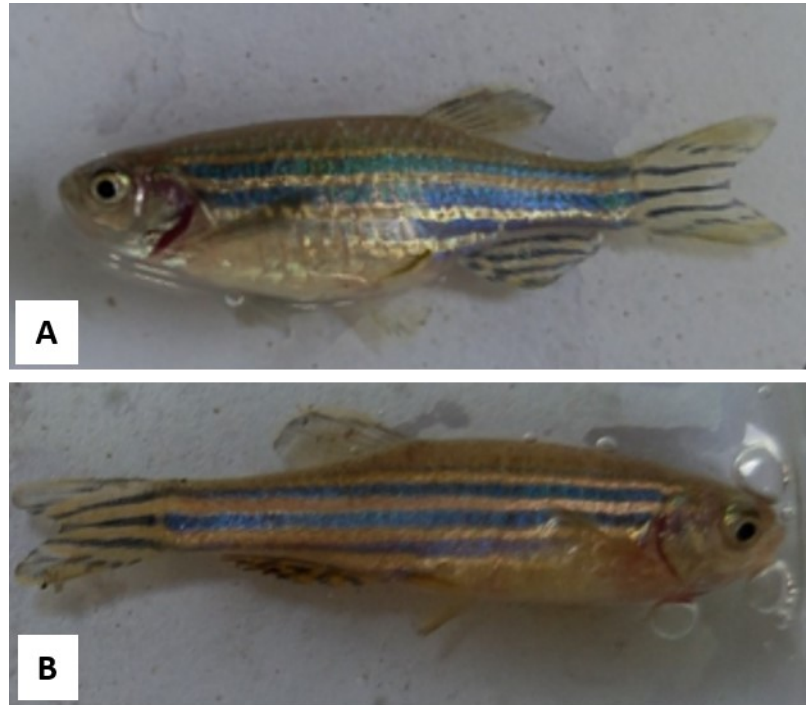
Thứ ba dựa vào lỗ sinh dục để phân biệt cá đực, cá cái. Cá đực, cá cái đều có lỗ sinh dục nằm trên đường giữa bụng ngay trước vây hậu môn và sau hậu môn, lỗ sinh dục là lỗ thông qua đó các giao tử được giải phóng. Khi quan sát với sự hỗ trợ của kính hiển vi soi, lỗ sinh dục cái nhô ra khỏi bề mặt cơ thể và có những đường gờ dọc đặc trưng, ngược lại lỗ sinh dục của con đực không nhô ra khỏi bề mặt cơ thể và do đó chỉ có thể nhìn thấy khi nhìn từ bề mặt bụng. Cuối cùng có những cấu trúc lưỡng hình tinh tế hơn, chẳng hạn như sự hiện diện của các nốt lao giao phối trên bề mặt lưng của vây ngực con đực, nhưng chúng khó quan sát hơn và do đó ít được sử dụng để phân biệt giữa các giới tính [125].



Hình 1.3. Xác định giới tính cá thông qua lỗ sinh dục

Thứ tư là quan sát màu nền của cá và tập tính. Cá đực có xu hướng màu hồng hoặc vàng nhạt trong khi cá cái có màu xanh và trắng nhiều hơn. Kiểm tra hình dáng cơ thể cá: cá đực thường thân mình mỏng hơn trong khi cá cái có thân mình

dày hơn. Khi quan sát cá vào mỗi buổi sáng, cá đực sẽ đuổi theo cá cái trước khi chúng giao phối.



Hình 1.4. Phân biệt giới tính cá ngựa vằn trưởng thành; A-Cá ngựa vằn cái;
B-Cá ngựa vằn đực

1.2.2. Sử dụng động vật thí nghiệm trong khảo sát độc tố

Dùng động vật khảo sát độc tính hóa chất và các mối nguy hại cho môi trường, người ta thường sử dụng động vật có vú để đánh giá, trong những năm qua mô hình độc tính thí nghiệm trên cá cũng đã phổ biến. Nghiên cứu trên động vật ngày càng bị hạn chế, các phương pháp thử nghiệm giảm thiểu sự đau đớn và khổ sở của động vật thí nghiệm và các thử nghiệm thay thế trên động vật đã được phê duyệt được sử dụng càng nhiều càng tốt [126]. Hơn nữa, theo quy định thì đây là thử nghiệm bắt buộc với những chất có khối lượng sản xuất từ 1 tấn/năm trở lên trước khi được cấp phép [127].

Nhiều loài cá khác nhau được sử dụng như sinh vật mô hình trong đánh giá độc tính sinh thái (ecotoxicology) được đề xuất trong các tài liệu hướng dẫn của tổ chức OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) như: cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*), cá tuế đầu bẹt (*Pimephales promelas*), bluegill (*Lepomis macrochirus*), cá ngựa vằn (*Danio rerio*), medaka (*Oryzias latipes*), cá

bảy màu (*Poecilia reticulata*), và cá chép (*Cyprinus carpio*) [127]. Thực tế, không một loài duy nhất có thử nghiệm cho tất cả các chất và nếu chỉ sử dụng giá trị LC₅₀ từ một loài thì khó đảm bảo độ chính xác về mức độ độc hại của hóa chất [128]. Trong những năm qua, nhiều nỗ lực đáng kể đã được nhiều nhà khoa học thực hiện nhằm phát triển mô hình cá ngựa vằn như một phương pháp thay thế động vật trong các thí nghiệm. Pháp lý quản lý hóa chất mới của châu Âu (REACH) ủng hộ phương pháp thay thế các thử nghiệm trên động vật nếu có thể [129].

1.2.3. Tại sao sử dụng cá ngựa vằn trong khảo sát độc tố

Cá được phân loại là lớp động vật thủy sinh có xương sống chủ yếu và là một thành phần không thể thiếu cho các chiến lược kiểm tra độc tố. Trên thực tế, không những cá có cơ thể khác với các loài động vật có xương sống mà còn khác với hầu hết các loài không xương sống về khả năng trao đổi chất, khả năng chuyển hóa sinh học các chất hóa học. Hơn nữa, khi ở trong môi trường có độ ô nhiễm và tần suất sự cố tràn hóa chất cao, cá thường là mục tiêu để đánh giá mức độ ô nhiễm. Điểm cuối cùng nhưng không kém phần quan trọng đó là từ lâu theo quan điểm của con người, cá đã được coi là linh canh chất lượng nước phục vụ nhu cầu ăn uống của con người. Cá có tầm quan trọng trong việc giám sát ô nhiễm môi trường nước, do đó cá được sử dụng mạnh mẽ trong các quy định về kiểm tra độc tính thủy sản.

Mô hình thử độc tính trên động vật có vú bậc cao (như: chuột, thỏ,...) là giải pháp hiệu quả nhưng bị hạn chế bởi các vấn đề về đạo đức nghiên cứu, ngân sách và thời gian [130]. Trong những thập niên gần đây, mô hình thử độc trên phôi cá ngựa vằn (*Danio rerio*) đã khắc phục những khó khăn trên (sinh sản nhanh, dễ nuôi trong phòng thí nghiệm, 85% hệ gen tương đồng với hệ gen người và quá trình phát triển phôi tương tự như ở động vật bậc cao) [131], [130].

Trong hai thập niên qua, cá ngựa vằn hay được sử dụng trong các nghiên cứu y học, nguyên nhân là do các yếu tố về gen như tuổi thọ ngắn và phôi của chúng là trong suốt [130]. Cá ngựa vằn từ trước tới nay được sử dụng trong các nghiên cứu khoa học về phát triển phương thuốc chữa hoặc ngăn ngừa ung thư, u ác tính và bệnh tim mạch [130]. Phôi cá ngựa vằn là mô hình thử độc tính đầy hứa hẹn có thể khắc phục được những khó khăn trên, phôi cá ngựa vằn 4-5 ngày sau thụ tinh vẫn chưa được coi là động vật do đó không bị ràng buộc bởi các quy định nghiêm ngặt đối với động vật thí nghiệm, phôi có thể quan sát bằng mắt thường, số lượng phôi

trong một chu kỳ sinh sản lớn, sự phát triển phôi sớm và hình thành cơ quan ở cá ngựa vằn rất giống với các động vật có xương sống khác nhưng tốc độ phát triển nhanh: chỉ sau 3 ngày từ phôi đã phát triển thành ấu thể; phôi cá trong suốt cho phép quan sát được sự ảnh hưởng của hóa chất trong suốt quá trình phát triển phôi sớm [132], [130]. Bộ gen cá ngựa vằn cũng có nhiều điểm tương đồng với động vật có xương sống cao hơn, đặc biệt có trên 12 nghìn gen tương đồng với con người [131], [130]. Ngoài ra, mô hình phôi cá ngựa vằn không chỉ có thể đưa ra dự đoán nguy cơ đối với sức khỏe con người mà còn cho phép đánh giá các ảnh hưởng đến môi trường nói chung [133]. Vì thế mô hình này ngày càng nhận được sự chú ý của các nhà khoa học trong thử nghiệm độc tính.

Trong các nghiên cứu y khoa, nghiên cứu ảnh hưởng của các loại thuốc kháng sinh đến các giai đoạn phát triển phôi cá ngựa vằn là mô hình hữu ích mô phỏng sự tiếp xúc thụ động của các loại thuốc kháng sinh tác động đến thai nhi [134] (Dương Thùy Linh và cộng sự, 2016). Trong các nghiên cứu sinh học, nghiên cứu ảnh hưởng của các loại hóa chất đóng vai trò là phụ gia thực phẩm, các chất chống oxy hóa, các chất tạo màu, các chất điều vị, các chất bảo quản thực phẩm,... như: sodium benzoate, propyl gallate, tartrazine, amaranth, monosodium glutamate và formaldehyde trên mô hình phát triển phôi cá ngựa vằn [135].

Phôi cá ngựa vằn là mô hình thay thế đầy hứa hẹn có thể khắc phục được những khó khăn trên. McKim sau khi tham khảo 150 nghiên cứu độc học sử dụng các giai đoạn sống khác nhau của cá, ông cho rằng sự ảnh hưởng ở các giai đoạn đầu có thể được dùng để dự đoán cho ít nhất 80% kết quả độc tính ảnh hưởng lâu dài [136]. Theo hướng dẫn OECD 236 năm 2013, thử nghiệm áp dụng trên phôi cá chỉ kéo dài 4-5 ngày [137]. Trong thời gian này, ấu thể cá chưa có khả năng tự kiếm ăn được nên chưa được coi là một cơ thể động vật [137]. Do đó việc sử dụng phôi không bị ràng buộc bởi các quy định nghiêm ngặt đối với động vật thí nghiệm. Hơn nữa, một cá cái có thể đẻ được từ 50 – 200 trứng mỗi lần ghép [138]. Vì vậy, một lượng lớn phôi có thể được sinh ra một cách chủ động trong phòng thí nghiệm nên có khả năng dùng phôi đánh giá số lượng lớn các chất thí nghiệm. Thời gian tiến hành thí nghiệm cũng như lượng hóa chất sử dụng ít hơn nhiều so với việc đánh giá độc tính trên cá do thực hiện trên đĩa nuôi cấy 24 giếng [137]. Trong quá trình phát triển cá ngựa vằn, phôi hình thành sớm và một số cơ quan ở cá ngựa vằn khá giống với các động vật có xương sống khác nhưng tốc độ phát triển nhanh hơn: sau 3 ngày từ phôi đã phát triển thành ấu thể và nhiều các cơ quan đã hoàn thiện về chức năng,

bên cạnh đó phôi cá trong suốt cho phép quan sát được sự ảnh hưởng của hóa chất trong quá trình phát triển phôi sớm [138].

Cá ngựa vằn là sinh vật được sử dụng phổ biến ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới từ khá lâu và trình tự hệ gen đã được giải mã đầy đủ. Các phân tích trên hệ gen cá ngựa vằn cho thấy có trên 12 nghìn gen tương đồng với hệ gen người và khoảng 70% gen của người có ít nhất một gen tương đồng trên cá ngựa vằn [131].

Có nhiều cấp độ, tiêu chí có thể được thực hiện trong các thử nghiệm trên mô hình cá ngựa vằn. Cấp độ đánh giá đơn giản nhất là dựa trên các tác động của hóa chất đến hình thái bên ngoài của phôi và ấu thể cá ngựa vằn. Đa số các loại hóa chất đều có thể gây độc tùy thuộc vào liều lượng, nồng độ sử dụng. Ở một ngưỡng nào đó, tác động của chúng sẽ biểu hiện ra hình thái bên ngoài gây dị tật, quái thai hoặc ảnh hưởng đến sức sống của phôi/ấu trùng thí nghiệm. Đích tác động và cũng là tiêu chí quan sát để so sánh với đối chứng rất đa dạng: có thể là mắt, vùng tim, vùng noãn hoàng, hình dạng trục cơ thể,... Số liệu thu được sẽ được phân tích thống kê để xây dựng đường cong thể hiện sự đáp ứng với các nồng độ thí nghiệm và tính một số chỉ số độc học như giá trị LC_{50} (Median lethal concentration) là nồng độ của chất thử gây chết 50% tổng số phôi trong lô thí nghiệm hoặc giá trị EC_{50} (Median effective concentration) là nồng độ chất thử gây dị dạng 50% số phôi sống sót [137].

Nhiều sàng lọc di truyền quy mô lớn đã phát hiện nhiều đột biến gen cá ngựa vằn tương đồng với những đột biến gen gây bệnh ở người, từ đó gây ra các dạng kiểu hình giống nhau, ví dụ như bệnh lý tế bào của đột biến thoái hóa cơ cá ngựa vằn biểu hiện tương tự chứng loạn dưỡng cơ ở người. Một trong những đột biến là sapie - đột biến mang khiếm khuyết làm suy yếu gen dystrophin ở cá ngựa vằn, cái mà tương đồng với gen người khi bị ảnh hưởng trong hội chứng loạn dưỡng cơ Duchenne – một dạng thường gặp của hội chứng loạn dưỡng cơ ở người [139]. Khi phơi nhiễm với cùng loại hóa chất, các đặc điểm hình thái quan sát được trên phôi cá ngựa vằn cũng có nhiều điểm tương đồng với các bệnh trên con người. Ví dụ, Ethanol gây hiện tượng cyclopia – hiện tượng hai mắt gần sát nhau trên ấu thể cá ngựa vằn khi phơi nhiễm từ giai đoạn phôi vị cũng là một loại kiểu hình được quan sát thấy ở các em bé tiếp xúc với nồng độ cồn cao trong thời gian ở trong bụng mẹ [140]. Ethanol cũng gây ra các khiếm khuyết thị giác ở ấu thể cá ngựa vằn và sự ảnh hưởng tương tự cũng được ghi nhận ở người. Do đó, hình thái phôi cá ngựa vằn

phôi nhiễm với hóa chất cũng có thể được sử dụng để dự đoán tác động của hóa chất trên cơ thể người. Năm 2009, với mục tiêu đưa ra một sự ủng hộ có tính khoa học cho việc thay thế các thử nghiệm độc cấp tính trên cá trưởng thành [137] bằng thử nghiệm trên phôi cá, Lammer và cộng sự đã tiến hành thu thập các kết quả các nghiên cứu áp dụng mô hình thử nghiệm trên một số loài cá theo hướng dẫn của OECD trong đó có cá ngựa vằn đã được công bố trên cơ sở dữ liệu US EPA ECOTOX và cơ sở dữ liệu ECETOC.

Lammer và cộng sự đã dùng độc tố thủy sinh để so sánh với kết quả từ các nghiên cứu trên mô hình phôi các loài cá [141]. Kết quả phân tích cho thấy mô hình phôi cá ngựa vằn có sự tương đồng cao với mô hình thí nghiệm trên cá ngựa vằn trưởng thành nói riêng cũng như với các loài cá nói chung. Điều này cũng chứng tỏ rằng phôi cá ngựa vằn là mô hình hiệu quả có thể thay thế cho các phương pháp đánh giá sử dụng động vật thí nghiệm. Trong quá trình phát triển phôi được hình thành sớm, bắt đầu từ khoảng 30-36h sau thụ tinh thì tim phôi bắt đầu đập những nhịp đầu tiên. Sau đó, tim đập dần đều và theo một chu kỳ rõ ràng hơn. Việc phơi nhiễm với hóa chất cũng có thể ảnh hưởng đến chức năng của tim, điều đó được biểu hiện bởi số nhịp tim trong một phút. Nhịp tim cũng là một trong những tiêu chí quan trọng đánh giá ảnh hưởng chức năng tim cũng như các nghiên cứu sàng lọc thuốc ở cá ngựa vằn [142].

Ngoài chức năng của tim, chức năng của một số cơ quan khác như gan, thận, mắt cũng được đánh giá trong quá trình phát triển phôi cá ngựa vằn [143]. Để nghiên cứu sự ảnh hưởng đến hệ vận động cũng như ảnh hưởng đến thần kinh, biểu hiện hành vi của ấu thể cá khi phơi nhiễm với hóa chất là tiêu chí được lựa chọn. Các thử nghiệm chức năng cơ quan, hệ cơ quan có thể cho độ nhạy cao hơn so với các đánh giá hình thái thông thường. Những nghiên cứu chuyên sâu hơn được áp dụng trên mô hình này là đánh giá mức độ biểu hiện của gen, protein bằng các phương pháp RT-PCR, lai tại chỗ. Chuyên gen sử dụng các công cụ hướng đích mới như Zinc-finger [144]. CRISPR [145] cũng có thể áp dụng trên mô hình phôi cá ngựa vằn để nghiên cứu sự thay đổi di truyền và ung thư. Ngoài ra, việc nghiên cứu một số quá trình sinh học như saponin, lưu thông máu trong mạch, sự hình thành xương trên phôi ấu thể cá cũng được nghiên cứu bằng cách nhuộm với các thuốc nhuộm đặc hiệu. Mô hình phôi cá ngựa vằn còn được ứng dụng trong việc sàng lọc các phân tử nhỏ có hoạt tính sinh học hoặc sàng lọc thuốc [146], [147].

Theo nghiên cứu [148] và cộng sự cho thấy rằng cá ngựa vằn ấu trùng tiếp xúc với Pb (có nồng độ trung bình 3 $\mu\text{g/L}$ với tối đa 94 $\mu\text{g/L}$) có liên quan đến biểu hiện sự thay đổi của toàn bộ hồ sơ hành vi nhiều hơn đến các kiểu biểu hiện bị xáo trộn về mức độ mRNA của các gen chính liên quan đến chất chống oxy hóa (HO-1, Ucp-2 và CoxI), gen proapoptotic (TP53) và gen antiapoptotic (Bcl-2).

Theo nghiên cứu Kiyun Park và cộng sự [149] ảnh hưởng của độc tính chì (Pb) do ứng suất nhiệt gây ra đối với sự chết tế bào apoptotic, phản ứng viêm, bảo vệ oxy hóa và quá trình methyl hóa DNA ở phôi cá ngựa vằn (*Danio rerio*) kết quả nghiên cứu đã kiểm tra các tác động tiềm ẩn của việc tiếp xúc với Pb trong điều kiện căng thẳng nhiệt (34°C) ở phôi cá ngựa vằn (*Danio rerio*), ứng suất nhiệt ở 34°C làm giảm đáng kể tỷ lệ sống sót, mặc dù việc tiếp xúc với Pb ở 26°C làm giảm tỷ lệ sống sót của phôi. Các dị tật, chẳng hạn như hình dạng cơ thể cong, đã tăng lên khi tiếp xúc với sự kết hợp của Pb và stress nhiệt. Sự kết hợp của Pb và stress nhiệt cũng làm giảm nhịp tim [149]. Hơn nữa, phơi nhiễm Pb và nhiệt độ cao gây ra sự điều chỉnh tăng của các bản phiên mã SOD, CAT, TNF- α , IL-1 β , P53 và BAX, đồng thời điều chỉnh giảm các bản phiên mã Dnmt1 và Dnmt3b. Sự ức chế phiên mã của các gen liên quan đến quá trình methyl hóa DNA có thể đóng vai trò là yếu tố quan trọng góp phần vào khả năng thích ứng biểu sinh bằng cách thay đổi căng thẳng kết hợp [149].

Theo nghiên cứu Vittoria Curcio và cộng sự [150] nghiên cứu sự thay đổi về hình thái và phân tử do chì gây ra trong phôi và ấu trùng của *Danio rerio*, phôi được tiếp xúc với hai nồng độ chì (2,5 và 5 $\mu\text{g/L}$) từ 6 giờ sau khi thụ tinh và được phân tích sau 48, 96 và 144 giờ. Sự bất thường về hình thái phát sinh sau 48 giờ, tỷ lệ và cường độ phụ thuộc vào liều lượng và thời gian [150]. Biến dạng cột sống và đuôi là những thay đổi được phát hiện thường xuyên nhất là gen SOD và MT [150].

1.3. Xác định mức độ biểu hiện các gen liên quan đến quá trình apoptosis

Real time RT-PCR là một kỹ thuật phân tích mức độ biểu hiện gen, dựa trên cơ chế PCR (phản ứng chuỗi tự nhân) và sự kết hợp với các phản ứng chuỗi ngược (RT - Reverse Transcriptase) để biến đổi RNA thành DNA. Sau đó, mức độ biểu hiện của gen cần xác định được đo bằng cách so sánh với một chuẩn độ nội bộ như chuẩn độ GAPDH (một loại gen được tìm thấy trong hầu hết các tế bào và được biết đến là ổn định trong suốt quá trình biểu hiện gen).

Chì (Pb^{2+}) là một kim loại nặng độc hại và có khả năng gây ảnh hưởng tiêu cực đến cấu trúc mô và chức năng của các tế bào trong cơ thể. Nghiên cứu đã chỉ ra

ràng chì (Pb^{2+}) gây ảnh hưởng đến biểu hiện của một số gen trong cơ thể cá, bao gồm *GADD45A*, *GADD45G*, *SOD1*, *SOD2* và *MT2*.

1.3.1. Gen *GADD45A*, *GADD45G*

Gen *GADD45A* là thành viên của một nhóm gen *GADD45*, có mức độ phiên mã được tăng lên sau điều kiện stress tăng và điều trị bằng các tác nhân gây tổn hại DNA (mutagens). Sự sao chép gây tổn thương DNA của gen này được trung gian bởi cơ chế phụ thuộc P53. Protein được mã hóa bởi gen này phản ứng với các căng thẳng môi trường bằng cách trung gian kích hoạt con đường P38/JNK thông qua MTK1/MEKK4 kinase [151]. Thực tế là sự biểu hiện của gen này là một chỉ số về tổn thương DNA đã được dùng làm thử nghiệm *in vitro* cho tính đột biến, xét nghiệm *GADD45A*-GFP GreenScreen HC. Xét nghiệm này bao gồm một dòng tế bào đã được thiết kế sao cho biểu hiện của *GADD45A* sẽ dẫn đến biểu hiện protein huỳnh quang màu xanh lá cây, có thể dễ dàng phát hiện. Để kiểm tra một chất gây đột biến, nó được áp dụng cho các tế bào này và đo huỳnh quang [152]. *GADD45A* (Bất giữ tăng trưởng và tổn thương DNA gây tổn thương Alpha) là một gen mã hóa protein. Các bệnh liên quan đến *GADD45A* bao gồm bệnh tuyến tiền liệt và ung thư tuyến tụy. Trong số các con đường liên quan của nó là ung thư nội mạc tử cung và phản ứng tổn thương DNA. Một paralog quan trọng của gen này là *GADD45G* [152].

Gen *GADD45G* là thành viên của một nhóm các gen có mức độ phiên mã được tăng lên sau các điều kiện bất giữ tăng trưởng căng thẳng và điều trị bằng các tác nhân gây tổn hại DNA. Protein được mã hóa bởi gen này phản ứng với môi trường bằng cách trung gian kích hoạt con đường P38/JNK thông qua MTK1/MEKK4 kinase. Gen *GADD45G* được thể hiện cao trong nhau thai [151]. *GADD45G* là một gen mã hóa protein có tên đầy đủ là "Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Gamma". Các bệnh liên quan đến gen này bao gồm Adenoma tuyến yên, ung thư nội mạc tử cung và phản ứng tổn thương DNA. *GADD45A* là một gen có liên quan đến gen *GADD45G*. *GADD45G* tham gia vào nhiều quá trình khác nhau, bao gồm phát triển tình dục và phát triển não đặc trưng của con người. Ngoài ra, gen này còn có vai trò trong ức chế khối u và phản ứng căng thẳng của tế bào [153]. *GADD45G* tương tác với một số protein khác có liên quan đến sửa chữa DNA, kiểm soát chu kỳ tế bào, apoptosis và lão hóa [154]. Biểu hiện thấp của

GADD45G có liên quan đến nhiều loại ung thư [153]. Gen này đóng một vai trò trong quy định chu kỳ tế bào. *GADD45G* ngăn chặn khả năng kinase của phức hợp cyclin b1/Cdk1 theo cách không phá vỡ phức tạp. Nó đóng một vai trò trong sự hoạt hóa của S và G2/M trạm kiểm soát. Trong con đường phát triển giới tính nam, *GADD45G* rất cần thiết để kích hoạt SRY, dẫn đến sự hình thành thích hợp của tuyến sinh dục và xác định giới tính. Điều này có thể xảy ra thông qua tương tác *GADD45G* với đường dẫn tín hiệu MAPK P38 [153]. Việc xóa một chất tăng cường gắn với gen *GADD45G* có liên quan đến sự tăng sinh của các tế bào thần kinh, có thể chiếm một phần của sự khác biệt trong sự phát triển thần kinh giữa người và các loài khác. *GADD45G* có liên quan đến sự tăng sinh tế bào biểu mô răng. *GADD45G* được thể hiện trong các nút men, nơi nó điều chỉnh sự biểu hiện gen và sự phát triển của tế bào. Gen này điều chỉnh sự tăng sinh tế bào biểu mô qua trung gian P21 bằng cách kích hoạt con đường MAPK P38 trong quá trình phát triển của răng. Có sự biểu hiện khác biệt tương đồng *Xenopus* của *GADD45G* trong phát triển phôi. Nó đóng một vai trò lớn trong sự phát triển thần kinh và não với *GADD45A*. *GADD45G* và *GADD45A* có liên quan đến tăng trưởng đầu khiếm khuyết, và trực ngắn hơn. *GADD45G* và *GADD45A* hoạt động dự phòng để kiểm soát sự phát triển của tế bào, cho phép các tế bào di chuyển đa năng giúp các tế bào phân biệt [155]

1.3.2. Gen *SOD1*, *SOD2*

Gen *SOD1* (superoxide dismutase 1) mã hóa protein bởi gen này gắn với các ion đồng và kẽm và là một isozyme để phá vỡ các phân tử oxy tích điện, tiêu diệt gốc superoxide tự do. Isozyme được mã hóa là một protein không gian liên màng tế bào và ty thể hòa tan, hoạt động như một chất đồng hóa để chuyển đổi các gốc superoxide tự nhiên, nhưng có hại thành oxy phân tử và hydro peroxide. Hydrogen peroxide sau đó có thể bị phá vỡ bởi một enzyme khác gọi là catalase. *SOD1* đã được đặt ra để định vị vào màng ngoài ty thể (OMM), nơi các anion superoxide sẽ được tạo ra, hoặc không gian giữa các màng tế bào. Các cơ chế chính xác cho bên trong tế bào vẫn chưa được biết, nhưng sự kết hợp của nó với màng ngoài ty thể đã cho sự liên kết của nó với BCL-2. *SOD1* đã chứng minh tính chất chống ung thư trong nuôi cấy thần kinh, trong khi *SOD1* đột biến đã được quan sát thấy để thúc đẩy apoptosis trong ty thể của tủy sống, nhưng không phải trong ty thể của gan, mặc

dù nó được biểu hiện như nhau ở cả hai. Hai mô hình đề xuất *SOD1* ức chế apoptosis bằng cách tương tác với protein BCL-2 hoặc chính ty thể. *SOD1* là mấu chốt trong việc giải phóng các loại oxy phản ứng (ROS) khi bị stress oxy hóa do chấn thương do thiếu máu cục bộ, đặc biệt ở cơ tim là một phần của cơn đau tim. Chuột thiếu *SOD1* làm giảm khối lượng kích thước cơ bắp, phát triển sớm đực thủy tinh thể, thoái hóa đốm vàng, xâm lấn tuyến ức, ung thư tế bào gan và rút ngắn tuổi thọ. Nghiên cứu cho thấy rằng mức *SOD1* tăng có thể là một dấu ấn sinh học cho độc tính kim loại nặng [156]. Cá ngựa vằn trong giai đoạn đầu phát triển, sự hiện diện của *SOD1* đột biến đã gây ứng chế tế bào thần kinh, kích thích các biểu hiện căng thẳng trên nó [157]. Một mô hình di truyền của bệnh xơ cứng teo cơ bên trong cá ngựa vằn hiển thị các dấu hiệu kiểu hình của bệnh motoneuron, sự đột biến quá mức của *SOD1* gây motoneuron tùy sống bị mất, thoái hóa cơ, giảm sức chịu đựng, tê liệt một phần và chết sớm, nghiên cứu này có chỉ ra sự biểu hiện quá mức của *SOD1* ở động vật có xương sống dẫn đến sự phát triển của các bệnh lý phổ biến. Ở chuột *SOD1* đột biến, quá trình oxy hóa mRNA tăng đã được quan sát trong tế bào thần kinh vận động tùy sống [158].

Gen *SOD2* là một thành viên của họ superoxide mangutase. Nó mã hóa một protein ty thể tạo thành một homotetramer và liên kết một ion mangan trên mỗi tiểu đơn vị. Protein này liên kết với các sản phẩm phụ superoxide của quá trình phosphoryl oxy hóa và chuyển đổi chúng thành hydro peroxide và oxy diatomic. *SOD2* phá hủy các gốc anion superoxide thường được sản xuất trong các tế bào và gây độc cho hệ thống sinh học. Đột biến trong gen này liên quan đến nhiều bệnh như cơ tim vô căn (IDC), lão hóa sớm, bệnh thần kinh và ung thư. Gen này có nhiều biến thể phiên mã đã được xác định trên nhiễm sắc thể. Superoxide disutase là một loại enzyme giúp biến đổi gốc superoxide thành oxy thông thường hoặc hydro peroxide. Superoxide được tạo ra như một sản phẩm phụ trong quá trình chuyển hóa oxy và nếu không được điều tiết sẽ gây tổn thương tế bào, *SOD2* có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ chống lại stress oxy hóa, bức xạ ion hóa và các cytokine gây viêm. Nó được tìm thấy trong ty thể và giúp loại bỏ các gốc tự do được tạo ra bằng cách biến đổi superoxide thành hydro peroxide và oxy ít độc hơn, bảo vệ tế bào khỏi sự chết và các phản ứng oxy hóa. Chuột thiếu *SOD2* chết ngay sau khi sinh giữa lúc bị stress oxy hóa lớn, tuy nhiên chuột thiếu 50% *SOD2* có tuổi thọ bình

thường và các khuyết tật tối thiểu nhưng tổn thương DNA tăng và tỷ lệ mắc ung thư tăng [159], [160]. Ở chuột, việc sản xuất quá mức *SOD2* đã được chứng minh là tăng 20% tuổi thọ. Superoxide có một vài chức năng rất tích cực trong cơ thể: xóa nhiễm trùng, giao tiếp tế bào, tạo ra ty thể mới và tiêu diệt khối u [160].

1.3.3. MT2

Gen *MT2* là một thành viên của họ gen metallothionein. Protein được mã hóa bởi họ gen này có trọng lượng phân tử thấp, giàu cystein, thiếu dư lượng thiom và liên kết các ion kim loại nặng hóa trị hai, làm thay đổi nồng độ nội bào của các kim loại nặng trong tế bào. Những protein này hoạt động như chất chống oxy hóa, bảo vệ chống lại các gốc tự do hydroxyl, rất quan trọng trong việc kiểm soát cân bằng nội môi của kim loại trong tế bào và đóng vai trò giải độc kim loại nặng. Protein được mã hóa tương tác với protein được mã hóa bởi homeobox chứa 1 gen trong một số loại tế bào, kiểm soát nồng độ kẽm nội bào, ảnh hưởng đến con đường apoptotic và autophagy. Một số đa hình trong gen này có liên quan đến tăng nguy cơ ung thư [161]. *MT2A* (Metallothionein 2A) là một gen mã hóa protein. Các bệnh liên quan đến *MT2A* bao gồm Pthirus Pubis Infestation và chảy rận. Trong số các con đường liên quan của nó là tín hiệu Interferon gamma và tín hiệu Cytokine trong hệ thống miễn dịch. Một paralog quan trọng của gen này là M1G. Metallothionein có hàm lượng cysteine cao liên kết các kim loại nặng khác nhau; những protein này được phiên mã bởi cả kim loại nặng và glucocorticoids [162].

1.4. Lý do chọn đề tài

Các nghiên cứu về tác động của độc chất trong môi trường hiện nay trên thế giới và tại Việt Nam đã có nhiều công trình nghiên cứu nhưng chưa có nghiên cứu nào hệ thống đầy đủ về ảnh hưởng của chì đến hình thái, nhịp tim, mức độ phân tử đến cá ngựa vằn, tích tụ chì trong nội quang, cơ và xương ở các nồng độ 0,1, 1, 10, 20, 100 μ g/L và lô đối chứng nước không nhiễm chì (Pb^{2+}).

Việc nghiên cứu tác động của các chất độc nói chung, chì (Pb^{2+}) nói riêng đến sinh vật thủy sinh cần chọn đối tượng mô hình để nghiên cứu, tiết kiệm chi phí, thời gian ngắn, mang các đặc điểm gần giống con người, đặc biệt là giai đoạn phát triển phôi thai là rất cần thiết để hiểu biết sâu về cơ chế tác động, mức độ nguy hại cũng như đưa ra khuyến cáo nhằm xây dựng các văn bản pháp qui về bảo vệ môi trường và sức khỏe con người trong điều kiện thực tế tại Việt Nam là vô cùng cấp thiết.

Với những lý do trên, tác giả đã tiến hành thực hiện đề tài “Nghiên cứu sự ảnh hưởng chì (Pb) đối với quá trình phát triển của cá ngựa vằn (*Danio rerio*)”, mô hình nghiên cứu này nhận được sự quan tâm từ các nhà khoa học trên thế giới trong nhiều lĩnh vực như: khoa học môi trường, dược học, hóa sinh học, y tế, nông nghiệp, khoa học vật liệu. Số lượng các công trình nghiên cứu khoa học sử dụng phôi cá ngựa vằn đã tăng qua các năm cũng minh chứng cho điều này.

CHƯƠNG II. ĐỊA ĐIỂM, THỜI GIAN, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm:

Phòng Công nghệ Sinh học động vật – Viện Sinh học nhiệt đới

2.2. Thời gian :

Tháng 1/2018 đến tháng 1/2021. Tác giả tiến hành chọn lựa con giống, tiến hành nuôi và cảm ứng các nồng độ ô nhiễm:

2.3. Đối tượng nghiên cứu

2.3.1. Cá

Cá ngựa vằn (*Danio rerio*) (được định danh theo phụ lục 1), trong giai đoạn trưởng thành có chiều dài $3,62 \pm 0,04$ cm và $1,00 \pm 0,48$ g trọng lượng. Cá đực có xu hướng màu hồng hoặc vàng nhạt trong khi cá cái có màu xanh và trắng nhiều hơn. Kiểm tra hình dáng cơ thể cá: cá đực thường thân mình mỏng hơn trong khi cá cái có thân mình dày hơn. Cá được nuôi trong bể có đường kính 30 cm được trải bi thủy tinh làm giá đỡ cho trứng bám. Đồ nước ngập 2/3 bể, trong đó có cho rong giúp cung cấp động vật phù sinh làm thức ăn cho cá.

Trong quá trình phát triển phôi cá ngựa vằn được phân chia ở các giai đoạn khác nhau (Phôi cá ngựa vằn ở giai đoạn phôi nang (sau 3h thụ tinh – 3hour post fertilization - hpf), phôi vị (5hpf), giai đoạn phân đốt (10 - 24hpf) và giai đoạn hình thành hầu họng (24 - 48hpf) có sức sống tốt, được sử dụng cho quá trình thí nghiệm.

- Ấu trùng cá sau 144h

- Các cơ quan trong cơ thể cá con thí nghiệm sau 3 tháng

Theo dõi đặc điểm sinh sản:

Cá ngựa vằn thụ tinh ngoài

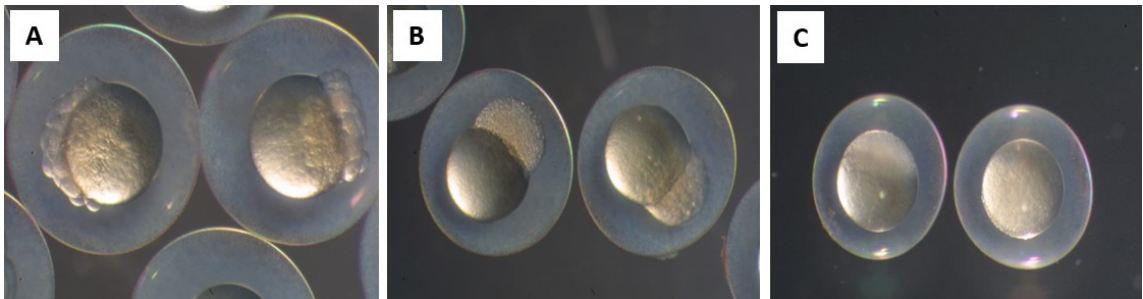
Sau giai đoạn bắt cặp ngắn, cá cái sẽ đẻ trứng và cá đực tưới tinh trùng lên trứng. Khoảng 12 phút sau thụ tinh, màng đệm ngấm nước căng hoàn toàn, lúc này đường kính của trứng có thể tăng lên tới 1mm (đường kính khoảng 0,5 – 0,6mm trước khi được thụ tinh). Phôi phát triển toàn diện trong 96h ở nhiệt độ nước 26°C.

Các giai đoạn phát triển của phôi cá ngựa vằn là công cụ cung cấp chính xác cho việc nghiên cứu sự phát triển. Bởi vì những phôi khác nhau sẽ phát triển theo những tỷ lệ khác nhau.

2.3.2. Giai đoạn Blastula – khoảng 3hpf

Phôi giai đoạn blastula đã phôi có dạng quả bóng, phôi đạt trên 128 tế bào. Có những quá trình quan trọng xảy ra trong suốt giai đoạn blastula, phôi đi vào giai đoạn chuyển giao blastula giữa, các tế bào trong phôi bị tạo thành 3 lớp phân biệt. Lớp đầu tiên (hình thành trong lần phân cắt thứ 9 và 10) được gọi là lớp hợp bào noãn hoàng (yolk syncytial layer – YSL). Quá trình bao phủ bắt đầu xảy ra vào giai đoạn blastula muộn và diễn ra trong suốt giai đoạn gastrula [138].

Giai đoạn blastula là giai đoạn các gen của phôi được kích hoạt (trước đó các gen bị kiểm soát thông qua các tín hiệu được tích trữ trong trứng trong suốt giai đoạn hình thành trứng) (mRNA từ mẹ). Sự kích hoạt bộ gen của phôi được gọi là giai đoạn blastula giữa và bắt đầu lần phân chia tế bào thứ 10.



Hình 2.1. Phôi cá ngựa vằn giai đoạn blastula

A - Blastula sớm; B - Blastula giữa; C - Blastula muộn

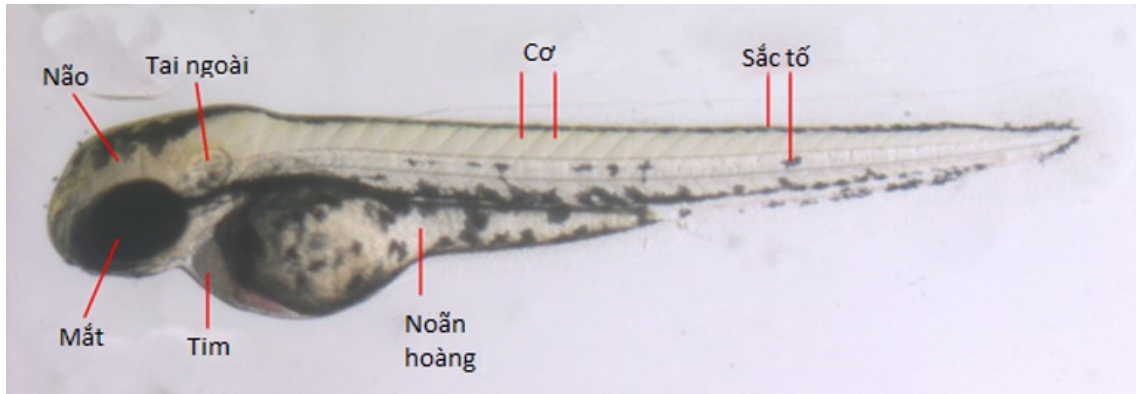
2.3.3. Giai đoạn Gastrula – khoảng 5hpf

Giai đoạn gastrula bắt đầu khi phôi bị trải rộng được khoảng một nửa noãn hoàng (bao phủ 50%). Các tế bào ở rìa phôi bắt đầu hướng vào trong và trải rộng trên đỉnh YSL, quá trình này được gọi là sự thoái triển. Quá trình này tạo hai lớp bên trong các tế bào, lớp ngoài phôi ở trên và lớp nội bì ở dưới. Lớp ngoài phôi tạo thành ngoại bì (lớp mầm tạo biểu bì của da và hệ thần kinh), lớp nội bì tạo thành trung phôi bì (lớp mầm tạo cơ, xương, và hệ tuần hoàn, thận, hệ sinh sản và tuyến sinh dục) và nội bì (lớp mầm tạo hệ tiêu hóa và ruột) [138].

2.3.4. Quá trình hình thành cơ quan

Sự hình thành cơ quan diễn ra nhanh, hầu hết những kết cấu cơ quan thô sơ được hình thành trong 24h phát triển. Ở phôi gà, sau 24h mới chỉ hình thành được hệ thần kinh và 4 cặp đốt sống, nhưng đối với phôi cá ngựa vằn đã hình thành được đầy đủ 30 cặp đốt sống, tim đập và tạo sắc tố ở mắt và da.

Đốt sống: Cặp đốt sống đầu tiên tạo thành sau 10h phát triển, và từ đó sau mỗi nửa giờ sẽ hình thành thêm một cặp mới. Điều này có nghĩa là trong vòng vài giờ, ta có thể quan sát một vài cặp đốt sống.



Hình 2.2. Các cơ quan trong cơ thể cá ngựa vằn

Ống thần kinh: Cũng giống như đốt sống, hệ thần kinh cũng được tạo thành. Đĩa thần kinh xuất hiện trong 10h cũng giống như cặp đốt sống đầu tiên (giai đoạn chồi). Sau đó đĩa thần kinh gấp lại vào trong tạo thành sống thần kinh (13h), và sau đó là đường thần kinh (16h). Đường thần kinh tạo lỗ để hình thành nên ống thần kinh lõm (bắt đầu lúc 18h, khi phôi đạt 18 đốt sống). Vùng não vào lúc này có thể bắt đầu được xác định là những chỗ sưng phồng phân biệt gọi là đốt thần kinh (neuromere). Khi đạt 18h, có thể có 10 đốt thần kinh theo thứ tự từ trước tới sau, 3 đốt đầu tiên tương ứng với não cùng, não trung gian, não giữa và 7 đốt cuối cùng tương ứng với não sau.

Vòm hầu họng: Sau 24h, phôi bắt đầu phản ứng với sự đụng chạm và sự tạo thành sắc tố trở nên rõ rệt. Trong vùng hầu họng, hàm và nắp mang được tạo thành từ hai vòm hầu họng đầu tiên và các vòm họng sau đó cũng được hình thành rõ rệt (cũng được gọi là vòm mang tạo thành mang).

Đường viền bên: Hệ thống đường viền bên gồm một loạt các đường ống chứa cấu trúc cảm ứng gọi là khối thần kinh giác quan (neuromast), để phát hiện những chuyển động chậm trong nước và do đó sẽ thông tin cho cá về đối thủ trong phạm vi gần. Khi đạt giai đoạn 18 đốt sống, nó bắt đầu di chuyển trong biểu bì, di chuyển giữa hai đốt sống sau mỗi giờ và tới đuôi khi được 40h.

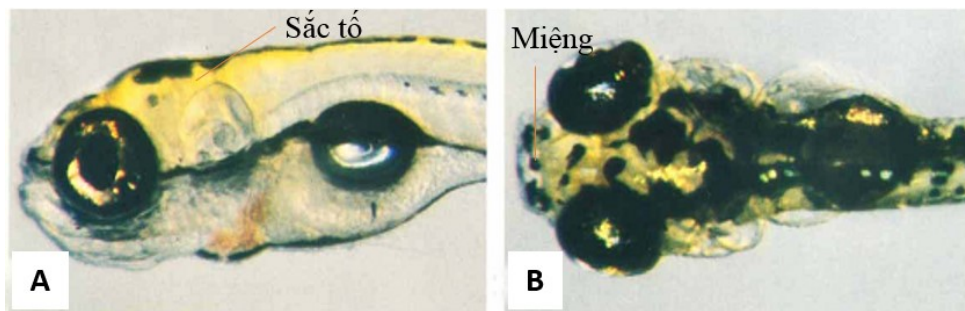
Nở: Phôi thoát nang trong vòng 48–72h. Trong suốt quá trình thoát nang, phôi tiếp tục tăng trưởng theo cùng tỷ lệ với các giai đoạn trước. Quá trình hình thành

hình thái của nhiều cơ quan đã khá hoàn thiện và chậm hơn đáng kể ngoại trừ ruột và các cơ quan có liên quan. Vây ngực, hàm và mang dễ dàng quan sát bằng mắt thường [138].

2.3.5. Giai đoạn ấu trùng sớm

Vào ngày thứ 3 sau khi nở, ấu trùng cá ngựa vẫn hoàn thiện hầu hết quá trình phát sinh hình thái và tiếp tục tăng trưởng nhanh. Những thay đổi xảy ra trong suốt ngày kế tiếp (bong bóng căng phồng, miệng tiếp tục kéo dài). Trong khi các dải sắc tố sáng dần và kéo dài, noãn hoàng ở bụng cũng kéo dài ra. Các ống ruột tập trung nhiều ở bụng và có thể quan sát được dễ dàng. Khác với giai đoạn phôi, ấu trùng giai đoạn sớm bắt đầu bơi một cách linh hoạt và cử động hàm, vây ngực và mắt. Những phát triển này giúp cá đáp ứng trốn thoát kẻ thù, hô hấp và tìm thức ăn [138].

2.3.6. Giai đoạn trưởng thành



Hình 2.3. Miệng phát triển và bắt đầu hình thành sắc tố

Cá trong giai đoạn trưởng thành có chiều dài $3,62 \pm 0,04$ cm và $1,00 \pm 0,48$ g trọng lượng.

Thu nhận phôi cá ngựa vằn: Chu kì chiếu sáng cho cá ngựa vằn là 14h chiếu sáng và 10h trong tối. Cá được ghép theo tỷ lệ đực:cái là 1:2 trong bể nuôi có vách ngăn để tách riêng cá đực và cá cái. Phôi sẽ được thu sau khi đèn được bật sáng 30 phút. Phôi cá được thu và nuôi trong dung dịch Hank.

Cá tiếp xúc với nước và các kim loại do dòng chảy liên tục của nước qua mang và thông qua các nguồn thực phẩm. Kim loại tích tụ trong các mô khác nhau theo mô hình khác nhau của các yếu tố tích tụ sinh học. Cơ chế tích tụ sinh học của kim loại nặng trong cá bao gồm các quá trình khác nhau. Một mô hình sinh học đơn

giản bao gồm tất cả các quá trình có khả năng dẫn đến tích tụ sinh học trong kim loại, được định lượng bởi Wang và Rainbow (2008) [163]. Do đó, sự tích tụ sinh học trong một cơ thể được kiểm soát bởi sự cân bằng giữa sự hấp thụ và loại bỏ.

$$DCt/dt = K_u \times C_w + AE \times IR \times C_f - (K_e + g) \times C_t$$

Trong đó:

- C_t là nồng độ kim loại trong động vật ở thời điểm t
- K_u là tỷ lệ hấp thụ liên tục từ pha hòa tan ($Lg^{-1} \text{ ngày}^{-1}$)
- C_w là nồng độ kim loại trong pha hòa tan ($\mu g L^{-1}$)
- AE là hiệu quả thu thập kim loại nặng từ pha chế độ ăn kiêng
- IR là tỷ lệ ăn uống đặc hiệu của trọng lượng ($gg^{-1} \text{ ngày}^{-1}$)
- C_f là nồng độ kim loại trong giai đoạn chế độ ăn uống (μgg^{-1})
- K_e là hằng số dòng chảy nước thải (ngày^{-1})
- g là hằng số tốc độ tăng trưởng của con vật (ngày^{-1})

2.3.7 Kim loại

Gây ô nhiễm nước đối với kim loại chì ở dạng muối $Pb(NO_3)_2$ được mua từ Công ty TNHH Hóa Chất Long Hải.

2.3.8 Phạm vi nghiên cứu

Về không gian:

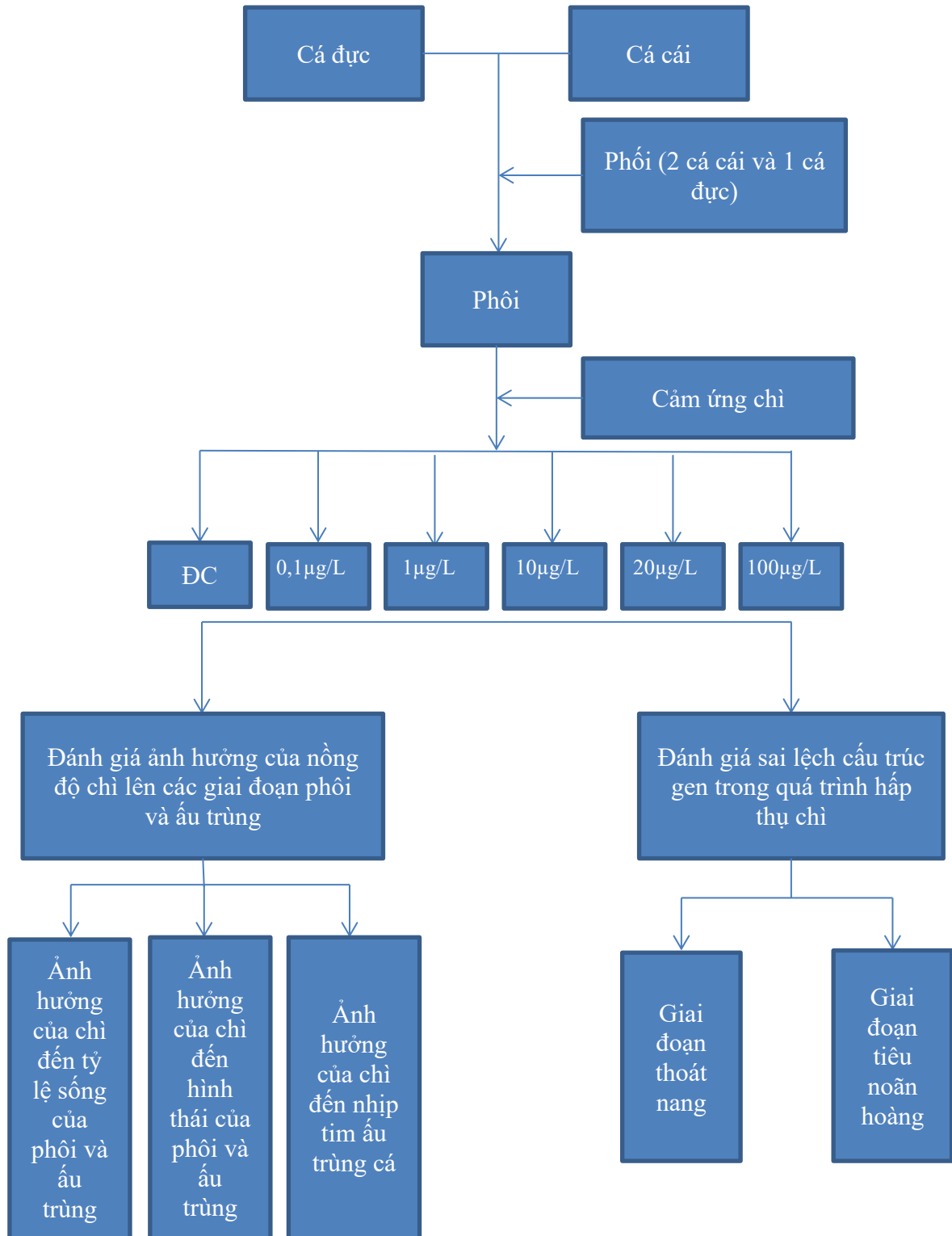
- Đánh giá ảnh hưởng nồng độ chì lên sự phát triển của phôi cá bằng phương pháp phối cá, thu nhận, phát triển hình thái.
- Xác định hàm lượng tích tụ chì trong cơ quan phát triển cá ngựa vằn
- Phương pháp đánh sự thay đổi biểu hiện các gen đáp ứng với kim loại và các gen kiểm soát tổn thương DNA.
- Xác định ảnh hưởng kim loại chì lên cấu trúc ruột và buồng trứng.

Về thời gian: từ tháng 01/2018 đến 01/2021

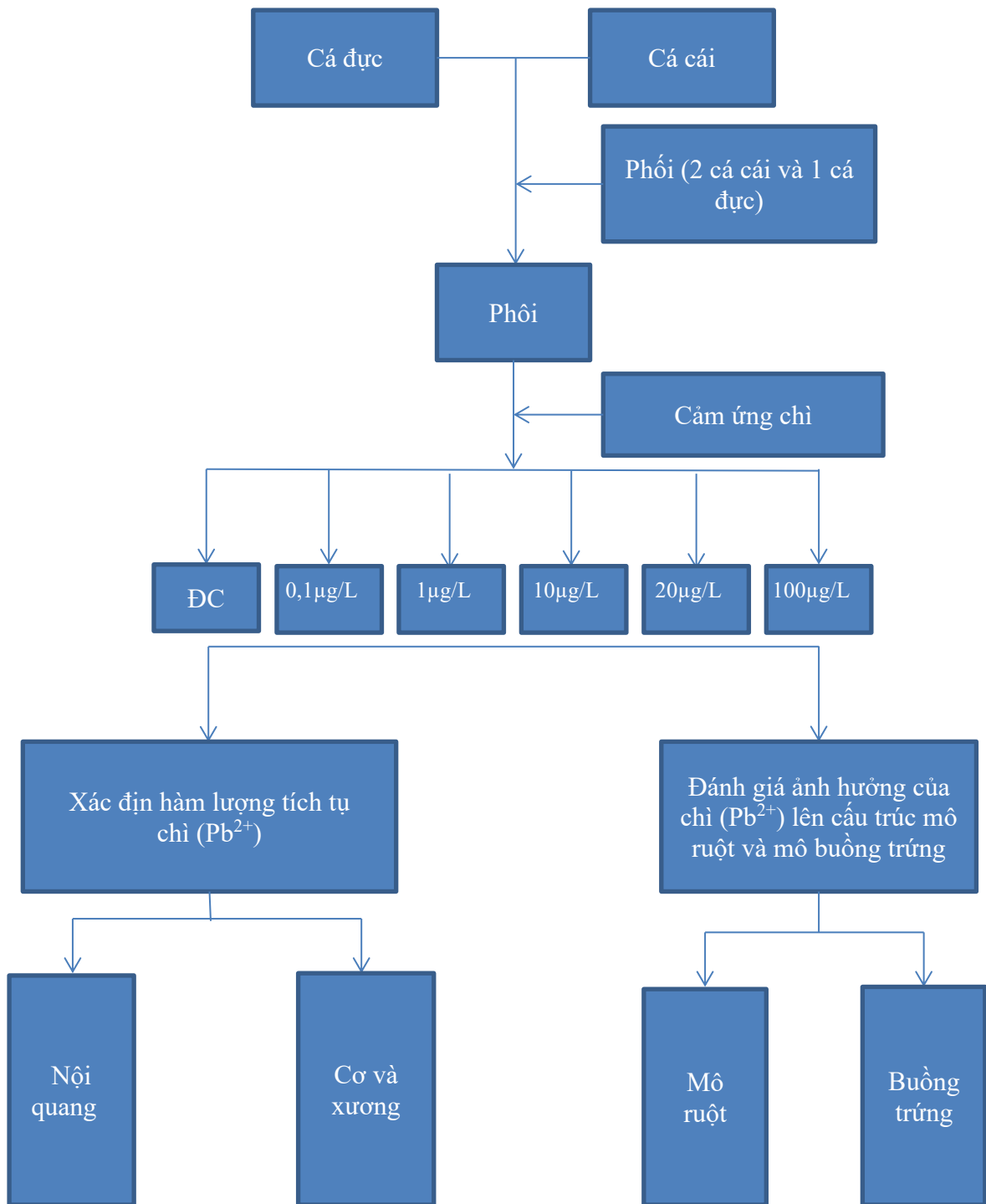
2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Quy trình nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu được trình bày trên sơ đồ Hình 2.4, Hình 2.5.



Hình 2.4. Sơ đồ quy trình nghiên cứu ảnh hưởng đến giai đoạn phôi, ấu trùng và đánh giá sai lệch cấu trúc gen trong quá trình hấp thụ



Hình 2.5. Sơ đồ xác định hàm lượng tích tụ ion chì trong một số cơ quan cá ngựa vằn và ảnh hưởng đến cấu trúc mô

2.4.2. Thiết kế thí nghiệm độc tính

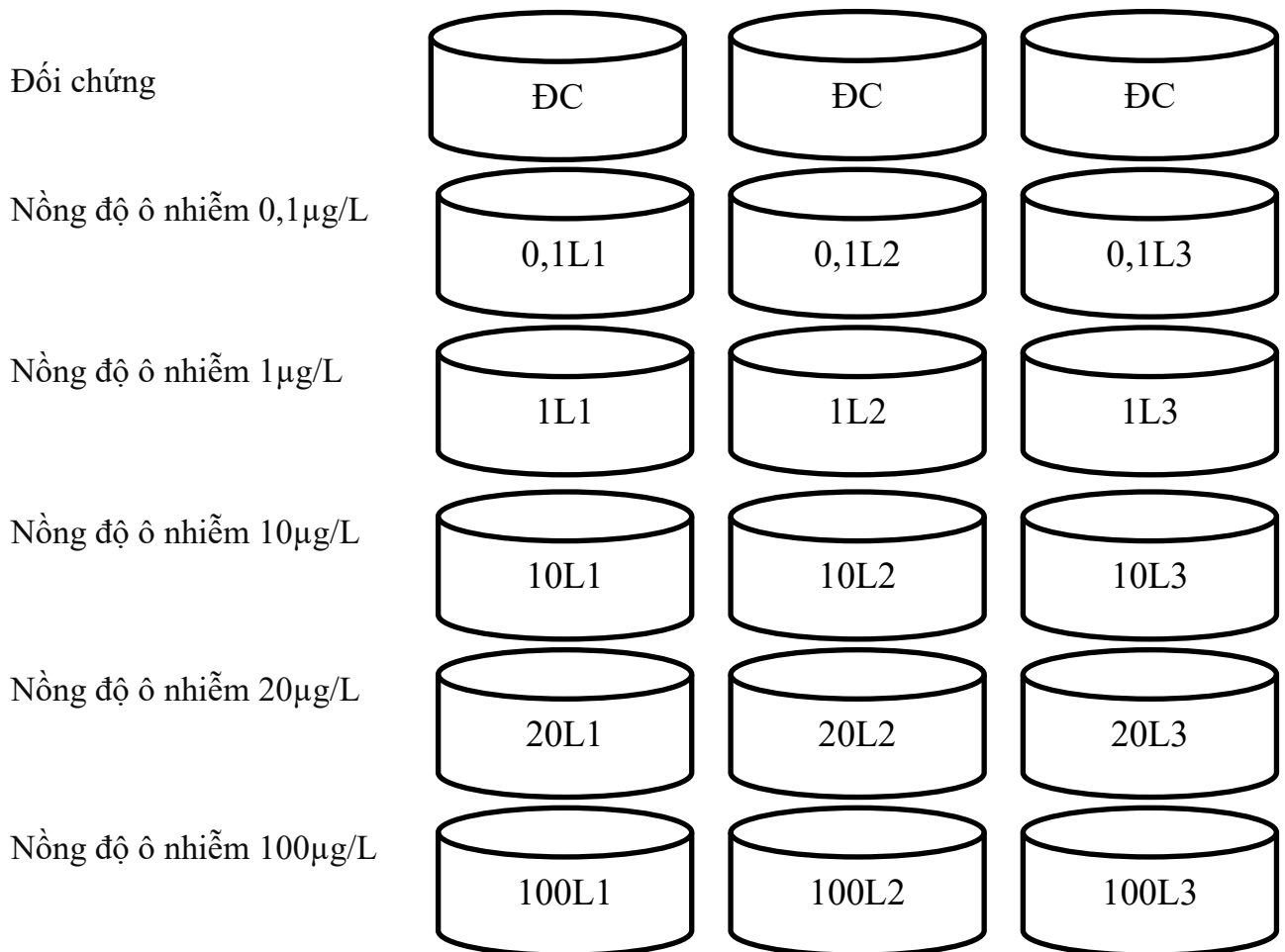
Môi trường đối chứng: nước không nhiễm chì (Pb^{2+})

Môi trường khảo nghiệm: nước không nhiễm chì pha với chì (Pb^{2+}) ở các nồng độ 0,1 μ g/L, 1 μ g/L, 10 μ g/L, 20 μ g/L, 100 μ g/L.

Môi trường nước đối chứng và các nồng độ chì (Pb^{2+}) luôn duy trì pH= 6.5-7.5, nhiệt độ 28- 32°C.

Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần (n=3).

2.4.3. Phương pháp nuôi cá



Hình 2.6. Sơ đồ bố trí thí nghiệm (n=3)

Cá ngựa vằn được nuôi trong bể thủy tinh, có đường kính 30cm, số lượng cá nuôi 50 con, theo tỷ lệ 2 cái : 1 đực, Chọn cá trưởng thành có chiều dài $3,62 \pm 0,04$ cm và $1,00 \pm 0,48$ g trọng lượng, hình thái đồng đều nhau. Cá được nuôi trong bể có sục khí để đảm bảo lượng oxy hòa tan 6.5 ± 0.7 mg/L, pH= 6.5 – 7.5, nhiệt độ 28 – 32°C, thức ăn của cá là rong và sinh vật phù du.

Cá ở lô đối chứng là cá được nuôi trong bể nước không có nồng độ chì (Pb^{2+}).

Độ lặp lại của từng thí nghiệm là 3 ($n=3$)

2.4.4. Xác định ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên tỷ lệ phát triển phôi cá ở các giai đoạn khác nhau

Đếm số phôi nở sống trong tổng số phôi, quan sát một số bất thường của phôi và xác định số phôi nở, tìm ra tỷ lệ % phôi sống ở các nồng độ khác nhau, mỗi nồng độ thí nghiệm sử dụng 50 phôi cá ngựa vằn ở giai đoạn 1-2 tế bào, quan sát hình thái, sức sống và theo dõi tỷ lệ sống chết của phôi sau mỗi giai đoạn phân chia dưới kính hiển vi, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Phôi sống là phôi khỏe mạnh và có khả năng phát triển ở các giai đoạn tiếp theo, không dị tật, không chết.

2.4.5. Xác định ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên nhịp tim phôi cá ở các giai đoạn khác nhau

Xác định nhịp tim ở các nồng độ khác nhau, mỗi nồng độ thí nghiệm sử dụng 50 phôi cá ngựa vằn ở giai đoạn 48h và 72h. Phôi cá được hút bằng ống hút nhựa mềm với đường kính 3 mm. Sau đó, cho vào đĩa petri đường kính 60 mm có chứa môi trường tương ứng để ấu trùng có thể sống được. Đưa mẫu lên kính hiển vi đảo ngược, đặt dưới vật kính X10, sử dụng máy ảnh Canon quay phim nhịp tim ấu trùng trong 1 phút, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần. Phôi sống là phôi khỏe mạnh và có khả năng phát triển ở các giai đoạn tiếp theo, không dị tật, không chết.

2.4.6. Xác định hàm lượng tích tụ chì (Pb^{2+}) trong cơ quan phát triển của cá

Sử dụng 50 phôi cá sẽ được nuôi trong môi trường đối chứng, môi trường có chứa các nồng độ Pb^{2+} , phôi cá được nuôi đến giai đoạn trưởng thành (3 tháng tuổi) và tiến hành thu cá.

Phôi cá được thu và nuôi trong dung dịch Hank (0,137M NaCl, 5,4mM KCl, 0,25mM Na_2HPO_4 , 0,44mM KH_2PO_4 , 1,3mM $CaCl_2$, 1,0mM $MgSO_4$, 4,2mM $NaHCO_3$). Môi trường thu được giữ ở $4^{\circ}C$ cho đến khi phân tích.

Mỗi nồng độ thí nghiệm sử dụng 50 cá ngựa vằn trưởng thành được nhiễm độc chì (Pb^{2+}) cho phân tích.

Chỉ tiêu đánh giá: Hàm lượng chì (Pb^{2+}) tồn dư trong cơ thể cá theo tiêu chuẩn quốc gia TCVN 10643:2014 (AOAC 999.11) – về thực phẩm - xác định hàm lượng chì, cadimi, đồng, sắt, kẽm – phương pháp đo phổ hấp thụ nguyên tử sau khi tro hóa khô.

Sử dụng phương pháp đo quang phổ hấp thụ nguyên tử sau khi tro hóa khô để xác định tích tụ chì trong cá ngựa vằn:

1. Các mẫu thử được sấy khô và sau đó tro hóa ở nhiệt độ $450^{\circ}C$, trong điều kiện nhiệt độ tăng dần tăng dần ($\leq 50^{\circ}C/h$). HCl 6M được thêm vào và làm bay hơi dung dịch đến khô. Phần cặn được hòa tan trong HNO₃ 0,1M và chất phân tích được xác định bằng ngọn lửa và quy trình graphit.

2. Máy đo quang phổ hấp thụ nguyên tử.

Có đèn đốt không khí–axetylen hoặc đèn đốt nitơ ôxit–axetylen cho ngọn lửa và lò nung graphit để xác định nhiệt điện, với hiệu chỉnh nền (sr^c : 0.11; RSDR^e: 20; r^g :0.31).

Catốt rỗng hoặc đèn phóng điện không điện cực cho tất cả các nguyên tố được xác định.

Lò đốt lập trình ở $450 \pm 25^{\circ}C$.

Tấm gia nhiệt. Có điều khiển gia nhiệt, để gia nhiệt lên đến khoảng $300^{\circ}C$.

3. Thuốc thử:

HCl: 6M (Pha loãng 500mL HCl (37% w/w) với H₂O thành 1 lít.

HNO₃: 0.1M (Pha loãng 7mL HNO₃ (65% w/w) với H₂O thành 1 lít.

4. Dung dịch chuẩn chì: 1mg/ml. Hòa tan 1.000g Pb trong 7ml HNO₃ trong bình định mức 1 lít. Pha loãng thể tích bằng H₂O.

5. Quy trình:

Đồng nhất sản phẩm nếu cần, sử dụng thiết bị không gây nhiễm bẩn. Kiểm tra xem kim loại có bị rò rỉ không nếu thiết bị phụ trợ bao gồm các bộ phận bằng kim loại.

Trong chén nung, cân 10-20 g phần mẫu thử chính xác đến 0,01 g. Làm khô trong tủ sấy, trên nồi cách thủy hoặc bếp điện ở nhiệt độ $100^{\circ}C$, nếu có nguy cơ sôi mạnh trong bước tro hóa. Đặt đĩa vào lò nung ở nhiệt độ ban đầu không cao hơn $100^{\circ}C$. Tăng nhiệt độ với tốc độ tối đa $50^{\circ}C/h$ đến $450^{\circ}C$. Để yên đĩa trong ít nhất 8h hoặc qua đêm.

Đặt chén nung có phần mẫu thử được đậy bằng nắp thủy tinh lên đĩa gốm và để không khí tinh khiết đi qua một ống thủy tinh quét qua sản phẩm. Đặt đèn IR xuống ở nắp. Tro trước mẫu sản phẩm bằng cách tăng nhiệt độ từ từ với đèn hồng ngoại bằng cách tăng dần nhiệt độ trên tấm gia nhiệt đến tối đa. Nhiệt độ cuối cùng trên tấm gốm khi đó nên vào khoảng 300°C. Thời gian cần thiết để tro hóa sơ bộ khác nhau tùy theo sản phẩm. Đặt chén nung vào lò múp ở 200-250°C và từ từ tăng nhiệt độ lên 450°C với tốc độ không quá 50°C/h.

Để yên ít nhất 8h hoặc qua đêm. Lấy chén nung ra khỏi lò và để nguội. Làm ướt tro với 1-3mL nước và làm bay hơi trên nồi cách thủy hoặc bếp điện. Đặt chén nung trở lại lò nung ở nhiệt độ không quá 200°C và tăng nhiệt độ (50-100°C/h) lên 450°C. Tiến hành tro hóa ở 450°C trong 1-2h hoặc lâu hơn. Lặp lại quy trình cho đến khi sản phẩm được tro hóa hoàn toàn, nghĩa là tro phải có màu trắng/xám hoặc hơi ngả màu. Số lần lặp lại cần thiết khác nhau tùy thuộc vào loại sản phẩm. Thêm 5 mL HCl 6M, C(b), vào chén nung để đảm bảo rằng tất cả tro tiếp xúc với axit.

Làm bay hơi axit trên nồi cách thủy hoặc bếp điện. Hòa tan cạn trong 10,0–30,0 mL, chính xác đến 0,1 mL, HNO₃ 0,1M, C(d). Xoay chén cẩn thận để tất cả tro tiếp xúc với axit. Đậy mặt kính đồng hồ và để yên trong 1-2h.

6. Phép đo quang phổ hấp thụ nguyên tử: Bước sóng: $\lambda=283.3$

7. Tính toán và đánh giá kết quả

Giới hạn phát hiện: $DL = 3 \times$ độ lệch chuẩn của giá trị trung bình của phép xác định mẫu

Tính nồng độ C của kim loại trong mẫu công thức:

$$c = \frac{(a - b)V^2}{m}$$

c: nồng độ mẫu thử (mg/kg)

a: nồng độ dung dịch thử (mg/l)

b: nồng độ trung bình của dung dịch mẫu (mg/l)

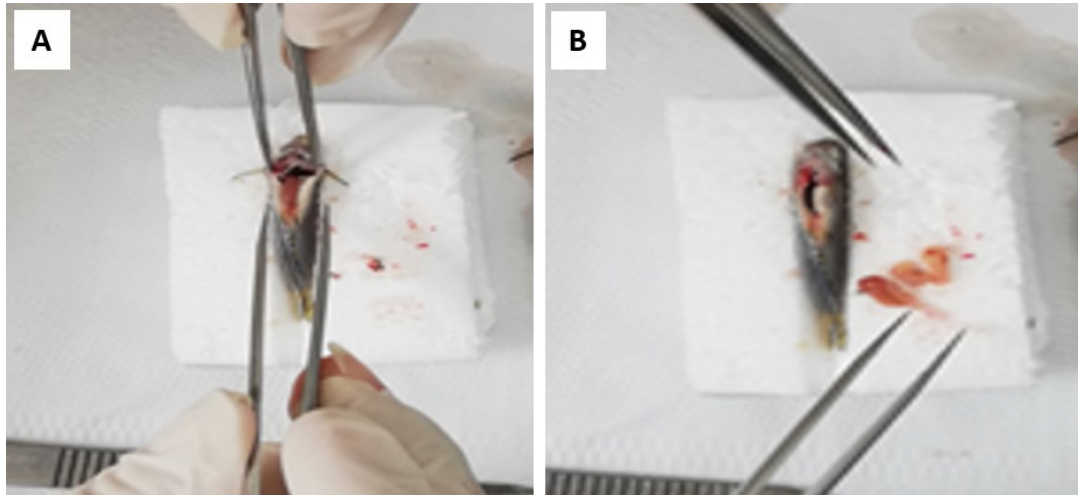
v: thể tích dung dịch mẫu thử (ml)

m: khối lượng của phần mẫu thử

So sánh hàm lượng chì trong cá ở các nồng độ khác nhau từ đó xác định được khả năng chuyển hóa của Pb²⁺ trong cơ thể cá ngựa vằn

2.4.7. *Xác định ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên cấu trúc mô ruột và mô buồng trứng*

Để đánh giá ảnh hưởng chì (Pb^{2+}) lên cấu trúc mô ruột và mô buồng trứng của cá ngựa vằn, cá sẽ được nuôi trong môi trường có chứa nồng độ Pb^{2+} từ giai đoạn phôi đến 90 ngày tuổi. Sau đó thu nhận cá, gây tê cá bằng Lidocain 2%, mổ cá để lấy các mẫu ruột và buồng trứng, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.



Hình 2.7. Mổ cá thu nhận mẫu ruột và buồng trứng để cắt lớp mô

Sử dụng phương pháp nhuộm hematoxylin- eosin (HE) [164]. Đây là phương pháp nhuộm hai màu liên tiếp. Nhuộm nhân theo nguyên tắc tăng dần, nhuộm bào tương theo nguyên tắc giảm dần.

Phẩm nhuộm: pha phẩm nhuộm theo cách thức dưới đây:

- Hematoxylin Harris:

- + Hematoxylin (tinh thể) 1g
- + Cồn (etanol) tuyệt đối 10mL
- + Alun (ammonium hay potassium) 20g
- + Nước cất 200mL
- + Oxit thuỷ ngân (đỏ) 0,5g

- Tiến hành pha:

- + Hoà tan hematoxylin trong cồn.
- + Hoà tan alun trong nước cất nóng. Đưa ra khỏi lửa và trộn hai dung dịch với nhau.

- + Đun sôi hỗn hợp, kéo bình đun ra khỏi lửa và thêm vào dần oxit thủy ngân.
- + Đun nóng lại, khi hỗn hợp có màu tím sẫm, tắt lửa và nhúng ngay bình đun vào nước lạnh.
- + Khi bình đun lạnh hẳn, thêm 2ml acid acetic lạnh để làm tăng tính nhuộm nhân.
- + Eosine Y: ở Việt Nam thường pha dung dịch 0,5% trong cồn 95⁰.
- L.G. Koss pha theo công thức:
 - + Eosine Y (CI. No 45830) 16g hoặc 1g
 - + Dichromat kali 8g hoặc 0,5g
 - + Acid picric (nước bão hoà) 160mL hoặc 10mL
 - + Cồn etanol 95⁰ 160mL hoặc 10mL
 - + Nước cất 1280mL hoặc 80mL
 - + Hoà tan eosin và dichromat kali vào nước cất, đun nóng nếu cần, sau đó thêm dung dịch acid picric, cồn.

Mẫu cá đưa ngay vào dung dịch cố định (formol đậm trung tính 10%) với tỷ lệ thể tích dung dịch cố định nhiều gấp 20-30 lần thể tích mẫu. Thời gian cố định từ 2-24h tùy theo mẫu bệnh phẩm to hay nhỏ.

Sau khi cố định, bệnh phẩm được thực hiện qua các khâu kỹ thuật sau:

- Chuyển bệnh phẩm.
- Vùi parafin.
- Đúc khối parafin
- Cắt và dán mảnh cắt.
- Nhuộm: các bước thực hiện như sau:
 - + Tẩy parafin trong 3 bể toluen (hoặc xylen), mỗi bể 5 phút
 - + Qua 4 bể cồn: 100⁰ - 95⁰ - 80⁰ - 70⁰, mỗi bể nhúng 15 lần
 - + Rửa nước cất: nhúng 15 lần
 - + Nhuộm nhân bằng Hematoxylin Harris: 3-5 phút hoặc lâu hơn
 - + Rửa nước chảy: 5-10 phút
 - + Kiểm tra màu của nhân qua kính hiển vi, nếu đậm, tẩy nhẹ bằng cồn-acid

- + Rửa nước chảy: 1 phút
- + Nhuộm Eosin 1%: 1-2 phút
- + Rửa nước chảy: 1 phút
- + Biệt hoá trong 2 bể còn 95° - 100°, mỗi bể 15 lần nhúng
- + Qua 3 bể toluen, bể I và II nhúng 15 lần, bể III: 5-10 phút
- + Gắn lá kính

Tiến hành quan sát và đọc dưới kính hiển vi.

2.4.8. *Phương pháp tách chiết RNA*

Phôi sau khi thụ tinh, lựa chọn phôi không dị tật, đồng đều về hình thái, cho 100 phôi vào mỗi bể thủy tinh có chứa các nồng độ thí nghiệm khác nhau. Phôi được nuôi đến giai đoạn 24h bắt đầu thu 40 phôi, 60 phôi còn lại trong lô thí nghiệm được nuôi đến giai đoạn 168h tiến hành thu cá. Mẫu được thu tiến hành RT-PCR. (Chọn những cá thể không dị tật về hình thái, cá được thu và bảo quản mẫu mô trong dung dịch còn 70 độ, tủ âm 40 độ).

Mẫu mô được ly giải bằng 250µL dung dịch ly giải RLT và được vortex trong 30 giây, 350µl Ethanol 70 % được cho vào eppendorf chứa mẫu và dung dịch được huyền phù hoá. Toàn bộ 700µL mẫu trên được chuyển vào cột RNeasy và đặt cột vào eppendorf 2 ml. Mẫu được ly tâm 11.000 vòng/phút, trong 1 phút 30 giây ở 4°C. Dịch ly tâm được loại bỏ và 700µL dung dịch RW1 được cho vào cột RNeasy. Mẫu được ly tâm 11.000 vòng/phút, trong 1 phút ở 4°C. Dịch ly tâm được loại bỏ và 500µL dung dịch RPE được cho vào cột RNeasy. Mẫu được ly tâm 11.000 vòng/phút, trong 1 phút 30 giây ở 4°C. Cột RNeasy được chuyển sang eppendorf mới. 50µL nước không chứa RNase được chuyển vào cột RNeasy. Mẫu được ly tâm 11.000 vòng/phút, trong 1 phút 30 giây ở 4°C. Cột RNeasy được loại bỏ, mẫu RNA tổng được bảo quản ở -80°C.

Real-time RT-PCR

Sự biểu hiện gen được định lượng bằng phương pháp Real-time qRT-PCR với kit PCR BIO 1-Step RT-PCR Kit (PCR Biosystems). Chu trình nhiệt của phản ứng được thực hiện như sau: 45°C trong 10 phút, 95°C trong 2 phút, 40 chu kỳ gồm: 95°C trong 10 giây, 58°C trong 15 giây, 62°C trong 15 giây. Quá trình phân tích đường cong tan chảy được tiến hành từ 60°C đến 95°C với mỗi bước đọc là 0,5°C

trong vòng 30 giây. Phương pháp định lượng tương đối sự biểu hiện của gen được tiến hành theo phương pháp $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Sự biểu hiện của gen mục tiêu trong mỗi nhóm thí nghiệm được xác định bằng việc chuẩn hóa giá trị Ct của gen mục tiêu với gen tham khảo (β -actin) và nhóm đối chứng.

	Gen		Primers	
Đáp ứng stress với kim loại nặng	<i>MT2</i>	metallothionein 2	f-CCTGCAAGTGCACTAATTGCCAGT r-TCTGTTTCAAGAAGCCGAAAGCCC	
	<i>SOD1</i>	superoxide dismutase 1, soluble	f-TGAGACACGTCGGAGACC r-TGCCGATCACTCCACAGG	
	<i>SOD2</i>	superoxide dismutase 2, mitochondrial	f-TTCAGGGCTCAGGCTGG r-ATGGCTTTAACATAGTCCGGT	
	Kiểm soát sự tổn thương DNA	<i>GADD45A</i>	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	f-AACGTGGTCTTGTGTCTGCT r-AGGTCCATCGACTCTCCTCC
		<i>GADD45G</i>	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	f-CGCCTTGGATACGTCCGATT r-CTCTTGACACGCGACCAGTA
		Đối chứng	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, like 1	f-GTACTACTCTTCTTGATGCCC r-GTACAGTTCCAATACCTCCA

Cách bước tiến hành tách chiết mRNA

Bước 1: Cho 350ml TRK vào eppendort có chứa 15 ấu trùng cá ngựa vằn, tiến hành nghiền mẫu.

Bước 2: Ly tâm 8000 vòng/5 phút, sau đó hút dịch nổi vào eppendort mới, cho thêm 350ml ethanol 70% vào và lắc đều. Hút 700 μ L dịch cho vào mini columns đem ly tâm 8000 vòng/5 phút.

Bước 3: Bỏ dịch trong tubes, thêm 500 μ L RNA Wash Bufer I vào mini columns. Ly tâm 8000 vòng/5 phút.

Bước 4: Bỏ dịch trong tubes, thêm 500 μ L RNA Wash Bufer II vào mini columns. Ly tâm 8000 vòng/5 phút.

Bước 5: Bỏ dịch trong tubes, thay mini columns bằng eppendort, thêm 50 μ l DEPC water vào mini columns, ly tâm 8000 vòng/5 phút.

Bước 6: Bảo quản mẫu trong tủ -80°C.

Các bước thực hiện Real time RT-PCR:

Bước 1: Chuẩn bị hỗn hợp:

Thành phần phản ứng	
Master mix	150 μ L
Primer	10 μ L
Enzyme	10 μ L
H ₂ O	130 μ L

Bước 2: Hòa đều hỗn hợp sau đó chia hỗn hợp ra 10 eppendort, mỗi eppendort chứa 30 μ L hỗn hợp, thêm 1 μ L mRNA của mỗi nồng độ (đối chứng, nồng độ 0,1, nồng độ 1, nồng độ 10, nồng độ 100), hòa đều hỗn hợp.

Bước 3: Dùng đĩa PCR 16 giếng để chứa hỗn hợp, hút 10 μ L dung dịch vừa hòa vào mỗi giếng và lặp lại 3 lần.

Bước 4: Đặt đĩa vào máy RT-PCR điều chỉnh nhiệt độ và thời gian thích hợp cho lần lượt các từng loại mồi.

- *Phân tích định lượng tương đối sự biểu hiện các gen*

Phương pháp $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak) (Real-time PCR Applications Guide – Biorads)

Phương pháp $2^{-\Delta\Delta C_t}$ được áp dụng để đánh giá mức độ biểu hiện tương đối sự biểu hiện gen. Phương pháp này giả định rằng cả gen đích và gen tham chiếu được khuếch đại với hiệu quả gần 100% và trong phạm vi 5% của mỗi gen. Để xác định sự khác biệt tương đối trong mức độ biểu hiện của gen đích ở các mẫu khác nhau, phương pháp $2^{-\Delta\Delta C_t}$ được thực hiện theo các bước sau:

- Chuẩn hóa giá trị C_T của gen mục tiêu với gen tham khảo cho cả mẫu thí nghiệm và mẫu hiệu chỉnh:

$$\Delta C_{T(\text{mẫu})} = C_{T(\text{mục tiêu, mẫu})} - C_{T(\text{tham chiếu, mẫu})}$$

$$\Delta C_{T(\text{chuẩn})} = C_{T(\text{mục tiêu, chuẩn})} - C_{T(\text{tham chiếu, chuẩn})}$$

- Chuẩn hóa giá trị ΔC_T của mẫu thí nghiệm với ΔC_T của mẫu chuẩn:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{mẫu})} - \Delta C_{T(\text{chuẩn})}$$

- Cuối cùng, tỷ lệ biểu hiện được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ biểu hiện} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Chỉ tiêu đánh giá:

- Sự thay đổi biểu hiện gen đáp ứng với kim loại nặng.
- Sự thay đổi biểu hiện gen kiểm soát tổn thương DNA.

Kết quả thu được là sự tăng (hay giảm) theo tỷ lệ của gen đích trong mẫu thí nghiệm tương quan với mẫu chuẩn và được chuẩn hóa theo sự biểu hiện của gen tham chiếu.

2.4.9. Phương pháp thống kê

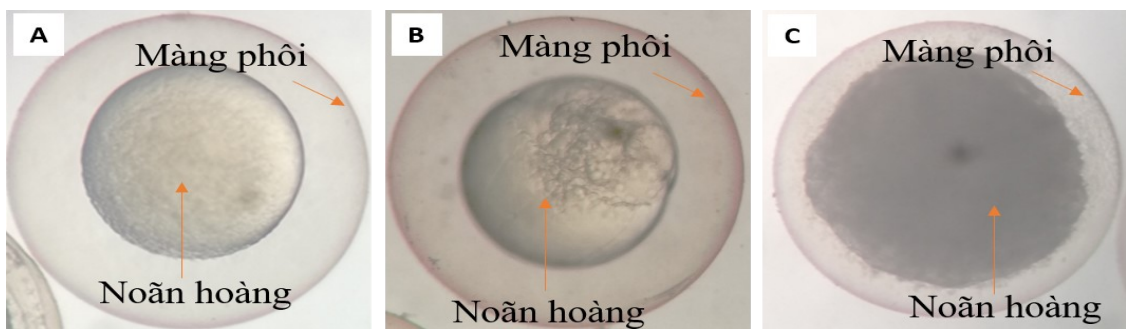
Các số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm Sigmaplot 11.0 để so sánh sự khác biệt trên tất cả các chỉ tiêu thực hiện trên các nhóm khảo sát. Số liệu được trình bày ở dạng $\bar{x} \pm SD$. Các mẫu cá phân tích được lặp lại ba lần và đánh giá sự khác biệt giữa các nồng độ thực nghiệm bằng cách sử dụng ANOVA để thống kê giá trị trung bình và phương sai tương ứng. Sau khi so sánh bằng ANOVA, kết quả được coi là có giá trị khác biệt đáng kể khi $P < 0,05$.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên sự phát triển phôi cá ở các giai đoạn khác nhau

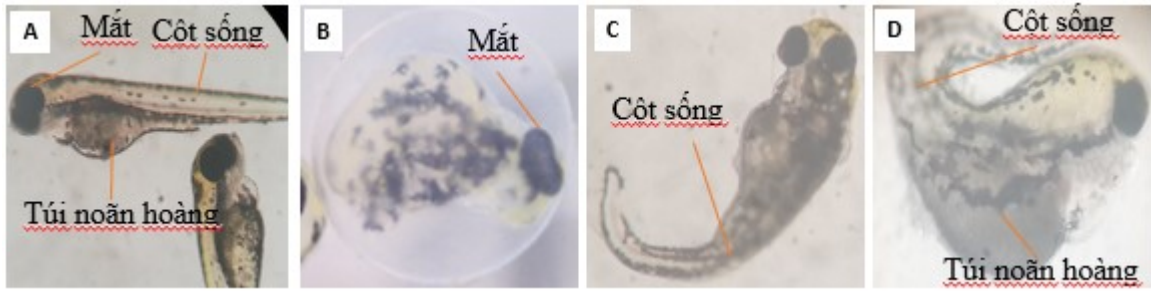
Trong nghiên cứu này, nhóm phôi thí nghiệm được nuôi trong môi trường có chứa chì (Pb^{2+}) phù hợp ở các nồng độ 0,1 μ g/L, 1 μ g/L, 10 μ g/L, 20 μ g/L, 100 μ g/L. Nhóm đối chứng nuôi trong môi trường không chứa ion chì. Mỗi lô thí nghiệm chứa 50 phôi cá và được lặp lại 3 lần với chu kỳ 14 h sáng và 10 h tối. Phôi chết được đếm và loại bỏ hàng ngày trong suốt quá trình đánh giá [124].

Sử dụng kính hiển vi quan sát và xác định được những sai khác về mặt hình thái, phát triển của phôi đối chứng và phôi cá được nhiễm chì (Pb^{2+}). Kết quả đánh giá cho thấy phôi ở nhóm đối chứng có hình thái trong suốt, không bị dị dạng, cấu trúc phôi bình thường, khối noãn hoàng đều đặn nằm giữa, dòng sinh chất chảy đều trong phôi. Đối với phôi thực nghiệm đã được nhiễm chì (Pb^{2+}) thì có những phôi vẫn phát triển bình thường nhưng đa số phôi có sự biến dạng về hình thái như sự mờ đục không trong suốt của noãn hoàn, nhịp tim không rõ ràng hoặc phôi chết bị dị dạng và có màu đen (hình 3.1A).



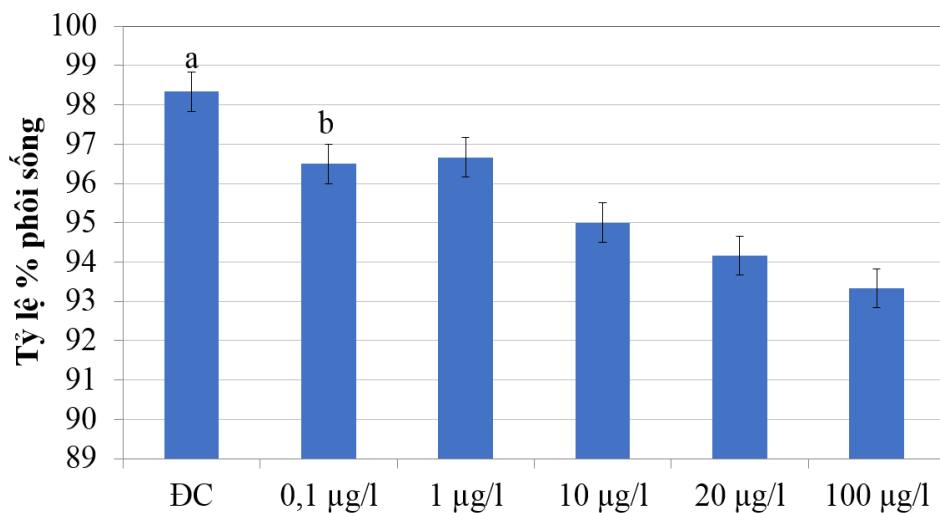
Hình 3.1. Hình thái của phôi cá ngựa vằn; A - Phôi phát triển bình thường; B - Phôi phát triển bất thường; C - Phôi chết.

Kết quả đánh giá hình thái ấu trùng cho thấy ấu trùng cá ngựa vằn nhóm đối chứng vẫn thể hiện được sự phát triển bình thường, ấu trùng cá ngựa vằn được nhiễm chì (Pb^{2+}) xuất hiện sự phát triển bất thường, nở chậm, dòng sinh chất vẫn chảy nhưng bị thay đổi, dị dạng, xương sống cong (Hình 3.1B, 3.1C). Ngoài ra ở nhóm cảm ứng chì xuất hiện nhiều phôi không phát triển được đến giai đoạn sau thoát nang.



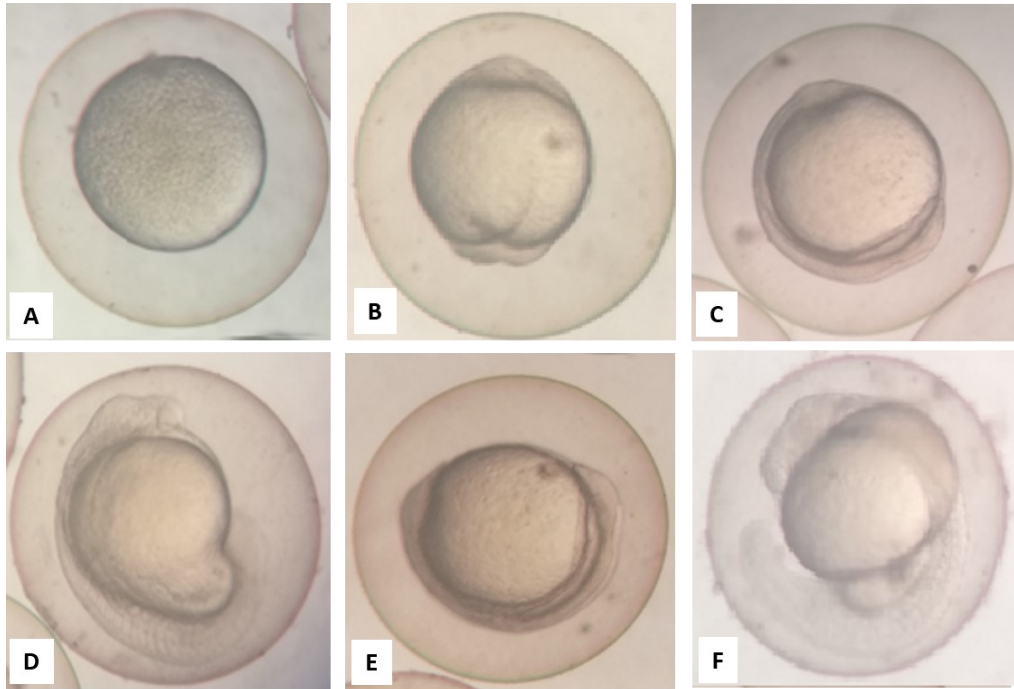
Hình 3.2. Ấu trùng phát triển bất thường khi nhiễm chì (Pb^{2+}). A – Đối chứng; B – Ấu trùng bất thường ở mắt; C – Ấu trùng bất thường cột sống; D - Ấu trùng bất thường cột sống và túi noãn hoàng

Hình 3.2 thể hiện một số dạng dị dạng của phôi và ấu trùng của cá ngựa vằn ở nhóm được cảm ứng chì, kết quả cho thấy ấu trùng cá ngựa vằn gây nhiễm chì liên tục trong giai đoạn phôi đã xuất hiện dị dạng ở các cơ quan. Hình 3.2A noãn hoàng, dòng sinh chất, cột sống, mắt bình thường, Hình 3.2B ấu trùng bất thường ở mắt, túi noãn hoàng biến dạng. Hình 3.2C, Hình 3.2D ấu trùng bất thường túi noãn hoàng, bất thường cột sống. Hiện cơ chế tác động của chì làm dị tật cá ngựa vằn vẫn chưa được hiểu rõ, các cơ chế tác động cụ thể nào được công bố đầy đủ. Tuy nhiên sự ức chế tổng hợp DNA có thể là nhiều nhất, sự tăng nhẹ hàm lượng chì trong môi trường đã làm cho quá trình tổng hợp ADN bị thay đổi theo chiều hướng kích thích hoặc ức chế quá trình tổng hợp DNA gây nên các dị tật [165].

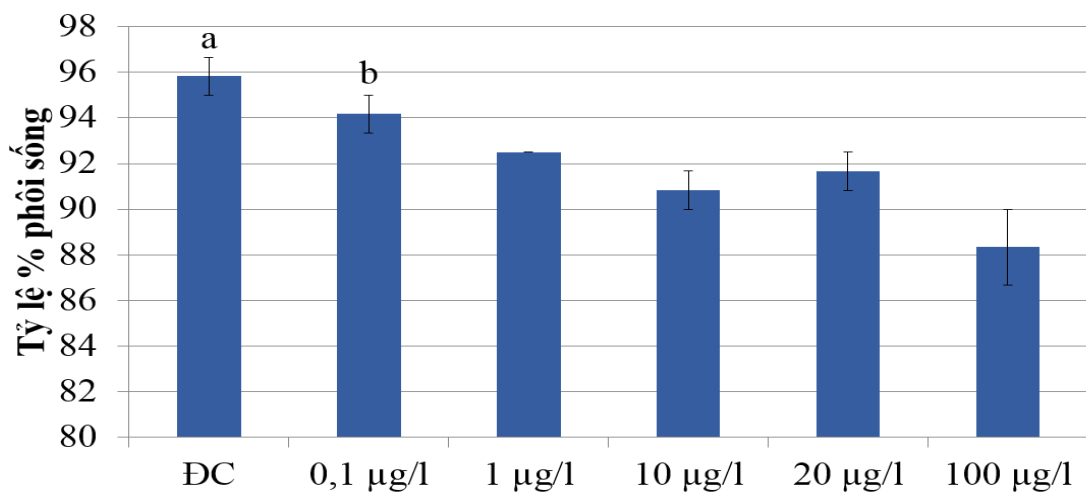


Hình 3.3. Thể hiện tỷ lệ % phôi sống giai 22-24h. a, b có khác biệt, có ý nghĩa thống kê. $P < 0.05$

Kết quả đánh giá tỷ lệ phát triển của phôi ở giai đoạn 22-24h được thể hiện ở Hình 3.3. Tỷ lệ phôi sống ở nhóm đối chứng cao hơn các lô thực nghiệm 98,33% ($P < 0,05$). Ở nhóm lô thí nghiệm 0,1 $\mu\text{g/L}$ và 1 $\mu\text{g/L}$ có tỷ lệ sống lần lượt là 96,5% và 96,67% các tỷ lệ này nhỏ hơn so nhóm đối chứng. Tỷ lệ phôi sống trung bình ở các lô thí nghiệm từ 10 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$ và 100 $\mu\text{g/L}$ tiếp tục giảm giảm so với nhóm đối chứng lần lượt là 95%, 94,17%, 93,33%. Điều đó cho thấy sự gia tăng nồng độ chì làm giảm tỷ lệ sống phôi cá ngựa vằn giai đoạn 22-24h.

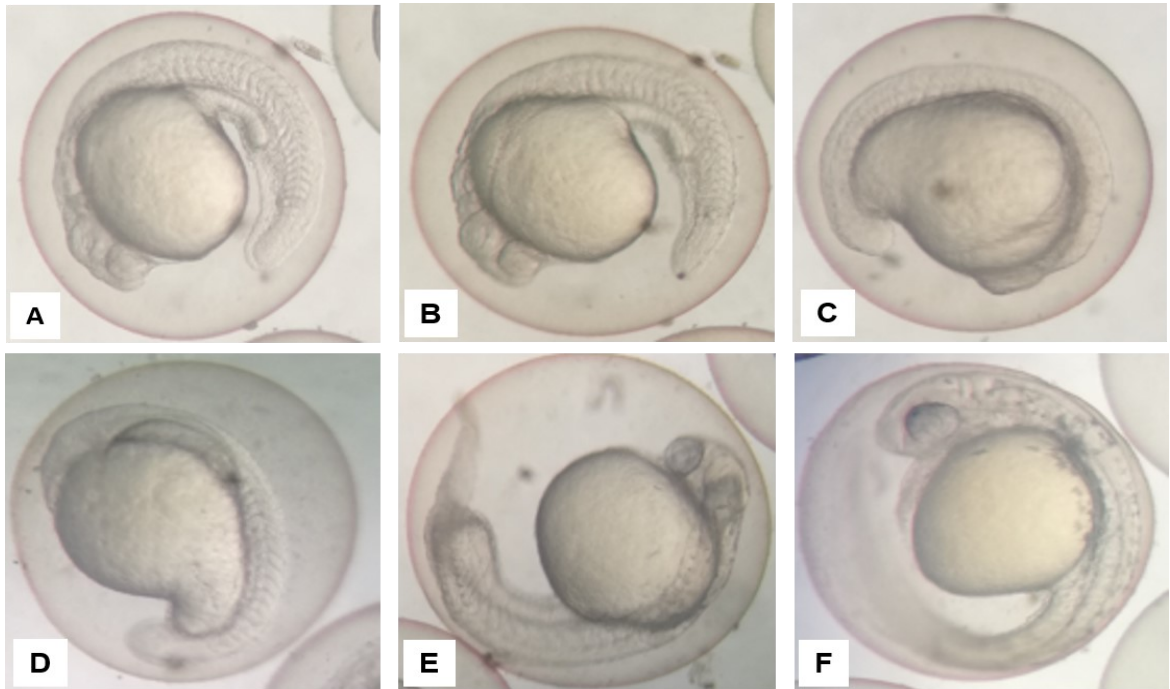


Hình 3.4. Tỷ lệ phôi sống qua các nồng độ chì (Pb^{2+}) gây nhiễm trong 22-24h (A, B, C, D, E, F) lần lượt (Đối chứng, 0,1 $\mu\text{g/L}$, 1 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$)

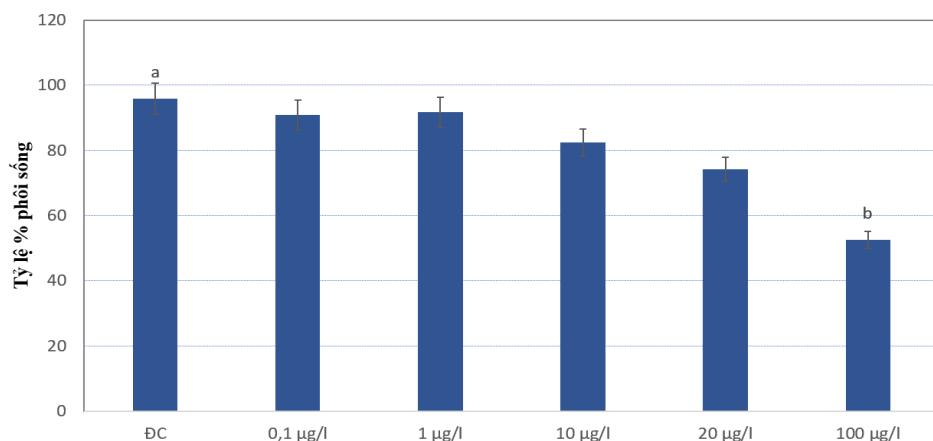


Hình 3.5. Thể hiện tỷ lệ % phôi sống giai đoạn 48h. a, b có khác biệt, có ý nghĩa thống kê. $P < 0,05$

Kết quả đánh giá tỷ lệ phát triển của phôi ở giai đoạn 48h được thể hiện ở Hình 3.5. Tỷ lệ phôi sống ở nhóm đối chứng cao hơn các lô thực nghiệm 95,83% ($P < 0,05$). Ở lô thí nghiệm 0,1 $\mu\text{g/L}$ và 1 $\mu\text{g/L}$ có tỷ lệ sống lần lượt là 94,17% và 92,5% các tỷ lệ này nhỏ hơn so nhóm đối chứng. Tỷ lệ phôi sống trung bình ở các lô thí nghiệm từ 10 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$ và 100 $\mu\text{g/L}$ tiếp tục giảm giảm so với nhóm đối chứng lần lượt là 90,83%, 91,67%, 88,33%. Điều đó cho thấy sự gia tăng nồng độ chì làm giảm tỷ lệ sống phôi cá ngựa vằn giai đoạn 48h.

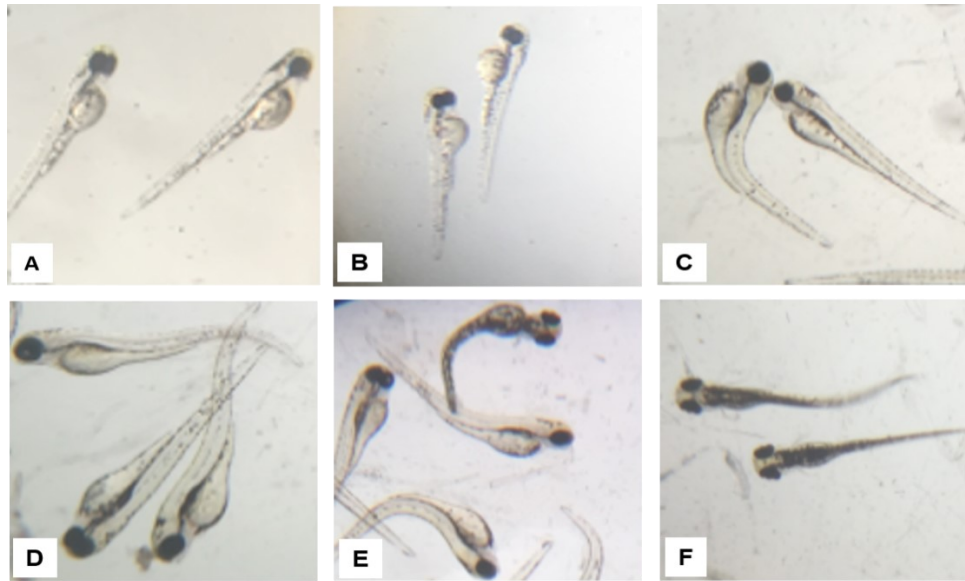


Hình 3.6. Tỷ lệ phôi sống qua các nồng độ chì (Pb^{2+}) gây nhiễm trong 48h. (A, B, C, D, E, F) lần lượt (Đối chứng, 0,1 $\mu\text{g/L}$, 1 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$)

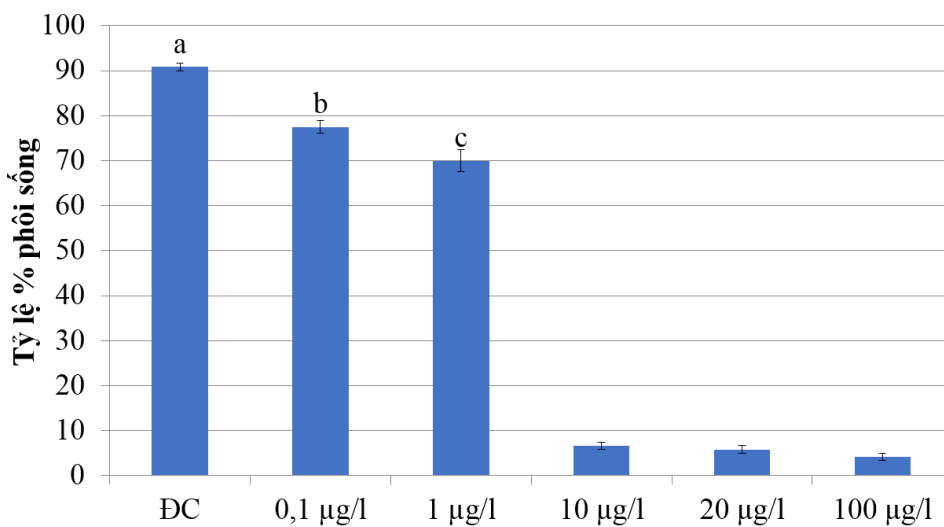


Hình 3.7. Thể hiện tỷ lệ % phôi sống giai đoạn 72h. a, b có khác biệt, có ý nghĩa thống kê. $P < 0.05$

Kết quả đánh giá tỷ lệ phát triển của phôi ở giai đoạn 72h được thể hiện ở Hình 3.7. Tỷ lệ phôi sống ở nhóm đối chứng cao hơn các lô thực nghiệm 95,83% ($P < 0,05$). Ở lô thí nghiệm 0,1 $\mu\text{g/L}$ và 1 $\mu\text{g/L}$ có tỷ lệ sống lần lượt là 90,83% và 91,67% các tỷ lệ này nhỏ hơn so nhóm đối chứng. Tỷ lệ phôi sống trung bình ở các lô thí nghiệm từ 10 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$ và 100 $\mu\text{g/L}$ tiếp tục giảm giảm so với nhóm đối chứng lần lượt là 82,5%, 74,17%, 52,5%. Điều đó cho thấy sự gia tăng nồng độ chì làm giảm tỷ lệ sống phôi cá ngựa vằn giai đoạn 72h, tỷ lệ sống thấp nhất ở nồng độ 100 $\mu\text{g/L}$.

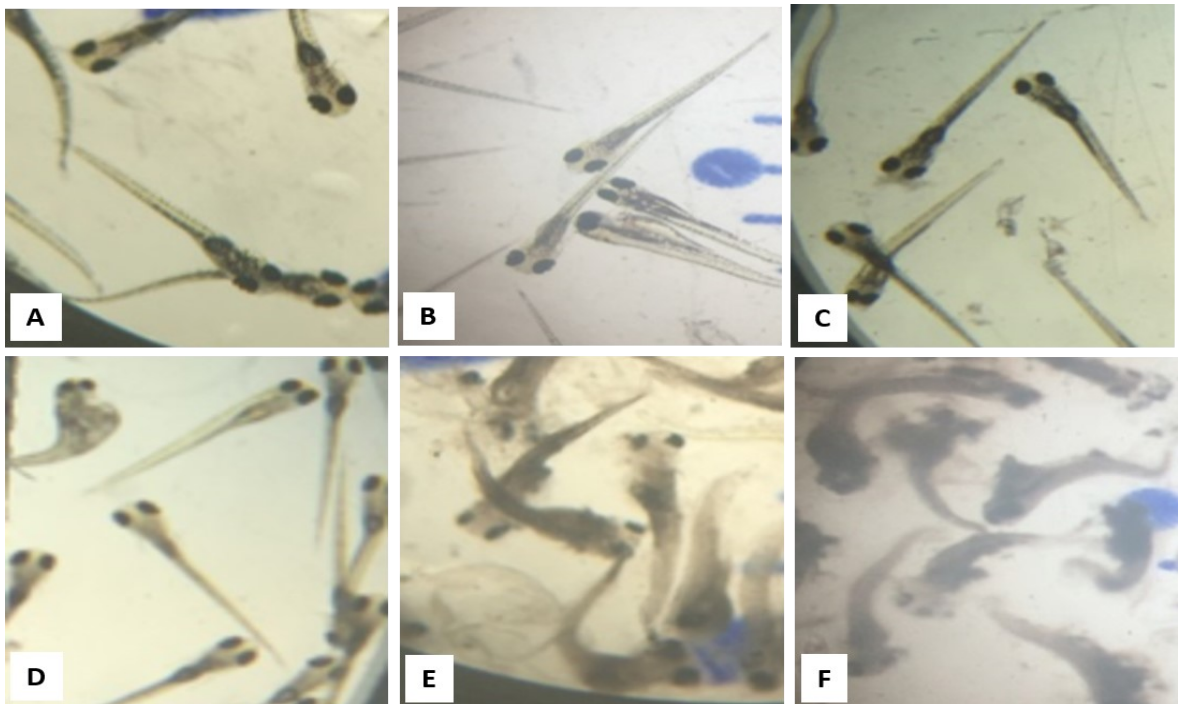


Hình 3.8. Tỷ lệ phôi sống qua các nồng độ chì (Pb^{2+}) gây nhiễm trong 72h. (A, B, C, D, E, F) lần lượt (Đối chứng, 0,1 $\mu\text{g/L}$, 1 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$)



Hình 3.9. Thể hiện tỷ lệ % phôi sống giai đoạn 168h. a, b, c có khác biệt có ý nghĩa thống kê. $P < 0,05$

Kết quả đánh giá tỷ lệ phát triển của phôi ở giai đoạn 168h được thể hiện ở Hình 3.9. Tỷ lệ phôi sống ở nhóm đối chứng cao hơn các lô thực nghiệm 90,83%. Ở lô thí nghiệm 0,1µg/L và 1µg/L có tỷ lệ sống lần lượt là 77,5% và 70% các tỷ lệ này nhỏ hơn so nhóm đối chứng. ($P < 0,05$). Tỷ lệ phôi sống trung bình ở các lô thí nghiệm từ 10µg/L, 20µg/L và 100µg/L giảm mạnh với nhóm đối chứng lần lượt là 6,67%, 5,83%, 4,17%. Điều đó cho thấy sự gia tăng nồng độ chì làm giảm tỷ lệ sống phôi cá ngựa vằn giai đoạn 168h, tỷ lệ sống thấp nhất ở nồng độ 10µg/L, 20µg/L và 100µg/L.



Hình 3.10. Tỷ lệ phôi sống qua các nồng độ chì (Pb^{2+}) gây nhiễm trong 168h. (A, B, C, D, E, F lần lượt là các nhóm đối chứng, 0,1µg/L, 1µg/L, 10µg/L, 20µg/L, 100µg/L)

Giai đoạn đầu ngay sau khi thụ tinh đặc biệt nhạy cảm với các nồng độ gây độc, khi hầu hết các rối loạn và tỷ lệ tử vong phôi cao nhất xảy ra. Ion kim loại trong nước cũng thúc đẩy sự bất thường phát triển trong quá trình phát sinh cơ quan, bao gồm dị tật cơ thể. Ion kim loại nặng thường gây ra sự chậm trễ trong quá trình nở, nở sớm, biến dạng và chết của ấu trùng mới nở. Tất cả những xáo trộn này dẫn đến số lượng giảm và chất lượng kém của ấu trùng, cho thấy kích thước cơ thể nhỏ, tần số dị tật cao và khả năng sống sót giảm [166].

Trong nghiên cứu này, Pb^{2+} đã gây ảnh hưởng đến tỷ lệ phôi sống của cá ngựa vằn, tỷ lệ phôi sống đạt cao nhất ở lô đối chứng và thấp nhất ở nồng độ

100µg/L giai đoạn tiêu noãn hoàng (168h). Nguyên nhân có thể do trong giai đoạn này phôi được bảo vệ bởi lớp vỏ dày, làm hạn chế sự xâm nhập và gây hại của chì, có thể nồng độ chì (Pb^{2+}) gây nhiễm xâm nhập vào phôi chưa đủ lớn để gây ra rối loạn các quá trình chuyển hóa và quá trình hình thành cơ quan bộ phận, nên không gây chết phôi cá với số lượng lớn [124]. Tuy nhiên từ giai đoạn tiêu noãn hoàng (168h), giai đoạn này phôi cá đã nở thành ấu trùng và tỷ lệ tử vong và dị tật của ấu trùng được tăng lên với sự gia tăng nồng độ và thời gian tiếp xúc của kim loại chì trong thời gian thực nghiệm. Nguyên nhân có thể do ấu trùng cá ngựa vằn hấp thụ các phân tử nhỏ được pha loãng trong nước qua da và mang của chúng [166]. Chì (Pb^{2+}) cũng xâm nhập vào cơ thể cá ngựa vằn bằng miệng ở giai đoạn miệng nhô ra (72h).

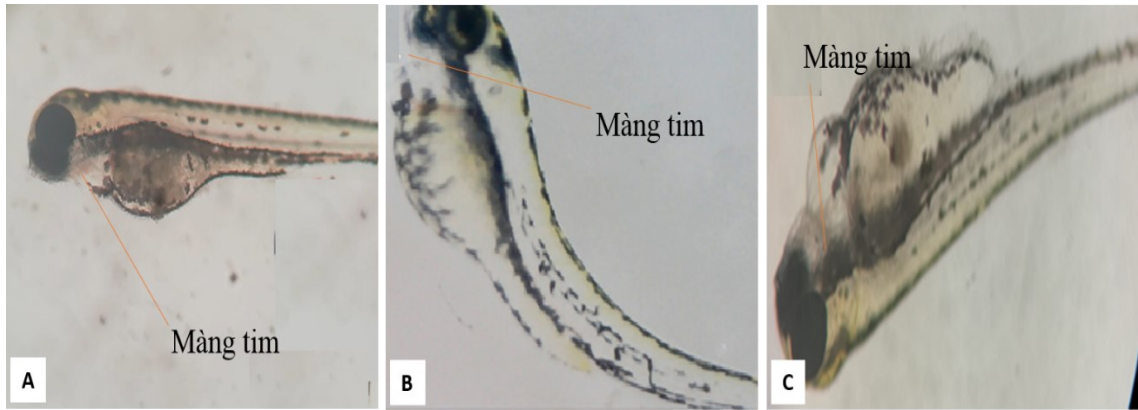
Ngoài ra, chì đã được tìm thấy để ức chế dẫn điện xung bằng cách ức chế các hoạt động của mono aminooxidase và acetylcholine esterase, để gây ra những thay đổi bệnh lý ở mô và các cơ quan [167] làm suy yếu sự phát triển của phôi thai và ấu trùng của loài cá [168].

Theo dữ liệu của nhiều tác giả khác nhau đã báo cáo về ảnh hưởng của kim loại nặng đến sự phát triển phôi cá. Ảnh hưởng của cadmium đến phôi và ấu trùng cá chép thông thường được quan sát bởi Malgorzata Witeska và cộng sự (1995), cũng cho thấy sự biến thiên của từng cá thể cao về tính miễn cảm của ấu trùng nhiễm độc cadmium [169]. Sự hiện diện của kim loại nặng trong hệ sinh thái dưới nước có thể can thiệp đáng kể vào sự phân bố của các loài, chủ yếu là do độc tính cao của chúng đối với phôi và ấu trùng cá [170].

Kết quả nghiên cứu hiện tại chỉ ra rằng chì (Pb^{2+}) có trong môi trường nước là nguyên nhân dẫn đến sự tăng trưởng và phát triển chậm của các giai đoạn phát triển của cá, biến dạng hình thái (cong cột sống, cơ thể ngắn,...), giảm sự sống của cá. Ở nồng độ cao, thời gian nhiễm đủ lớn cá có thể tử vong hoặc có thể thay đổi về mặt hình thái cũng như tỷ lệ tử vong.

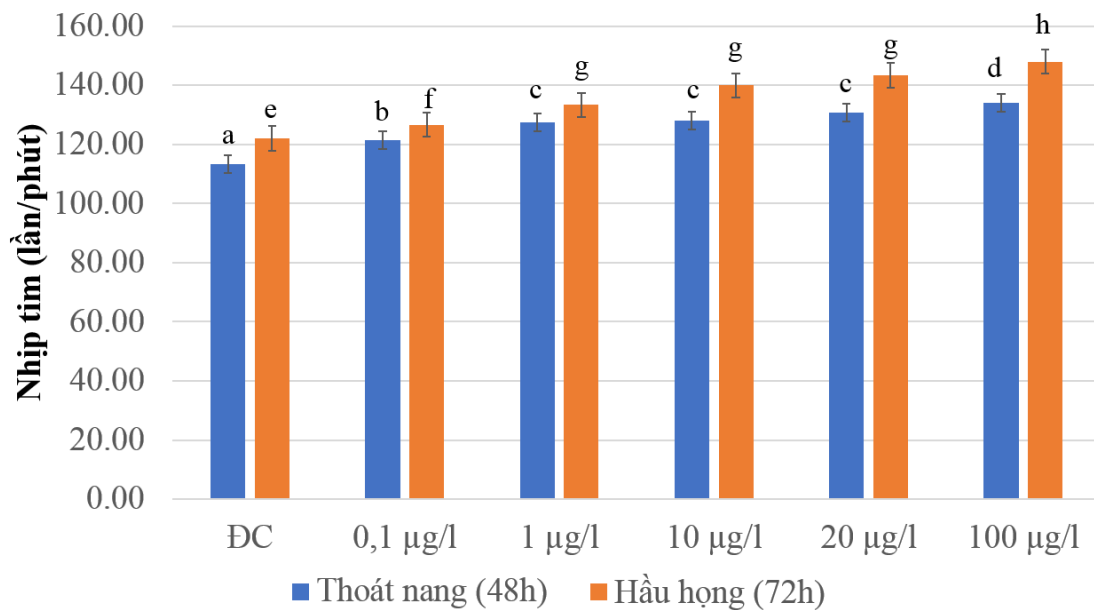
3.2. Xác định ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên nhịp tim phôi cá ở các giai đoạn khác nhau

Sau khi tiếp xúc với nồng độ chì khác nhau, phôi và ấu trùng cá ngựa vằn có những dấu hiệu biến đổi thay đổi về tim như: tim đập nhanh, phù màng tim.



Hình 3.11. Ấu trùng cá ngựa vằn cho thấy sự phù màng tim bất thường sau nhiễm độc chì; A-Đối chứng; B, C-Bất thường ở màng tim

Kết quả sau đây thể hiện nhịp tim của cá ngựa vằn sau khi tiếp xúc với các nồng độ chì khác nhau.



Hình 3.12. Biểu đồ thể hiện nhịp tim của phôi cá ngựa vằn tại các nồng độ chì (Pb^{2+}) được thực nghiệm ở giai đoạn 48h và 72h. a, b, c, d là sự khác biệt nhịp tim ở các nồng độ khác nhau ở giai đoạn 48h; e, f, g, h là sự khác biệt nhịp tim ở các nồng độ khác nhau ở giai đoạn 72h. $P < 0.05$

Sau khi tiếp xúc với nồng độ chì khác nhau, phôi và ấu trùng cá ngựa vằn có những dấu hiệu thay đổi về tim như: tim đập nhanh, phù màng tim. Trong quá trình phát triển của phôi, nhịp tim có thể quan sát dưới kính hiển vi bắt đầu từ giai đoạn thoát nang [124]. Chì (Pb^{2+}) ảnh hưởng đến nhịp tim của cá ngựa vằn được thể hiện

rõ ở giai đoạn thoát nang và giai đoạn hậu hộng, kết quả được thể hiện trên biểu đồ trên. Hình 3.12 cho thấy, cả hai giai đoạn khảo sát thể hiện nhịp tim của phôi cá ngựa vằn thay đổi và có xu hướng tăng dần theo nồng độ chì gây nhiễm, đồng thời nhịp tim cũng tăng dần theo các giai đoạn khảo sát. Theo Trần Thị Phương Dung (2018) [171], nguyên nhân có thể là 2 giai đoạn thoát nang và hậu hộng phôi cá đã nở thành ấu trùng do đó áp lực nước tác động trực tiếp lên cá ấu trùng làm cho hoạt động tuần hoàn tăng dẫn đến tăng nhịp tim ở cá.

Ở giai đoạn thoát nang nhịp tim của phôi được gây nhiễm chì (Pb^{2+}) ở các nồng độ 0,1, 1, 10, 20, 100 μ g/L tăng cao hơn 8 ÷ 21 nhịp/phút so với nhịp tim của phôi ở lô đối chứng ($P \leq 0,05$). Đối với giai đoạn hậu hộng nhịp tim của phôi ở nồng độ 0,1 μ g/L tăng không đáng kể so với lô đối chứng, còn nhịp tim của các phôi ở các nồng độ 1, 10, 20, 100 μ g/L so với lô đối chứng tăng cao hơn 11 ÷ 26 nhịp/phút.

Khi nồng độ chì (Pb^{2+}) tăng làm cho nhịp tim tăng, ấu trùng đã được tiếp xúc với chì có nhịp tim cao hơn nhóm đối chứng. Nhịp tim của phôi và ấu trùng ở cả hai giai đoạn thoát nang và giai đoạn hậu hộng đều tăng lên và cao nhất ở nồng độ 100 μ g/L, thấp nhất ở lô đối chứng. Vậy có thể nói, chì (Pb^{2+}) đã gây rối loạn nhịp tim, nồng độ chì (Pb^{2+}) gây nhiễm càng lớn thì nhịp tim càng tăng. Phôi và ấu trùng tiếp xúc với kim loại nặng có nhịp tim cao hơn so với nhóm đối chứng, điều này chỉ ra rằng căng thẳng do kim loại gây ra sự gia tăng tỷ lệ trao đổi chất. Giảm nhịp tim trong quá trình nở được quan sát ở nhiệt độ không tối ưu và đặc biệt rõ rệt ở phôi tiếp xúc với kim loại [172]. Cũng có thể trong quá trình phát, ấu trùng cá ra ngoài môi trường trong giai đoạn đầu không còn sự bao bọc của lớp màng như giai đoạn phôi nữa nên cá sẽ gặp nhiều yếu tố bất lợi từ môi trường và chủ động tìm nguồn thức ăn nên cũng có thể dẫn đến tăng quá trình trao đổi chất dẫn đến nguyên nhân tăng nhịp tim. Hoặc chì (Pb^{2+}) gây ra sự căng thẳng dẫn đến sự gia tăng cường độ hoạt động và trao đổi chất dẫn đến nhịp tim tăng, do đó sự trao đổi chất càng tăng thì nhịp tim càng tăng để thích nghi với môi trường sống, phôi và ấu trùng khi tiếp xúc môi trường (Pb^{2+}) gây tăng phản ứng căng thẳng trong cơ thể dẫn đến tăng nhịp tim, cũng có thể do cơ chế gây độc của (Pb^{2+}) là sự gián đoạn quá trình ion hóa dẫn đến tăng nhịp tim.

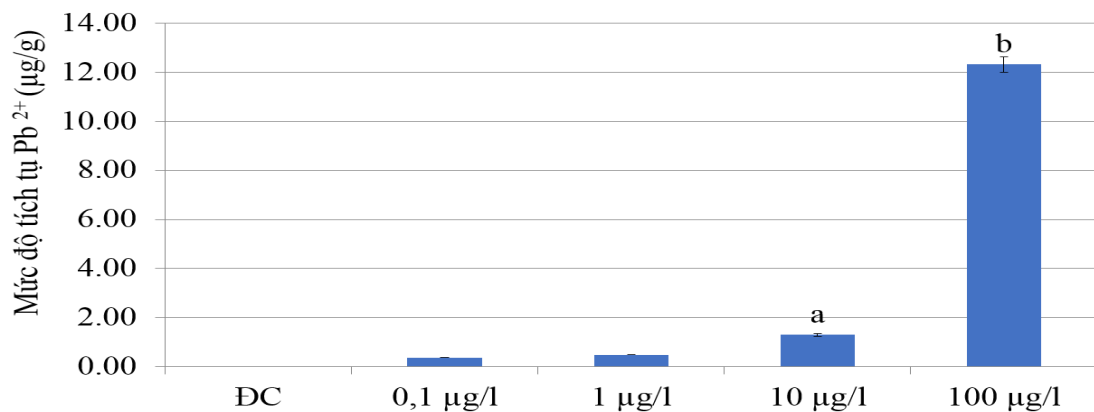
Nhịp tim ở giai đoạn hậu hộng nhanh hơn so với nhịp tim giai đoạn thoát nan. Như vậy khi phôi càng phát triển thì nhịp tim càng tăng do sự trao đổi chất trong cơ thể tăng do lượng (Pb^{2+}) tích tụ tăng, thời gian sống càng lâu thì lượng chì tích tụ trong cơ thể tăng làm ảnh hưởng đến các cơ quan của cá trong đó có nhịp tim.

Kết quả nghiên cứu hiện tại chỉ ra rằng chì (Pb^{2+}) có trong môi trường nước là nguyên nhân dẫn đến sự tăng trưởng và phát triển chậm của các giai đoạn phát triển của cá, biến dạng hình thái (cong cột sống, cơ thể ngắn,...), giảm sự sống của cá. Ở nồng độ cao, thời gian nhiễm đủ lớn cá có thể tử vong hoặc có thể thay đổi về mặt hình thái cũng như tỷ lệ tử vong.

3.3. Xác định hàm lượng tích tụ chì (Pb^{2+}) trong cơ quan phát triển của cá

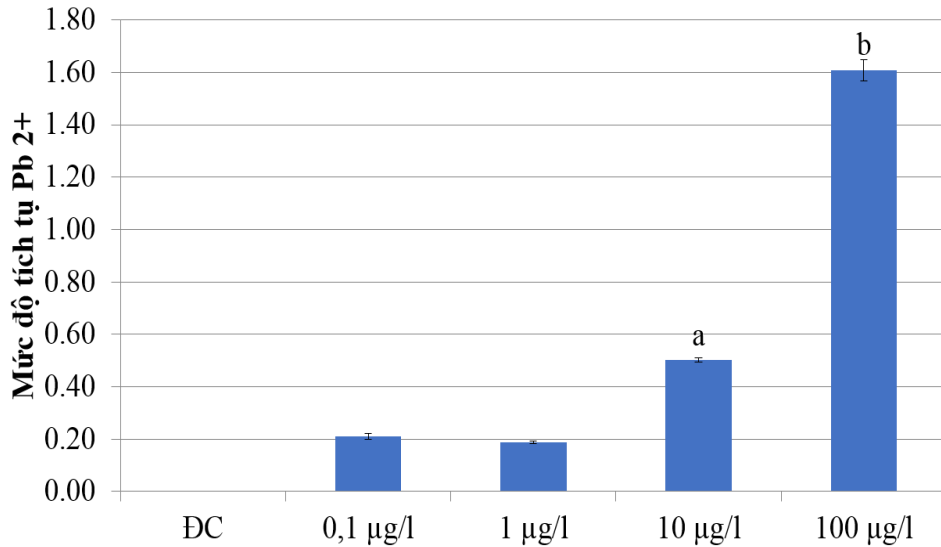
Kim loại nặng được biết đến là nguồn tích lũy độc học trên các loài động vật thủy sinh. Kết quả của nhiều nghiên cứu thực địa về tích lũy kim loại ở cá sống trong vùng nước bị ô nhiễm cho thấy một lượng đáng kể các kim loại khác nhau có thể là lắng đọng trong các mô cá mà không gây tử vong [173]. Sinh vật thủy sinh tích lũy Pb^{2+} từ nước và chế độ ăn uống, mặc dù có bằng chứng cho thấy sự tích lũy Pb^{2+} trong cá, có lẽ hầu hết có nguồn gốc từ nước bị ô nhiễm hơn chế độ ăn uống [174]. Sự tích lũy chì (Pb^{2+}) trong các loài cá khác nhau đã được nghiên cứu, đều cho thấy sự ảnh hưởng rối loạn trong cơ thể cá [175].

Sau khi cảm ứng chì (Pb^{2+}), cá được đưa gửi đi phân tích lượng chì (Pb^{2+}) tích tụ trong toàn bộ cơ thể tại Công ty TNHH phân tích kiểm nghiệm Việt Tín. Sau đây là kết quả đã phân tích trên toàn cơ thể cá ngựa vằn trưởng thành:



Hình 3.13. Lượng Pb^{2+} tích tụ trong nội quan cá ngựa vằn. a, b có khác biệt, có ý nghĩa thống kê. $P < 0.05$

Kết quả phân tích lượng Pb^{2+} tích tụ trong nội quan cá ngừ vằn có thể thấy lượng Pb^{2+} tích tụ trong nội quan cá ngừ vằn ở nồng độ $100\mu\text{g/L}$ chiếm tỷ lệ cao nhất ($12,31\mu\text{g/g}$) và cao gấp 12,31 lần so với nồng độ $10\mu\text{g/L}$, gấp 25,12 lần so với nồng độ $1\mu\text{g/L}$, gấp 32,39 lần so với nồng độ $0,1\mu\text{g/L}$. Đối với lô đối chứng tỷ lệ là 0%, chứng tỏ lượng Pb^{2+} không tích tụ trong cơ thể cá.



Hình 3.14. Biểu đồ lượng Pb^{2+} tích tụ trong cơ và xương cá ngừ vằn. a, b có khác biệt, có ý nghĩa thống kê. $P < 0.05$

Lượng Pb^{2+} tích tụ trong cơ và xương cá ngừ vằn thể hiện ở (Hình 3.15) cho thấy, nồng độ $100\mu\text{g/L}$ chiếm $2,22\mu\text{g/g}$ và cao gấp 3,1 lần so với nồng độ $10\mu\text{g/L}$, gấp 8,2 lần so với nồng độ $1\mu\text{g/L}$ và nồng độ $0,1\mu\text{g/L}$. Đối với lô đối chứng chưa nhận thấy sự hiện diện của chì ở nhóm đối chứng.

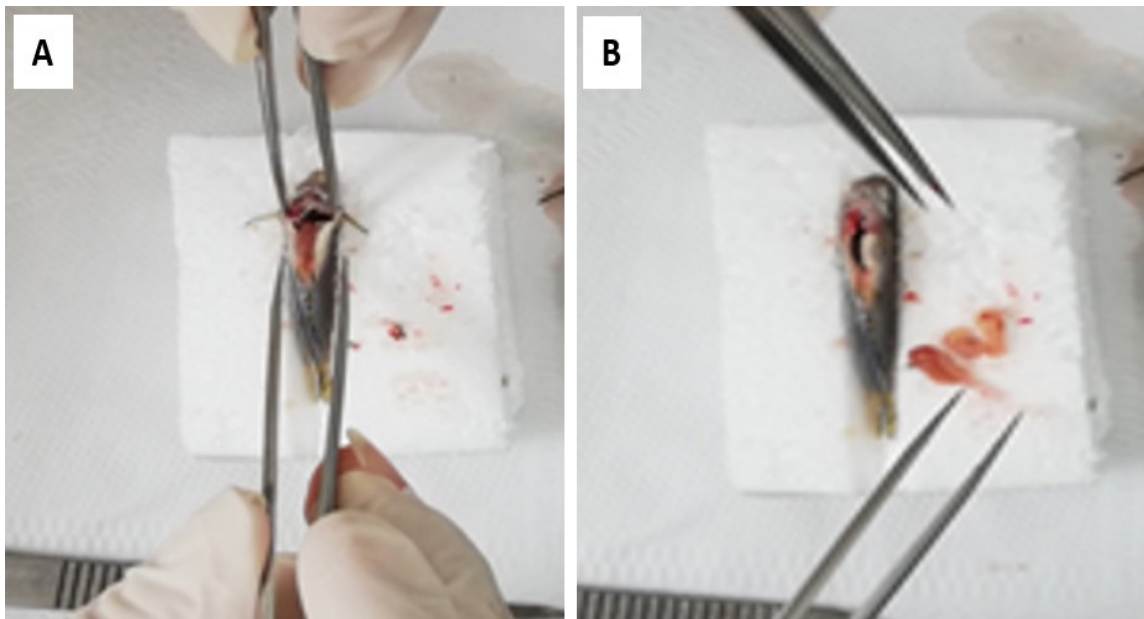
Trong nghiên cứu này, hàm lượng (Pb^{2+}) tích tụ trong cá ngừ vằn được phân tích bởi 90 con cá với các nồng độ chì (Pb^{2+}) khác nhau ($0,1\mu\text{g/L}$, $1\mu\text{g/L}$, $10\mu\text{g/L}$, $100\mu\text{g/L}$). Kết quả lượng Pb^{2+} tích tụ trong cơ và xương cá ngừ vằn thể hiện ở (hình 3.15) cho thấy, nồng độ $100\mu\text{g/L}$ chiếm $2,22\mu\text{g/g}$ và cao gấp 3,1 lần so với nồng độ $10\mu\text{g/L}$, gấp 8,2 lần so với nồng độ $1\mu\text{g/L}$ và nồng độ $0,1\mu\text{g/L}$. Đối với lô đối chứng chưa nhận thấy sự hiện diện của chì trong thí nghiệm này. Sự tích tụ chì (Pb^{2+}) trong nội quan, cơ, xương và toàn cơ thể cá ngừ vằn có xu hướng tăng dần khi nồng độ chì tăng. Điều này cũng cho thấy rằng, sự tích tụ kim loại nặng trong cơ thể cá phụ thuộc vào nồng độ gây nhiễm và thời gian tiếp xúc của cá. Có thể nội quan là nơi tập trung những bộ phận chính yếu bao gồm thận, gan, ruột và một số

phần khác, những bộ phận này có khả năng hấp thu nhanh và mạnh (Pb^{2+}) từ môi trường sống, sự chuyển hóa của quá trình tích tụ sinh học trong cơ thể cá là một nguyên nhân gây tăng tuyến tính lượng (Pb^{2+}) tích tụ trong nội quan cá theo nồng độ khảo sát. Mặt khác, khả năng tích tụ (Pb^{2+}) trong cơ thể cá ngừ vẫn phụ thuộc vào thời gian gây nhiễm độc và môi trường. Ở môi trường nước có lượng (Pb^{2+}) càng cao làm tăng hấp thụ và chuyển hóa, cũng như khả năng xâm nhập (Pb^{2+}) từ môi trường nước vào cơ thể cá thông qua nguồn thức ăn. Do đó, trong quá trình tách từng bộ phận cơ thể cá làm thí nghiệm, kích thước mẫu quá nhỏ và ít; hơn nữa, chúng tôi còn gặp nhiều hạn chế trong việc tách mẫu nên chúng tôi đã chưa thể tách riêng được phần thức ăn có sẵn trong nội quan. Điều này có thể sẽ gây ra một số sai sót trong việc phân tích mẫu cho ra kết quả hàm lượng (Pb^{2+}) tích tụ trong cơ và xương, nội quan chính xác hơn. Kết quả phân tích lượng Pb^{2+} tích tụ trong nội quan cá ngừ vẫn có thể thấy lượng Pb^{2+} tích tụ trong nội quan cá ngừ vẫn ở nồng độ $100\mu\text{g/L}$ chiếm tỷ lệ cao nhất ($12,31\mu\text{g/g}$) và cao gấp 12,31 lần so với nồng độ $10\mu\text{g/L}$, gấp 25,12 lần so với nồng độ $1\mu\text{g/L}$, gấp 32,39 lần so với nồng độ $0,1\mu\text{g/L}$. Đối với lô đối chứng tỷ lệ là 0%, chứng tỏ lượng Pb^{2+} không tích tụ trong cơ thể cá. Lượng Pb^{2+} tích tụ trong cơ và xương cá ngừ vẫn thể hiện ở (Hình 3.15) cho thấy, nồng độ $100\mu\text{g/L}$ chiếm $2,22\mu\text{g/g}$ và cao gấp 3,1 lần so với nồng độ $10\mu\text{g/L}$, gấp 8,2 lần so với nồng độ $1\mu\text{g/L}$ và nồng độ $0,1\mu\text{g/L}$. Đối với lô đối chứng chưa nhận thấy sự hiện diện của chì ở nhóm đối chứng. Đối với lô đối chứng chưa nhận thấy sự hiện diện của chì ở nhóm đối chứng chứng tỏ lượng Pb^{2+} không tích tụ trong cơ thể cá. Như vậy, hàm lượng Pb^{2+} cơ và xương đạt cao nhất ở nồng độ $100\mu\text{g/L}$, sau đó giảm xuống ở nồng độ $10\mu\text{g/L}$. Những kết quả phân tích trên được giải thích như sau: Nội quan là nơi có những cơ quan đích mà Pb^{2+} được hấp thu nhanh và mạnh. Xương là bộ phận chịu tác động của sự cạnh tranh giữa Pb^{2+} và Ca^{2+} trong cơ thể. Hàm lượng Pb^{2+} tích tụ trong xương có xu hướng ngày càng tăng. Hậu quả của việc này sẽ gây ra những tổn thương trên xương đốt sống của cá, dẫn đến loãng xương làm cong xương sống. Nếu tích tụ lượng lớn Pb^{2+} trong một thời gian dài sẽ gây ra những đột biến di truyền trên cá; Sự tích tụ Pb^{2+} trong cơ biến động không đều và có mối quan hệ chặt chẽ với xương. Nếu khi cơ thể cá vượt được ngưỡng tác động tới quá trình sống và hấp thu thì lượng Pb^{2+} tích tụ sẽ ngày càng tăng mạnh hơn so với những nồng độ dưới ngưỡng tác động. Như vậy, kết quả

so sánh về lượng Pb^{2+} tích tụ trong cơ thể cá ngừ vằn ở các nồng độ đang khảo sát đều cho thấy hàm lượng tích tụ này đã vượt mức cho phép theo Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia Việt Nam QCVN 8-1:2011/BYT [176]. Mô hình khảo sát này phần nào phản ánh được lượng Pb^{2+} tích tụ khi gây nhiễm độc ở các nồng độ khác nhau. Qua kết quả nghiên cứu có thể thấy, cơ và xương là nơi tích tụ kim loại chì cao nhất, tiếp theo là nội quan của cá.

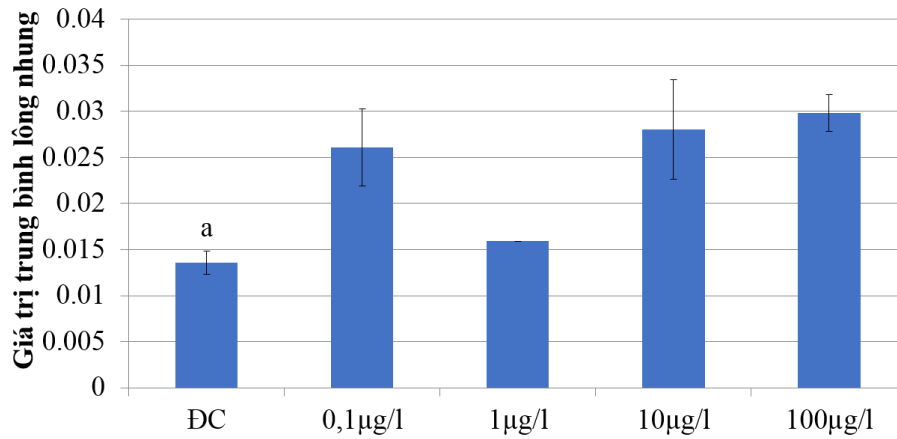
3.4. Xác định ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên cấu trúc mô ruột

Để đánh giá ảnh hưởng chì (Pb^{2+}) lên cấu trúc mô ruột và mô buồng trứng của cá ngừ vằn, cá sẽ được nuôi trong môi trường có chứa nồng độ Pb^{2+} cảm ứng khác nhau trong 7 ngày. Sau đó thu nhận cá, gây tê cá bằng Lidocain 2%, mổ cá để lấy các mẫu ruột và buồng trứng.



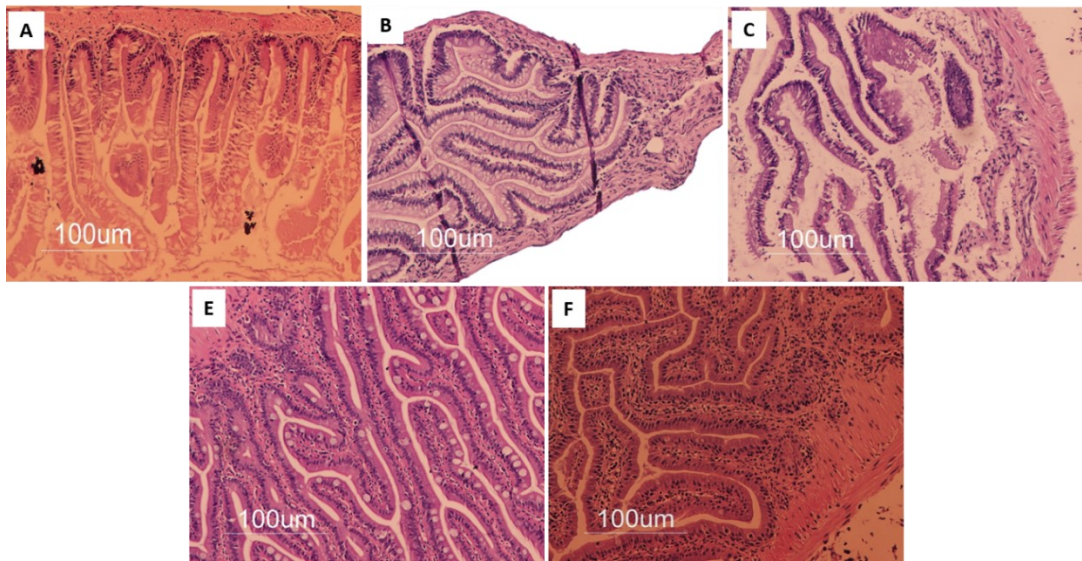
Hình 3.15. Mổ cá thu nhận mẫu ruột và buồng trứng để cắt lớp mô

Phương pháp phơi nhiễm kim loại nặng trên cá ngừ vằn có thể gây ra những tổn thương các mô tế bào, thay đổi cấu trúc mô như mô ruột và mô buồng trứng,... Kết quả sau đây cho thấy, sự thay đổi cấu trúc mô ruột và mô buồng trứng của cá ngừ vằn khi phơi nhiễm với các nồng độ Pb^{2+} cảm ứng:



Hình 3.16. Thể hiện sự ảnh hưởng của các nồng độ Pb²⁺ cảm ứng lên ruột của cá

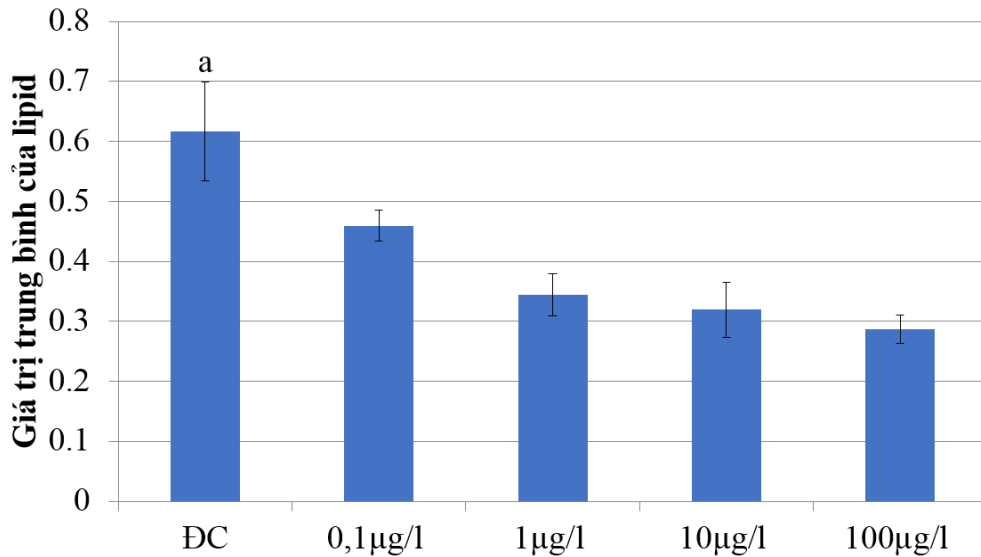
Cấu trúc mô ruột của cá ngựa vằn có sự thay đổi các lông nhung tăng khi cá tiếp xúc với nồng độ Pb²⁺ cao tương ứng. Ở nồng độ 0,1µg/L đến 100µg/L đều tăng tỷ lệ lông nhung so với lô đối chứng và có sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$), tuy nhiên sự chênh lệch không quá lớn giữa các nồng độ. Giá trị trung bình lông nhung ở nồng độ 10µg/L, 100µg/L gấp 2 lần so với lô đối chứng.



Hình 3.17. Hình cấu trúc ruột của cá ngựa vằn bằng phương pháp nhuộm HE.

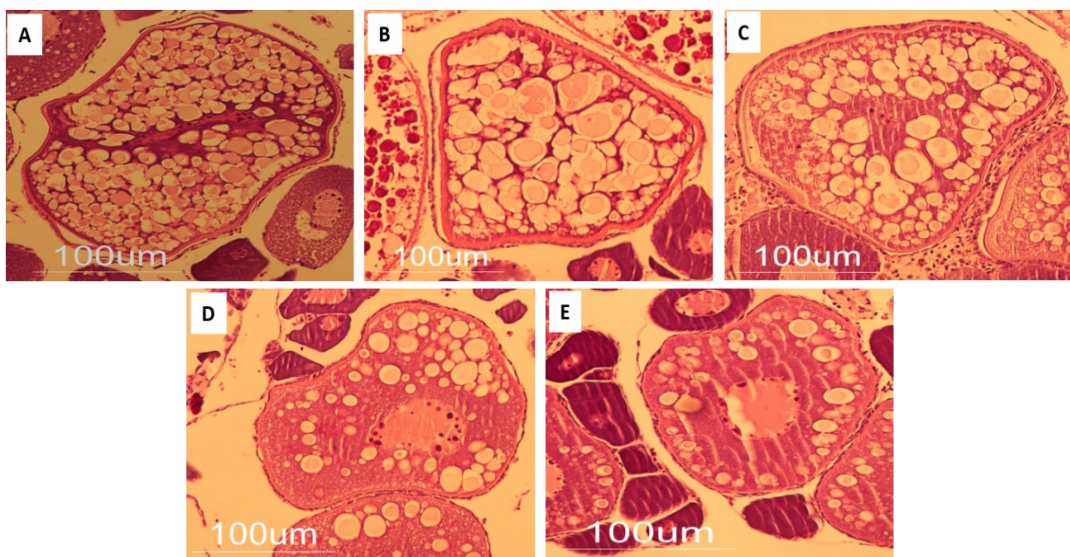
A: Nhóm đối chứng; B, C, D, E: Nhóm 0,1µg/L, 1µg/L, 10µg/L, 100µg/L

Thanh tỷ lệ 100µm.



Hình 3.18. Thể hiện sự ảnh hưởng của các nồng độ Pb²⁺ cảm ứng chì lên buồng trứng của cá ngựa vằn.

Cấu trúc mô buồng trứng của cá ngựa vằn có sự thay đổi khi cá tiếp xúc với nồng độ Pb²⁺ càng cao thì tỷ lệ các hạt lipid càng giảm. Ở nồng độ 0,1µg/L đến 100µg/L đều giảm tỷ lệ các hạt lipid so với lô đối chứng, có sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$), tuy nhiên sự chênh lệch không quá lớn giữa các nồng độ. Nồng độ 100µg/L giảm nhiều nhất, giảm 2,2 lần so với lô đối chứng, tiếp theo là nồng độ nồng độ 10µg/L, nồng độ 1µg/L, nồng độ 0,1µg/L. Điều đó chứng tỏ nồng độ ion chì tăng thì số lượng hạt lipid trong ruột giảm.



Hình 3.19. Hình cấu trúc tế bào trứng của cá ngựa vằn bằng phương pháp nhuộm HE.

A: Nhóm đối chứng; B, C, D, E: Nhóm 0,1µg/L, 1µg/L, 10µg/L, 100µg/L

Thanh tỷ lệ 100µm.

Cắt lớp mô buồng trứng của lô đối chứng, nhận thấy cấu trúc mô tương đối đồng nhất, các hạt lipid dày đặc. Cắt lớp mô buồng trứng lần lượt với các nồng độ 0,1µg/L, 1µg/L, 10µg/L, 100µg/L, cấu trúc của các lớp tế bào có sự phân tách (B, C), các hạt Lipid giảm dần.

Cắt lớp mô buồng trứng của lô đối chứng, nhận thấy cấu trúc mô tương đối đồng nhất, các hạt lipid dày đặc. Cắt lớp mô buồng trứng lần lượt với các nồng độ 0,1µg/L, 1µg/L, 10µg/L, 100µg/L, cấu trúc của các lớp tế bào có sự phân tách các hạt Lipid giảm dần.

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định những thay đổi về mô ruột và mô buồng trứng của cá ngựa vằn khi cá bị phơi nhiễm với chì (Pb^{2+}). Qua quan sát kết quả thu được rằng việc phơi nhiễm với chì (Pb^{2+}) của cá ngựa vằn đã làm thay đổi cấu trúc mô của cá, các lông nhung trong ruột và các lipid trong buồng trứng có sự khác nhau rõ ràng. Theo Tulasi Al, 1992, [177] đã nghiên cứu, sự phơi nhiễm cá nước ngọt *Anabas testudineus* đến mức giảm (5ppm) nồng độ chì nitrat trong khoảng thời gian 30 ngày trong giai đoạn chuẩn bị chu kỳ sinh sản hàng năm làm giảm tổng lượng lipid, phospholipid và mức cholesterol trong mô gan và buồng trứng trong khi nồng độ axit béo tự do tăng lên và hoạt động của lipase là cao. Biến động theo mùa trong hàm lượng lipid của buồng trứng và gan và hàm lượng cholesterol của buồng trứng, gan và huyết thanh liên quan đến chu kỳ sinh sản hàng năm ở *H. fossilis* đã được thực hiện, giảm hàm lượng lipid của gan có liên quan đến việc giảm chỉ số gan (HSI) trong các giai đoạn sinh sản nhưng có sự gia tăng rõ rệt mức độ lipid của buồng trứng trong các giai đoạn trên trùng khớp với hồ sơ chỉ số gonadosomatic (GSI) tăng cường. Huyết thanh và buồng trứng cho thấy sự sụt giảm trong hàm lượng cholesterol của họ trong quá trình sinh sản trước khi tăng mức độ trong thời gian sinh sản. Sự phân hủy cholesterol trong gan bắt đầu từ trước và tiếp tục cho đến giai đoạn sinh sản và sau đó lấy lại xu hướng tăng [178]. Theo nghiên cứu của Jinling Cao (2019), đã chứng minh rằng kim loại nặng có thể ngăn chặn sự phát triển của cá ngựa vằn và ảnh hưởng đáng kể đến sinh sản ở cả hai giới bằng cách làm hỏng cấu trúc của tuyến sinh dục, làm thay đổi nồng độ hormone steroid và biểu hiện của các gen liên quan đến nội tiết trong HPG của cá ngựa vằn, nghiên cứu này cho thấy kim loại nặng ảnh hưởng xấu đến hệ thống nội tiết sinh sản ở cá ngựa vằn và có thể là mối đe dọa tiềm tàng đối với quần thể cá sống ở vùng nước bị

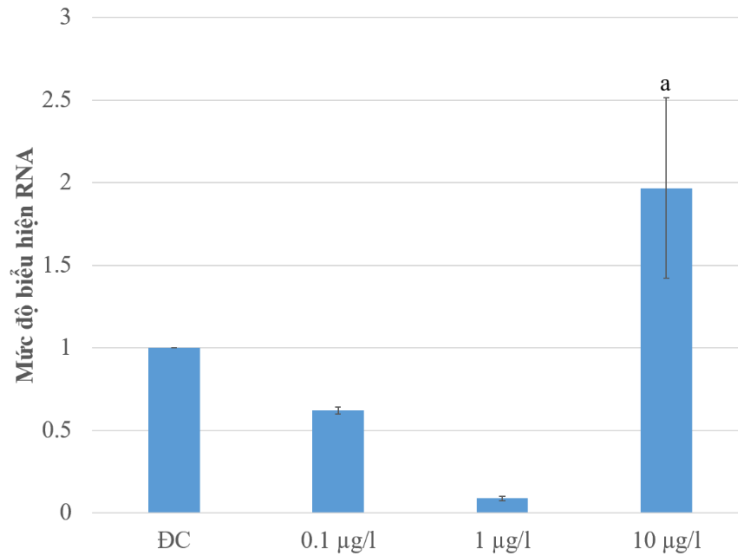
nhễm kim loại [179]. Những thay đổi gây ra bởi các chất ô nhiễm kim loại nặng trong quá trình trưởng thành tế bào trứng cá có thể liên quan đến nhiễm độc trứng, tích lũy kim loại trong trứng hoặc ảnh hưởng trực tiếp của kim loại đến quá trình tạo gen. Sự trưởng thành tế bào trứng là nhạy cảm nhất với nhiễm độc kim loại. Do đó, các rối loạn khác nhau gây ra bởi các chất ô nhiễm kim loại nặng trong quá trình phát triển tế bào trứng dẫn đến giảm số lượng và chất lượng trứng [180].

Theo kết quả nghiên cứu, lông nhung trong ruột tăng lên và mô mỡ giảm dần theo nồng độ chì. Trong nghiên cứu của Chhaya Bhatnagar et. al (2007), tác động thoái hóa là rõ ràng trong niêm mạc và nhung mao của ruột [181]. Những thay đổi siêu nhỏ trong mô ruột biểu hiện nhiều vi khuẩn thoái hóa bên trong lòng ruột với tối đa bốn chuỗi OMV gắn vào biểu mô ruột, sự gắn kết này có liên quan đến sự suy giảm của các tế bào ruột và microvilli của nó với sự tích tụ của biểu mô bị bong tróc trong ruột, sự xâm nhập của thoái hóa EGC và DC-Like đã được quan sát thấy trong biểu mô ruột hoại tử [182]. Theo El-Sayed Mohamed Younis et. al (2013), những thay đổi mô bệnh học quan sát thấy trong ruột của cá *Oreochromis niloticus* và *Lates niloticus* cho thấy những thay đổi nghiêm trọng về thoái hóa và hoại tử ở niêm mạc ruột [183]. Phù giữa niêm mạc có thể là kết quả của sự hấp thụ kim loại độc hại [184].

Nhìn chung các mô khác nhau cho thấy các mối quan hệ có khả năng tích lũy kim loại nặng khác nhau. Hàm lượng lipid, lông nhung trong cá ở các lô thí nghiệm tăng đáng kể so với nhóm đối chứng. Theo các quan sát tế bào học, kết quả cho thấy các tế bào bị tổn thương đều ở các nồng độ, mức độ tổn thương phụ thuộc vào cơ quan. Sự thay đổi đó có thể là do ion chì đã làm thay đổi biểu hiện mRNA hoặc canxi trong cá. Bất kỳ loại thay đổi đặc biệt nào của tế bào có thể cho thấy sự hiện diện của bệnh hoặc ảnh hưởng của các chất độc hại. Vì vậy, nghiên cứu mô bệnh học có tầm quan trọng hàng đầu trong chẩn đoán, căn nguyên và phòng bệnh cho cá.

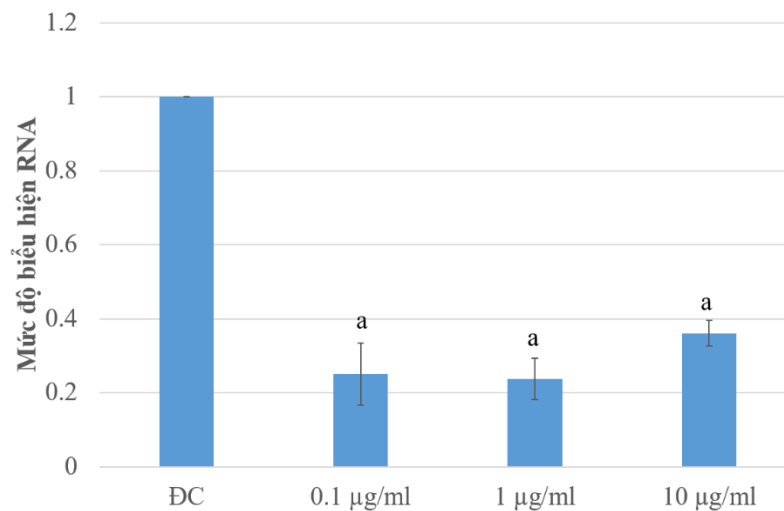
3.5. Xác định sự thay đổi biểu hiện các gen đáp ứng với chì (Pb^{2+}) và các gen kiểm soát tổn thương của cá ngựa vằn

3.5.1. Xác định sự thay đổi biểu hiện gen GADD45A và kiểm soát tổn thương



Hình 3.20: Sự thay đổi mRNA của gen *GADD45A* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm.

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *GADD45A* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy tất cả các nồng độ thí nghiệm đều có sự thay đổi về mức độ biểu hiện gen, nhóm 0,1µg/L và nhóm 1µg/L mức độ biểu hiện gen giảm với nhóm đối chứng, nhóm 0,1µg/L giảm gần 1,6 lần, nhóm 1µg/L giảm 11 lần so với nhóm đối chứng. Nhưng nhóm 10µg/L có sự tăng biểu hiện gen và tăng gấp 1,6 lần so với nhóm 1µg/L. Mức độ biểu hiện gen *GADD45A* giảm ở giai đoạn 24h của 0.1 và 1 giảm so với đối chứng là vì trong giai đoạn đầu để thích nghi khi tiếp xúc với nồng độ chì thấp.



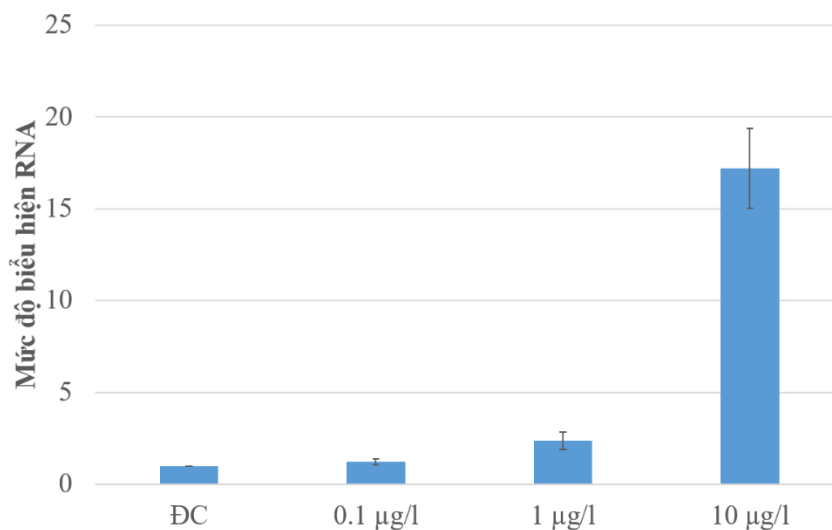
Hình 3.21: Sự thay đổi mRNA của gen *GADD45A* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm.

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *GADD45A* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy tất cả các nhóm thí nghiệm đều có mức độ biểu hiện gen giảm so với nhóm đối chứng, nhóm 0.1µg/L và nhóm 1µg/L mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau và giảm 4 lần so với nhóm đối chứng, nhóm 1µg/L giảm 3 lần so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 10 µg/L có sự tăng biểu hiện gen trở lại so với nhóm 0.1µg/L và nhóm 1µg/L và tăng gấp 1,5 lần.

Kết quả nghiên cứu cho thấy sự thay đổi mRNA của gen *GADD45A* trong giai đoạn 24h và 168h ở lô đối chứng không đổi. Trong giai đoạn 168h, ở nồng độ 0.1µg/L và 10µg/L có mức độ biểu hiện gen giảm lần lượt là 2,7 và 4,3 lần so với giai đoạn 24h.

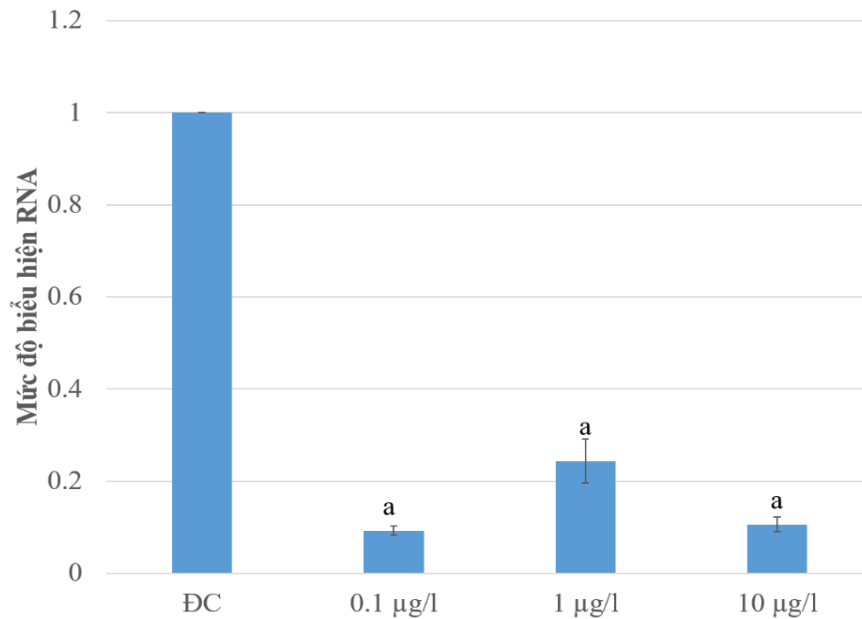
Nguyên nhân gen *GADD45A* là một trong những gen quan trọng liên quan đến quá trình phản ứng của tế bào trước sự tổn thương gen và bổ sung cho quá trình sửa chữa. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng nồng độ chì cao có thể ảnh hưởng tiêu cực đến biểu hiện gen *GADD45A*, gây ra sự giảm đi. Tuy nhiên, ở các nồng độ thấp hơn, sự ảnh hưởng của chì có thể khác nhau và chưa được rõ ràng. Chì có thể ảnh hưởng đến sự tồn tại của các tế bào trong quá trình phát triển và ảnh hưởng đến sự phân hóa và biểu hiện gen. Sự giảm biểu hiện gen *GADD45A* có thể do sự ảnh hưởng của chì đến quá trình điều tiết gen của tế bào, gây ra sự giảm đi của sự phản ứng của tế bào trước sự tổn thương gen và giảm khả năng sửa chữa tổn thương.

3.5.2. Xác định sự thay đổi biểu hiện gen *GADD45G* và kiểm soát tổn thương



Hình 3.22: Sự thay đổi mRNA của gen *GADD45G* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm.

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *GADD45G* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0.1 μ g/L, 1 μ g/L, 10 μ g/L có mức độ biểu hiện gen tăng dần theo nồng độ càng cao dẫn đến mức độ biểu hiện gen thay đổi càng lớn, không thay đổi nhiều so với nhóm đối chứng. Nồng độ 1 μ g/L có sự tăng biểu hiện gen và tăng gấp 2,3 lần so với nhóm đối chứng. Ở nồng độ 10 μ g/L tăng mạnh biểu hiện gen và tăng gấp 17 lần so với các nhóm đối chứng.



Hình 3.23: Sự thay đổi mRNA của gen *GADD45G* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm.

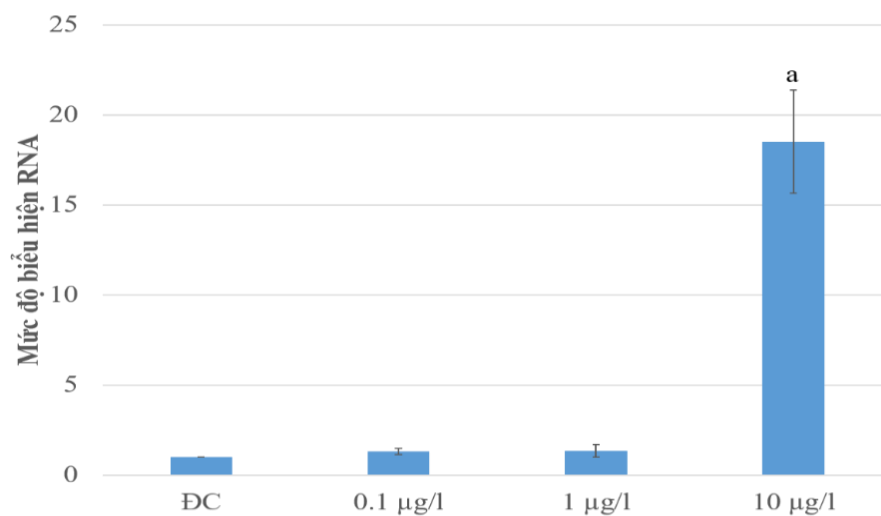
Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *GADD45G* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0.1 μ g/L và nhóm 1 μ g/L mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau và giảm 10 lần so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 1 μ g/L lại có sự tăng biểu hiện gen so với nồng độ 0.1 μ g/L và nhóm 10 μ g/L và tăng gấp 2,4 lần.

Sự thay đổi mRNA của gen *GADD45G* giai đoạn 24h và 168h: mức độ biểu hiện gen ở nồng độ 0,1 μ g/L, 1 μ g/L, 10 μ g/L trong giai đoạn 168h giảm mạnh so với giai đoạn 24h, nồng độ 0,1 μ g/L giảm 12 lần, nồng độ 1 μ g/L giảm 10 lần, nồng độ 1 μ g/L giảm 150 lần. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ và thời gian 168h đủ để làm giảm hiển thị mRNA của gen *GADD45G*, ở giai đoạn 168h có thể nồng độ 0,1 μ g/L, 1 μ g/L, 10 μ g/L đã đạt ngưỡng giới hạn gây độc.

Nguyên nhân: Điều này có nghĩa là lượng mRNA được sản xuất từ gen *GADD45G* tăng theo mức độ chì tăng ở giai đoạn 24h. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện

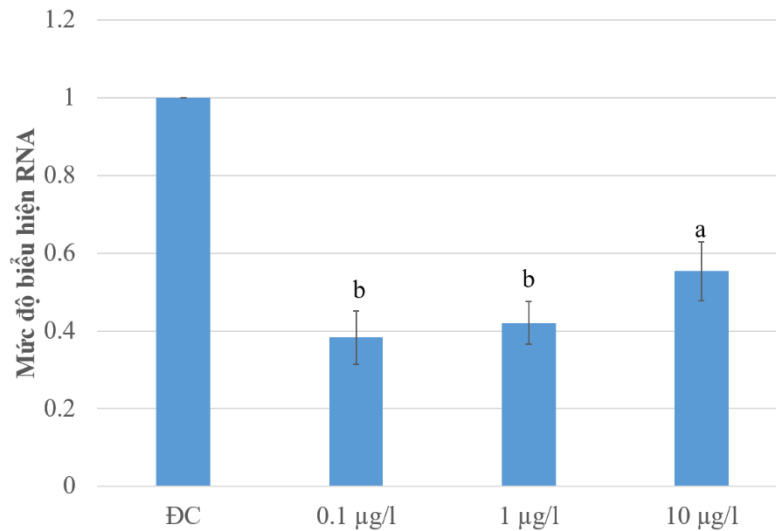
gen của các nhóm này thay đổi nhiều so với nhóm đối chứng, cho thấy rằng các mức độ chì này ảnh hưởng đáng kể đến mức độ biểu hiện gen. Vì vậy, có thể kết luận rằng gen *GADD45G* có phản ứng nhạy với nồng độ chì 0.1µg/L, 1µg/L, 10µg/L trong giai đoạn 24h. Ở giai đoạn 168h các nhóm thí nghiệm với nồng độ chì 0.1µg/L, 1µg/L và 10µg/L đều cho thấy mức độ giảm biểu hiện của gen *GADD45G* gần như tương tự nhau và giảm nhiều hơn so với nhóm đối chứng. Kết quả này cho thấy nồng độ chì càng cao thì mức độ giảm biểu hiện của gen *GADD45G* càng lớn, có thể cho thấy gen này đóng vai trò quan trọng trong phản ứng của tế bào với chì.

3.5.3. Xác định sự thay đổi biểu hiện gen *SOD1* và kiểm soát tổn thương



Hình 3.24: Sự thay đổi mRNA của gen *SOD1* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *SOD1* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0.1µg/L, 1µg/L và 10µg/L mức độ biểu hiện gen tăng so với nhóm đối chứng, nhóm 0.1µg/L, 1µg/L có mức độ biểu hiện gen tăng nhẹ so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 10µg/L lại bắt đầu có sự tăng biểu hiện gen và tăng hơn 14 lần so với các nhóm còn lại. Nguyên nhân có thể là do thời gian và nồng độ 0.1µg/L, 1µg/L chưa đủ làm thay đổi mức độ biểu hiện mRNA. Nồng độ 10µg/L đã bắt đầu có sự thay đổi mạnh so với nhóm đối chứng.



Hình 3.25: Sự thay đổi mRNA của gen *SOD1* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm

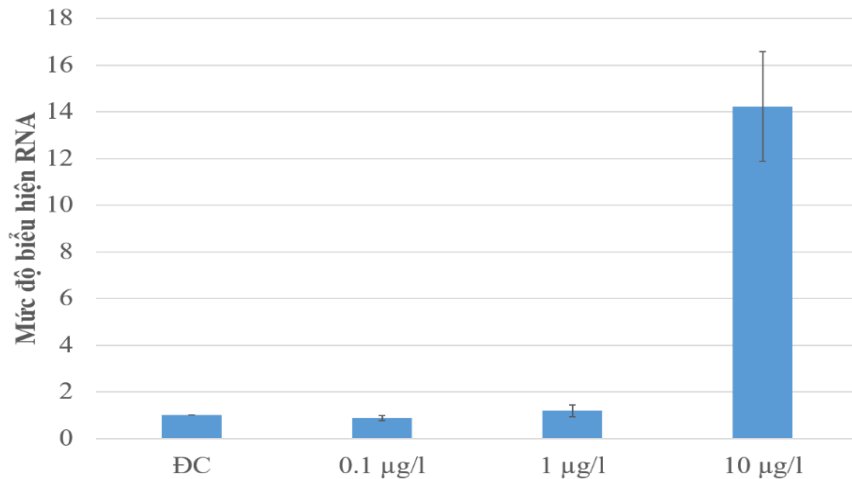
Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *SOD1* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0.1µg/L và 1µg/L mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau và giảm 2,5 lần so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 10µg/L có sự tăng biểu hiện gen so với nhóm 0.1µg/L và nhóm 1µg/L và tăng gấp 1,5 lần. Mức độ biểu hiện ở nhóm đối chứng gấp 2 lần so 10µg/L.

Sự thay đổi mRNA của gen *SOD1* ở giai đoạn 24h và 168h giữa các nhóm thí nghiệm: Ở giai đoạn 168h mức độ biểu hiện gen giảm mạnh so với giai đoạn 24h ở các nồng độ 0.1µg/L, 1µg/L, 10µg/L. Trong giai đoạn 168h, ở nồng độ 10µg/L có sự giảm mạnh nhất, giảm 33,6 lần so với giai đoạn 24h, nguyên nhân có thể thời gian và nồng độ chì đã tác động mạnh lên cấu trúc gen của cá ngựa vằn.

Nguyên nhân sự thay đổi mRNA của gen *SOD1* ở giai đoạn 24h và 168h giữa các nhóm thí nghiệm có thể do các tác động của chất độc học lên quá trình biểu hiện gen. Ở giai đoạn 24h, khi các tế bào được phơi nhiễm với các nồng độ chì khác nhau, mức độ biểu hiện gen *SOD1* có thể tăng tùy thuộc vào nồng độ chì và thời gian phơi nhiễm. Tuy nhiên, ở giai đoạn 168h, mức độ biểu hiện gen *SOD1* giảm mạnh hơn so với giai đoạn 24h ở các nồng độ 0.1µg/L, 1µg/L, 10µg/L. Điều này có thể cho thấy rằng các tế bào đã trải qua một giai đoạn dài của sự tổn thương do chì gây ra, dẫn đến giảm khả năng sản xuất mRNA của gen *SOD1*. Điều đó cho thấy chì có thể gây ra tổn thương trực tiếp đến các tế bào, làm giảm sự sống còn của

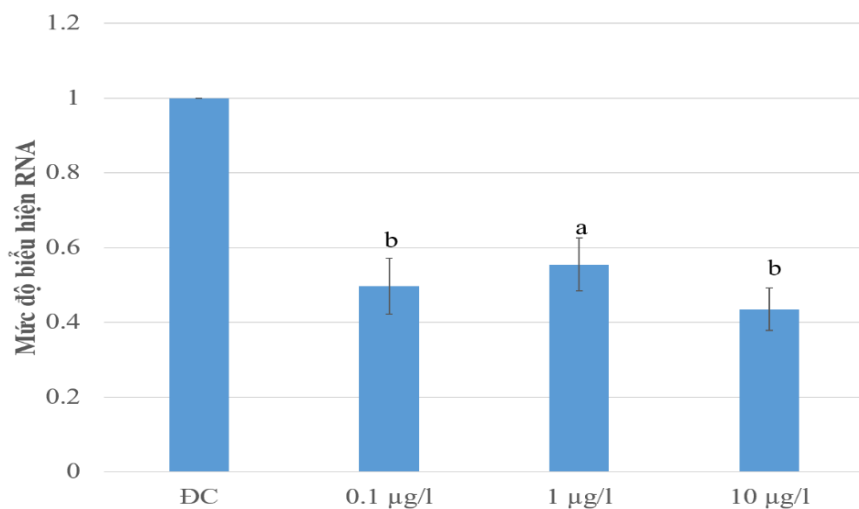
chúng. Do đó, số lượng tế bào có khả năng biểu hiện gen *SOD1* cũng giảm, dẫn đến giảm mức độ sản xuất mRNA của gen này.

3.5.4. Xác định sự thay đổi biểu hiện gen *SOD2* và kiểm soát tổn thương



Hình 3.26: Sự thay đổi mRNA của gen *SOD2* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm.

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *SOD2* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0.1µg/L, 1µg/L có mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau và tương đương so với nhóm đối chứng, nồng độ 0.1µg/L có sự giảm nhẹ so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 10µg/L lại có sự tăng biểu hiện gen và tăng gấp 14 lần so với nhóm đối chứng, nguyên nhân tăng có thể do chất ion chì ở nồng độ 10µg/L đã đủ liều lượng làm thay đổi gen *SOD2* trong giai đoạn 24h.



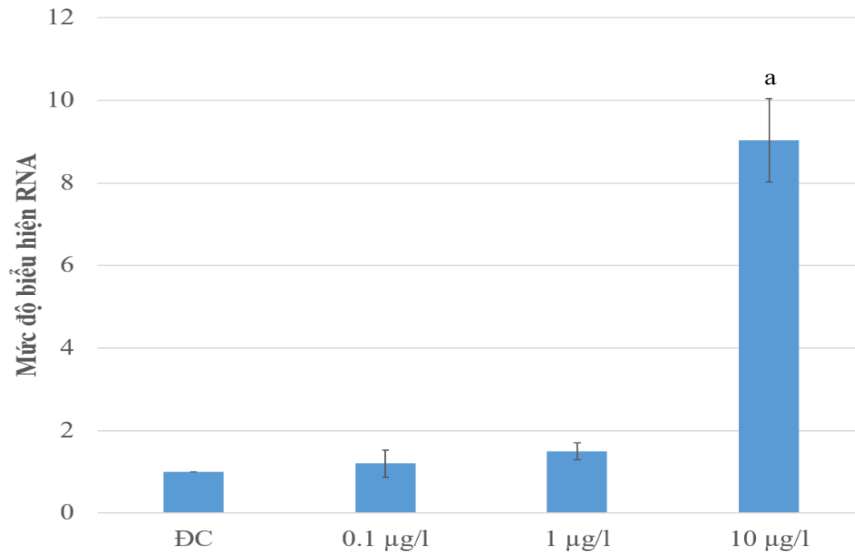
Hình 3.27: Sự thay đổi mRNA của gen *SOD2* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm.

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *SOD2* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0.1 μ g/L, nhóm 1 μ g/L và nhóm 10 μ g/L mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau và giảm khoảng 2,3 lần so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 1 μ g/L có mức biểu hiện gen cao so với nhóm 0,1 μ g/L và 10 μ g/L.

Sự thay đổi mRNA của gen *SOD2* ở 2 giai đoạn 24h và 168h giữa các nhóm thí nghiệm: Lô thí nghiệm đối chứng ở 2 giai đoạn này không có sự thay đổi về mức độ biểu hiện gen *SOD2*. Ở nồng độ 0,1 μ g/L, 1 μ g/L và 10 μ g/L có mức độ biểu hiện gen ở giai đoạn 168h giảm so với giai đoạn 24h, trong đó nồng độ 10 μ g/L giảm cực mạnh, giảm 32,5 lần. Mức độ biểu hiện gen ở giai đoạn 168h khá tương đồng nhau, nguyên nhân có thể nồng độ ion chì và thời gian nhiễm độc đã đủ ngưỡng giới hạn thay đổi mức độ biểu hiện gen *SOD2*.

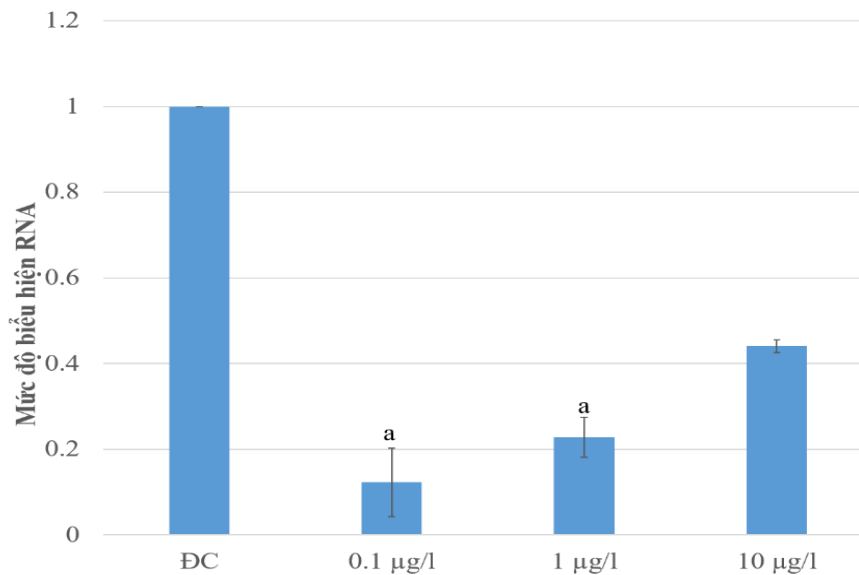
Nguyên nhân sự thay đổi mRNA của gen *SOD2* tại 2 giai đoạn 24h và 168h trong các nhóm thí nghiệm: Lô thí nghiệm đối chứng không có sự thay đổi về mức độ biểu hiện gen *SOD2* ở cả 2 giai đoạn. Nồng độ 0.1 μ g/L, 1 μ g/L và 10 μ g/L ở giai đoạn 24h có mức độ biểu hiện gen *SOD2* tăng mạnh so với nhóm đối chứng điều này có thể là do tế bào muốn sản xuất nhiều hơn enzym Superoxide Dismutase 2 để chống lại các tác động oxy hóa từ chì. Nồng độ 0.1 μ g/L, 1 μ g/L và 10 μ g/L ở giai đoạn 168h có mức độ biểu hiện gen *SOD2* tăng giảm so với nhóm đối chứng. Việc này có thể là do sự thay đổi trong việc điều chỉnh sản xuất protein để đáp ứng với sự tác động của chì. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện gen ở nồng độ 0,1 μ g/L, 1 μ g/L và 10 μ g/L ở giai đoạn 168h không có sự khác biệt lớn, có thể do sự thích nghi của tế bào với tác động của chì trong thời gian dài.

3.5.5. Xác định sự thay đổi biểu hiện gen *MT2* và kiểm soát tổn thương



Hình 3.28: Sự thay đổi mRNA của gen *MT2* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm.

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *MT2* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy các nồng độ ion chì thí nghiệm đều gây ảnh hưởng đến gen *MT2* giai đoạn 24h, nhóm 0.1 µg/L và nhóm 1 µg/L có mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau, không thay đổi nhiều so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 10 µg/L tăng mạnh biểu hiện gen và tăng gấp 9 lần so nhóm đối chứng và 8 lần so với nồng độ 0.1 µg/L, 1µg/L.



Hình 3.29: Sự thay đổi mRNA của gen *MT2* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm.

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *MT2* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0.1 μ g/L và nhóm 1 μ g/L mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau và giảm 5 lần so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 10 μ g/L lại có sự tăng biểu hiện gen so với nhóm 0.1 μ g/L và nhóm 1 μ g/L và tăng gấp 2 lần. Ở nhóm 100 μ g/L mức độ biểu hiện gen tăng mạnh so với các nồng độ 0,1 μ g/L, 1 μ g/L, 10 μ g/L và tăng gấp 6,5 lần so với nhóm 0,1 μ g/L và 1 μ g/L, tăng gấp 3,2 lần so với nhóm 10 μ g/L.

Sự thay đổi mRNA của gen *MT2* giai đoạn 24h và 168h: mức độ biểu hiện gen ở nồng độ 0,1 μ g/L, 1 μ g/L, 10 μ g/L trong giai đoạn 168h giảm mạnh so với giai đoạn 24h, nồng độ 0,1 μ g/L giảm 3,5 lần, nồng độ 1 μ g/L giảm 7 lần, nồng độ 10 μ g/L giảm 220 lần. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ và thời gian 168h đủ để làm giảm hiển thị mRNA của gen *MT2*, ở giai đoạn 168h có thể nồng độ 0,1 μ g/L, 1 μ g/L, 10 μ g/L đã đạt ngưỡng giới hạn gây độc.

Kết quả thí nghiệm cho thấy mức biểu hiện gen của cá ngựa vằn ở cả 4 nồng độ: đối chứng, 0,1 μ g/L, 1 μ g/L, 10 μ g/L được nhiễm kim loại chì trong 24h đều có sự tăng tỷ lệ biểu hiện gen so với biểu hiện gen đối chứng. Và ngược lại, mức biểu hiện gen của cá ngựa vằn ở 4 nồng độ: đối chứng, 0,1 μ g/L, 1 μ g/L, 10 μ g/L được nhiễm kim loại chì trong 168h có sự giảm tỷ lệ biểu hiện gen so với biểu hiện gen đối chứng. Trong thí nghiệm này, kỹ thuật Real time RT-PCR đã đánh giá được sự sai lệch gen trong quá trình hấp thụ chì của cá ngựa vằn. Từ kết quả cho thấy, ấu trùng cá ngựa vằn được nhiễm kim loại chì trong thời gian càng lâu thì mức độ biểu hiện gen càng giảm.

Kết quả thí nghiệm gen *MT2*, có thể suy ra rằng sự tăng hoặc giảm mức độ biểu hiện gen của cá ngựa vằn phụ thuộc vào nồng độ chì và thời gian tiếp xúc với chì. Trong giai đoạn 24h, sự tăng tỷ lệ biểu hiện gen so với đối chứng có thể cho thấy các gen của cá ngựa vằn được kích hoạt để đối phó với chì, có thể thông qua cơ chế bảo vệ tế bào hoặc chuyển hóa chì. Trong giai đoạn 168h, sự giảm tỷ lệ biểu hiện gen so với đối chứng có thể cho thấy các gen của cá ngựa vằn không thể tiếp tục giữ vai trò bảo vệ và đang bị ảnh hưởng bởi tác động tiêu cực của chì, dẫn đến giảm mức độ biểu hiện gen.

CHƯƠNG IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Luận án đánh giá được tác động của chì (Pb^{2+}) lên quá trình phát triển của các giai đoạn cá ngựa bao gồm tỷ lệ % phôi sống, sự thay đổi nhịp tim, xác định hàm lượng chì (Pb^{2+}) trong cơ thể, đánh giá ảnh hưởng của chì (Pb^{2+}) lên mô ruột, buồng trứng, đánh giá sự thay đổi các gen và kiểm soát tổn thương *GADD45A*, *SOD1*, *SOD2*, *GADD45G*, *MT2*.

Chì (Pb^{2+}) làm giảm tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vẫn qua các giai đoạn phát triển theo sự tăng dần giữa các nồng độ khảo sát. Ngoài ra, chì (Pb^{2+}) gây ảnh hưởng đến hoạt động sinh lý của cá: làm giảm tỷ lệ nở của phôi, ức chế quá trình phát triển của phôi và ấu trùng, gây ra dị tật cho cá như: cong cột sống, phù màng tim, phù bụng, phù mắt, làm mất sắc tố của cá; nhịp tim cũng tăng theo sự tăng của từng nồng độ khảo sát.

Sự tồn tại của chì (Pb^{2+}) và tác động của nó đến con người và sinh vật là không thể lường trước. Khả năng hấp thụ bằng hệ thống hô hấp và tiêu hóa đã phân phối các chất độc hại trong tất cả các bộ phận của cơ thể, gây ảnh hưởng đến sức khỏe của con người và sinh vật. Nghiên cứu này đã xác định sự có mặt của kim loại nặng và những tác động tiêu cực trong cơ thể cá ngựa vẫn đã cho thấy mối đe dọa nghiêm trọng đối với sinh vật cũng như sức khỏe con người. Kết quả mà nghiên cứu này thu được sẽ là cơ sở để đóng góp cho những nghiên cứu tiếp theo trong tương lai hướng đến cải thiện môi trường nhằm bảo vệ sức khỏe con người và sinh vật.

Sự phơi nhiễm với chì (Pb^{2+}) làm thay đổi sự biểu hiện mức phiên mã của các gen *GADD45A*, *GADD45G*, *SOD1*, *SOD2*, *MT2*. Real time RT-PCR đã cho thấy được sự sai lệch gen trong quá trình hấp thụ chì (Pb^{2+}) của cá ngựa vẫn ở giai đoạn 24h và 168h.

Hàm lượng chì (Pb^{2+}) tích tụ trong toàn bộ cơ thể cá ngựa vẫn trưởng thành có chiều hướng tăng lên theo nồng độ gây nhiễm. Do đó cho thấy khả năng tích lũy sinh học của vi sinh vật trong sinh vật biển và mối đe dọa nghiêm trọng đối với hệ thủy sinh và sức khỏe con người.

4.2. Kiến nghị

Tiếp tục có những đánh giá sâu hơn ảnh hưởng của chì thông qua biểu hiện của gen liên quan đến sự phát triển của phôi cá.

Tiếp tục có những đánh giá sâu hơn ảnh hưởng của kim loại nặng khác thông qua biểu hiện của gen liên quan đến sự phát triển của phôi cá từ đó làm cơ sở để so sánh mức độ ảnh hưởng giữa các kim loại nặng.

Đánh giá cấu trúc các cơ quan liên quan đến sự chuyển hóa của gan, thận.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

1. Tuan Ngo Van, Thuan Tran Thi , Nga Nguyen Thi, Chi Nguyen Quynh Ho, Tram Le Ngoc Vo, Le Thanh Long, Thao Nguyen Thi Phuong, Effects of lead on structures of zebrafish intestine and oocytes, Ournal of Entomology and Zoology Studies, E - ISSN: 2320 – 7078, JEZS 2021, 9(2): 127 -129.
2. Tuan Van Ngo, Le Thi Lam, Cang Ngoc Ly, Tram Thi Bich Tran, Huy Nghĩa Quang Hoang, Chi Nguyen Quynh Ho, Mai Thi Phuong Nguyen, Thuan Tran Thi , Nga Nguyen Thi, Le Thanh Long, Thao Nguyen Thi Phuong. Effects of lead on the development of zebrafish embryo. European Journal of Molecular & Clinical Medicine, ISSN: 2515 -8260, V8, I3, 2021.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Zon, L. and Peterson, R, "In vivo drug discovery in the zebrafish," *Nat Rev. Drug Discovery*, tập 4, pp. 35 - 44, 2005.
- [2] Duruibe J. O., Ogwuegbu. M. O. C., Egwurugwu J. N, "Heavy metal pollution and human biotoxic effects," *International Journal of Physical Sciences*, tập 2, pp. 112 -118, 2007.
- [3] Ziemacki G., G. Viviano, F. Merli, "Heavy metals: sources and environmental," *Ann. Ist. Super. Sanita presence*, tập 25, pp. 531 - 536, 1989.
- [4] Koch M., W. Rotard, "On the contribution of background sources to the heavy metal content of municipal sewage sludge,," *Water Sci. Technol*, tập 43, pp. 67 - 74, 2001.
- [5] Đặng Văn Can, Đào Ngọc Phong, "Đánh giá tác động của arsen tới môi sinh và sức khoẻ con người ở các vùng mỏ nhiệt dịch có hàm lượng asen cao," *Tập san Địa chất và Khoáng sản*, tập 7, p. 199, 2000.
- [6] Koch M., W. Rotard, "On the contribution of background sources to the heavy metal content of municipal sewage sludge," *Water Sci. Technol*, tập 43, pp. 67-74, 2001.
- [7] Nguyễn Quốc Thắng, "Nghiên cứu quá trình tích lũy - đào thải và ảnh hưởng của các kim loại nặng(As, Cd, Pb) đến hàm lượng cortisol trong cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*)," trong *Học viện khoa học và công nghệ* , Hà Nội, 2018.
- [8] Lê Huy Bá, *Độc học môi trường*, TP. HCM.: NXB Đại học Quốc gia, 2006.
- [9] Arshad Javid, Muhammad Javed, Sajid Abdullah and Zulfiqar Ali, "Bioaccumulation of Lead in the Bodies of Major Carps (*Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhina mrigala*) during 96-h LC50 Exposures," *International Journal of Agriculture & Biology*: vol. 9, pp. 909-912, 2007.
- [10] Mahdi Banaee, Behzad Nematdoust Haghi, Fazel Zoheiri, "LC50 and bioaccumulation of lead nitrate ($Pb(NO_3)_2$) in Goldfish (*Carassius auratus*) ", *International Journal of Aquatic Biology*: vol. 1, pp. 233-239, 2013.
- [11] Ewa Łuszczek-Trojnar, Ewa Drag-Kozak and Włodzimierz Popek,, "Lead accumulation and elimination in tissues of Prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch,., *Environ. Sci.Pollut. Res.*: vol. 20, pp. 3122–3132, 2013.

- [12] Andrea Martini Ribeiro, Wagner Ezequiel Risso, Marisa Narciso Fernandes, Claudia B. R. Martinez,, "Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*," *Fish Physiol Biochem.*: vol. 40, pp. 645-657, 2014.
- [13] Subash Vijayakumar, M. Sasikala, R. Ramesh, LEAD POISONING – AN OVERVIEW, *International Journal of Pharmacology & Toxicology / 2(2)*, 70-82., 2012.
- [14] Patra RC, Rautray AK, Swarup D, "Oxidative Stress in Lead and Cadmium Toxicity and Its Amelioration," *J. Vet. Intern. Med*, tập 2011, 2011.
- [15] Jadhav S.H, Sarkar S.N, Patil R.D, Tripathi H.C, "Effects of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water contaminating metals:A biochemical and histopathological study in male rats," *Arch. Environ. Con. Toxicol*, tập 53, số 4, pp. 667 - 677, 2007.
- [16] J. Yoshinaga, "Lead in the Japanese living environment," *Environ Health Prev Med*, tập 17, pp. 344 - 433, 2012.
- [17] ATSDR, "Toxicological Profile for Lead," Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, ATSDR, (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) Toxicological Profile for Lead. (Draft for Public Comment) Agency for ToAtlanta, GA: United State Department of Health and Human Service, 2007.
- [18] Benoff S, Jacob A, Hurley I.R, "Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium," *Hum Reprod.* , tập 6, số 2, pp. 106 - 121, 2007.
- [19] Batra N, Nehru B, Bansal M.P, "Influence of lead and zinc on rat male reproduction at 'biochemical and histopathological levels'," *Appl. Toxicol*, tập 62, số 6, pp. 507 - 512, 2001.
- [20] Vaziri N.D, Khan M. , "Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide in the pathogenesis of experimental lead-induced hypertension," *Pharmacol. Physiol*, tập 34, số 9, pp. 920 - 925, 2007.
- [21] P. L., "The role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity," *Altern. Med*, tập 11, số 2, p. 114, 2006.
- [22] Kiziler A.R, Aydemir B, Onaran I, Alici B, Ozkara H, Gulyasar T, Akyolcu M.C, " High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile

- subjects.," *Biol. Trace Elem*, tập 120, pp. 82 - 91, 2007.
- [23] Kasperczyk S, Birkner E, Kasperczyk A, Zalejska-Fiolka J, "Activity of superoxide dismutase and catalase in people protractedly exposed to lead compounds," *Ann. Agric. Environ*, tập 11, số 2, pp. 219 - 296, 2004.
- [24] Hsu P.C, Hsu C.C, Guo Y.L, "Hydrogen peroxide induces premature acrosome reaction in rat sperm and reduces their penetration of the Zona pellucida," *Toxicology*, tập 139, pp. 93 - 101, 1999.
- [25] Hsu P.C, Guo Y.L, "Antioxidant nutrients and lead toxicity," *Toxicology*, tập 180, pp. 33 - 44, 2002.
- [26] "Marchlewicz M, Wiszniewska B, Gonet B, Baranowska-Bosiacka I, Safranow K, Kolasa A, Rać M.E," *Increased lipid peroxidation and ascorbic acid utilization in testis and epididymis of rats chronically exposed to lead. Biometals*, tập 20, pp. 13 - 19, 2007.
- [27] Birben E, Sahiner U.M, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O, "Oxidative stress and antioxidant defense," *World Allergy Organ*, tập 5, pp. 9 - 19, 2012.
- [28] Kumar A, Prasad M.N.V, Achary V.M.M, Panda B.B, "Elucidation of lead-induced oxidative stress in *Talinum triangulare* roots by analysis of antioxidant responses and DNA damage at cellular level," *Environ. Sci. Pollut*, tập 20, số 7, pp. 4551 - 4561, 2013.
- [29] Khaki A, Bayatmakoo R, Nouri M, Khaki A.A, "Remedial effect of Cinnamon *zeylanicum* on serum anti-oxidants levels in male diabetic Rat," *Life Sci*, tập 10, pp. 103 - 107, 2013.
- [30] Elgawish R.A.R, Abdelrazek H.M, "Effects of lead acetate on testicular function and caspase-3 expression with respect to the protective effect of cinnamon in albino rats," *Toxicol*, tập 1, pp. 795 - 801, 2014.
- [31] Singh M.K, Dwivedi S, Yadav S.S, Sharma P, Khattri S, "Arsenic-induced hepatic toxicity and its attenuation by fruit extract of *Emblca officinalis* (amla) in mice," *Biochem*, tập 29, pp. 29 - 37, 2014.
- [32] Bailey C, Kitchen I, "Ontogenesis of proenkephalin products in rat striatum and the inhibitory effects of low-level lead exposure," *Dev. Brain Res. J*, tập 22, số 1, pp. 75-79, 1985.
- [33] Markovac J, Goldstein G.W, "Picomolar concentrations of lead stimulate

- brain protein kinase,” *C. Nat. J*, tập 334, số 6177, pp. 71 - 73, 1988.
- [34] Bressler J.P, Goldstein G.W, “Mechanisms of lead neurotoxicity,” *Biochem. Pharmacol. J*, tập 41, số 4, pp. 479 - 484, 1991.
- [35] Boca Raton, “Rice D.C Behavioral impairment produced by developmental lead exposure:Evidence from primate reseach. Human Lead Exposure,” *CRC Press*, pp. 138 - 152, 1992.
- [36] Chowdhury A.R, Dewan A, Gandhi D.N, “Toxic effect of lead on the testes of rat,” *Biomed*, tập 43, pp. 95 - 100, 1983.
- [37] Davidovics Z, DiCicco-Bloom E, “J. Neurosci,” *Moderate lead exposure elicits neurotrophic effects in cerebral cortical precursor cells in culture*, tập 80, số 6, pp. 817 - 825, 2005.
- [38] Vargas H, Castillo C, Posadas F, Escalante B, “ Acute lead exposure induces renal haeme oxygenase-1 and decreases urinary Na excretion,” *Toxicol*, tập 22, số 5, pp. 237 - 244, 2003.
- [39] Qian Y, Harris E.D, Zheng Y, Tiffany-Castiglioni E, “Lead targets GRP78, a molecular chaperone, in C6 rat glioma cells,” *Toxicol. Appl. Pharmacol. J*, tập 163, số 3, pp. 260 - 266, 2000.
- [40] Jomova K, Valko M, “Advances in metal-induced oxidative stress and human disease,” *Toxicology*, tập 283, số 2, pp. 65 - 87, 2011.
- [41] Kasperczyk A, Machnik G, Dobrakowski M, Sypniewski D, Birkner E, Kasperczyk S, “Gene expression and activity of antioxidant enzymes in the blood cells of workers who were occupationally exposed to lead,” *Toxicology*, tập 301, số 1, pp. 79 - 84, 2012.
- [42] Nair A.R, DeGheselle O, Smeets K, Van Kerkhove E, Cuypers A, “Cadmium-induced pathologies:Where is the oxidative balance lost (or not),” *Int. J. Mol. Sci*, tập 14, số 3, pp. 6116 - 6143, 2013.
- [43] E.-T. W.H, “radit. Compl. Med,” *Antioxidant effects of Spirulina supplement against lead acetate-induced hepatic injury in rats*, pp. 1 - 5, 2015.
- [44] Hwang K.Y, Schwartz B.S, Lee B.K, Strickland P.T, Todd A.C, Bressler J.P, “Associations of lead exposure and dose measures with erythrocyte protein kinase C activity in 212 current Korean lead workers,” *Toxicol. Sci*, tập 62, số 2, pp. 280 - 288, 2001.

- [45] Bagchi D, Preuss H.G, “Effects of acute and chronic oval exposure of lead on blood pressure and bone mineral density in rats,” *Biochem*, tập 99, số 5, pp. 1155 - 1164, 2005.
- [46] Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld E.K, Rothenberg S.J, “Lead exposure and cardiovascular disease - A systematic review,” *Environ. Health Perspect. J*, tập 115, số 3, pp. 472 - 472, 2007.
- [47] Kilikdar D, Mukherjee D, Dutta M, Ghosh A.K, Rudra S, Chandra A.M, Bandyopadhyay D, “Protective effect of aqueous garlic extract against lead-induced cardiac injury in rats,” *Cell Tissue Res*, tập 13, số 3, 2013.
- [48] G. L.D, “Lead and compounds, Environmental Toxicants: Human Exposures and Their Health Effects,” *Wiley Hoboken*, tập 3, pp. 757 - 809, 2008.
- [49] Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Rybicka M, Nowacki P, Chlubek D, “Neurotoxicity of lead. Hypothetical molecular mechanisms of synaptic function disorders,” *Neurochir*, tập 46, số 6, pp. 569 - 578, 2012.
- [50] Carmignani M, Volpe A.R, Boscolo P, Qiao N, Di Gioacchino M, Grilli A, Felaco M., “ Catcholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment,” *Life Sci*, tập 68, số 4, pp. 401 - 415, 2000.
- [51] Salim M . Int. J, “Evaluation of performance of date palm pollen on urea and creatinine levels in adult female rats exposed to lead acetate intoxication,” *Biomed*, tập 6, số 1, pp. 20 - 24, 2015.
- [52] Sharma S, Singh B, “Effects of acute and chronic lead exposure on kidney lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in BALB-C mice (Mus musculus) In,” *Sci*, tập 3, pp. 1564 - 1566, 2014.
- [53] Moneim A.E.A, Dkhil M.A, Al-Quraishy S, “The protective effect of flaxseed oil on lead acetate-induced renal toxicity in rats,” *J. Hazard. Mater*, tập 194, pp. 250 - 255, 2011.
- [54] Lakshmi B.V.S, Sudhakar M, Aparna M. , “Protective potential of Black grapes against lead induced oxidative stress in rats,” *Toxicol. Pharmacol*, tập 35, số 3, pp. 361 - 368, 2013.
- [55] Sharma V, Sharma A, Kansal L, “he effect of oral administration of *Allium sativum* extracts on lead nitrate induced toxicity in male mice,” *Food Chem. Toxicol*, tập 48, số 3, pp. 928 - 936, 2010.

- [56] Wang J, Yang Z, Lin L, Zhao Z, Liu Z, Liu X, “Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats,” *Biol*, tập 146, số 3, pp. 354 - 359, 2012.
- [57] Sharma S, Singh B, “Effects of acute and chronic lead exposure on kidney lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in BALB-C mice (*Mus musculus*) In,” *Sci*, tập 3, pp. 1564 - 1566, 2014.
- [58] Aziz F.M, Maulood I.M, Chawsheen M.A.H, “Effects of melatonin, vitamin C and E alone or in combination on lead-induced injury in liver and kidney organs of rats,” *Pharm*, tập 2, pp. 13 - 18, 2012.
- [59] Sujatha K, Srilatha C.H, Anjaneyulu Y, Amaravathi P, “Lead acetate induced nephrotoxicity in wistar albino rats, pathological, immunohistochemical and ultra-structural studies,” *Pharm. Biol. Sci*, tập 2, số 2, pp. 459 - 469, 2011.
- [60] F. J, “Compositions and methods for the pre-vention and treatment of diseases or conditions associated with oxidative stress, inflammation, and metabolic dysregulation,” *Washington, DC: US Patent No.8*, tập 652, số 518, 2014.
- [61] Nisar M.F, Nasir I, Shaheen S, Khalid A, Tazeen N, “Chronic lead acetate nephrotoxicity:A histological study on albino rats,” *Annals*, tập 17, số 3, p. 239, 2014.
- [62] Velaga M.K, Daughtry L.K, Jones A.C, Yallapragada P.R, Rajanna S, Rajanna B, “Attenuation of lead-induced oxidative stress in rat brain, liver, kidney and blood of male wistar rats by *Moringa oleifera* seed powder,” *Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 2014;33(4):323–337*, tập 33, số 4, pp. 323 - 337, 2014.
- [63] Ji J.S, Schwartz J, Sparrow D, Hu H, Weisskopf M.G, “Occup. Environ,” *Occupational determinants of cumulative lead exposure:Analysis of bone lead among men in the VA normative aging study*, tập 56, số 4, p. 435, 2014.
- [64] Weiner I.D, Mitch W.E, Sands J.M, “Urea and ammonia metabolism and the control of renal nitrogen excretion,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*, tập 10, số 8, pp. 1444 - 1458, 2015.
- [65] Oyagbemi A.A, Omobowale T.O, Akinrinde A.S, Saba A.B, Ogunpolu B.S, Daramola O, “Lack of reversal of oxidative damage in renal tissues of lead acetate-treated rats,” *Environ. Toxicol*, tập 30, số 11, pp. 1235 - 1243, 2015.
- [66] Conterato G.M, Bulcão R.P, Sobieski R, Moro A.M, Charão M.F, Freitas F.A, Batista B.L, “Blood thioredoxin reductase activity, oxidative stress and

- hematological parameters in painters and battery workers: Relationship with lead and cadmium levels in blood,” *Appl. Toxicol.*, tập 33, số 2, pp. 142 - 150, 2013.
- [67] Salińska A, Włostowski T, Zambrzycka E, “Effect of dietary cadmium and/or lead on histopathological changes in the kidneys and liver of bank voles *Myodes glareolus* kept in different group densities,” *Ecotoxicology*, tập 21, số 8, pp. 2235 - 2243, 2012.
- [68] Yuan G, Dai S, Yin Z, Lu H, Jia R, Xu J, Chen Z, “Sub-chronic lead and cadmium co-induce apoptosis protein expression in liver and kidney of rats,” *Pathol*, tập 7, pp. 2905 - 2914, 2014.
- [69] Omobowale T.O, Oyagbemi A.A, Akinrinde A.S, Saba A.B, Daramola O.T, Ogunpolu B.S, Olopade J.O, “Failure of recovery from lead induced hepatotoxicity and disruption of erythrocyte antioxidant defence system in wistar rats,” *Environ. Toxicol. Pharm*, tập 37, số 3, 2014.
- [70] Abdou H.M, Hassan M.A, “Protective role of omega-3 polyunsaturated fatty acid against lead acetate-induced toxicity in liver and kidney of female rats,” *BioMed.*, tập 2014, p. 435857, 2014.
- [71] Mohammadi M, Ghaznavi R, Keyhanmanesh R, Sadeghipour H.R, Naderi R, Mohammadi H, “Caloric restriction prevents lead-induced oxidative stress and inflammation in rat liver,” *Sci. World J*, tập 24, 2014.
- [72] Liu C.M, Ma J.Q, Sun Y.Z, “Puerarin protects the rat liver against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead,” *Toxicol. Pathol*, tập 64, pp. 575 - 582, 2012.
- [73] Mujaibel L.M, Kilarkaje N, “Mitogen-activated protein kinase signaling and its association with oxidative stress and apoptosis in lead-exposed hepatocytes,” *Environ. Toxicol.*, tập 30, số 5, pp. 513 - 529, 2015.
- [74] Kilikdar D, Mukherjee D, Mitra E, Ghosh A.K, Basu A, Chandra A.M, Bandyopadhyay D, “Protective effect of aqueous garlic extract against lead-induced hepatic injury in rats,” *Biol*, tập 49, p. 498, 2011.
- [75] Allouche L, Hamadouche M, Touabti A, Khennouf S, “Effect of long-term exposure to low or moderate lead concentrations on growth, lipid profile and liver function in albino rats,” *Biol*, tập 5, pp. 339 - 347, 2011.
- [76] Bharali M.R, J. Glob, “Effect of acute lead acetate exposure on liver of

- mice,” *Biosci*, tập 2, pp. 121 - 125, 2013.
- [77] B. J.A, “Review of medical toxicolog,” *Clin Toxicol*, tập 44, p. 355, 2006.
- [78] Flora S.J.S, Flora G, Saxena G., “Environmental occurrence, health effects and management of lead poisoning. Lead Chemistry, Analytical Aspects, Environmental Impacts and Health Effects,” *Netherlands: Elsevier Publication*, pp. 158 -228, 2006.
- [79] N. H, “Lead poisoning. Annu,” *Rev*, tập 55, pp. 209 - 222, 2004.
- [80] Cleveland L.M, Minter M.L, Cobb K.A, Scott A.A, German V.F, “Lead hazards for pregnant women and children. Part 1:Immigrants and the poor shoulder most of the burden of lead exposure in this country. Part. 1 of a two-part article details how exposure happens, whom it affects, and the harm it can do,” *AJN Am. J. Nurs*, tập 10, pp. 40 - 49, 2008.
- [81] Sanders T, Liu Y, Buchner V, Tchounwou P.B, “Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure:A review,” *Rev. Environ. Health*, tập 24, pp. 15 - 46, 2009.
- [82] Mustafa H.N, Hussein A.M, “ Does allicin combined with vitamin B-complex have superior potentials than α -tocopherol alone in ameliorating lead acetate-induced Purkinje cell alterations in rats? An immunohistochemical and ultrastructural study,” *Folia Morphol*, tập 75, pp. 1 - 17, 2015.
- [83] Feeser V.R, Loria R.M, “Modulation of traumatic brain injury using progesterone and the role of glial cells on its neuroprotective actions,” *Neuroimmunol*, tập 237, pp. 4 - 12, 2011.
- [84] Mtui E, Gruener G, FitzGerald M.J.T, “Clinical Neuroanatomy and Neuroscience,” *Elsevier Health Sciences*, 2011.
- [85] Vij A.G, Dhundasi S.A, “Hemopoietic, hemostatic and mutagenic effects of lead and possible prevention by zinc and Vitamin C,” *Med. Sci*, tập 2, pp. 27 - 36, 2009.
- [86] “Piomelli S. Childhood lead poisoning,” *Pediatr Clin N Am* 49, pp. 1285 - 1304, 2002.
- [87] Ahamed M, Verma S, Kumar A, Siddiqui M.K.J, “Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children,” *Sci Total Environ*, tập 346, pp. 48-55, 2005.

- [88] Jangid A.P, John P.J, Yadav D, Mishra S, Sharma P, “Impact of chronic lead exposure on selected biological markers,” *Biochem*, tập 27, pp. 83 - 89, 2012.
- [89] Corradi M, Goldoni M, Sabbadini M, “Acute lead poisoning:A singular case of hemolytic anemia and lead colic,” *Med Lav*, tập 102, pp. 243 - 249, 2011.
- [90] Ibrahim N.M, Eweis E.A, El-Beltagi H.S, Abdel-Mobdy Y.E, “Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat,” *Asian Pac J Trop Biomed*, tập 2, pp. 41 - 46, 2012.
- [91] Jassim H.M, Hassan A.A, “Changes in some blood parameters in lactating female rats and their pups exposed to lead:Effects of vitamins C and E,” *IJVS*, tập 25, pp. 1- 7, 2011.
- [92] R. R, “Exposure on tap:Drinking water as an overlooked source of lead,” *Environ Health Perspect*, Các tập %1 của %268 - 72, p. 118, 201.
- [93] Al Naimi R.A, Abdulhadi D, Zahroon O.S, Al-Taae E.H. . Al-Anbar J, “Toxicopathological Study of lead acetate poisoning in growing rats and the protective effect of crystien or calicium,” *Vet Sci*, tập 4, pp. 26 - 39, 2011.
- [94] Elgawish R.A.R, Abdelrazek H.M, “Effects of lead acetate on testicular function and caspase-3 expression with respect to the protective effect of cinnamon in albino rats,” *Toxicol*, tập 1, pp. 795 - 801, 2014.
- [95] Telisman S, Cvitkovic P, Jurasovic J, Pizent A, Gavella M, Rocic B, “Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men,” *Health Perspect Environ*, tập 1, số 45, p. 108, 2000.
- [96] F. S.J., “Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility,” *Free Radic Biol*, tập 51, pp. 257 - 281, 2011.
- [97] Saleh H.A, El-Aziz G.A, El-Fark M.M, El-Gohary M, “ Effect of maternal lead exposure on craniofacial ossification in rat fetuses and the role of antioxidant therapy,” *Anat Histol Embryol*, tập 38, số 5, pp. 392 - 399, 2009.
- [98] Foster W.G, McMahon A, YoungLai E.V, Hughes E.G, Rice D.C, “Reproductive endocrine effects of chronic lead exposure in the male cynomolgus monkey,” *Reprod Toxicol*, tập 7, số 3, pp. 203 - 209, 1993.
- [99] El-Mehi A.E, Amin S.A, “Effect of lead acetate on the thyroid gland of adult male albino rats and the possible protective role of zinc supplementation:A biochemical, histological and morphometric study,” *Am Sci*, tập 8, số 7, pp.

61 - 71, 2012.

- [100] Anjum M.R, Reddy P.S, "Supplementation of testosterone restores the suppressed fertility in male rats exposed to lead during perinatal period," *IOSR J Pharm*, tập 2, số 6, pp. 49 - 53, 2012.
- [101] Anjum M.R, Sainath S.B, Suneetha Y, Reddy P.S, "Lead acetate induced reproductive and paternal mediated developmental toxicity in rats," *Ecotoxicol Environ Saf*, tập 74, số 4, pp. 793 - 799, 2011.
- [102] Al-Sa'ady M.S.M, Kamil H.Z, Jasim S.H, "Effect of lead acetate in some physiological genetic parameters in white male rat *rattus rattus*," *Karbala Univ*, tập 3, số 9, pp. 295 - 301, 2011.
- [103] Hammed M.S, Arrak J.K, Al-Khafaji N.J, Hassan A.A, "Effect of date palm pollen suspension on ovarian function and fertility in adult female rats exposed to lead acetate," *Diyala J Med*, tập 3, số 1, pp. 90 - 96, 2012.
- [104] F. S.J.S, "Nutritional components modify metal absorption, toxic response and chelation therapy," *Nutr Environ*, tập 12, số 1, pp. 53 - 67, 2002.
- [105] Mates J.M, "Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology," *Toxicology*, tập 153, pp. 83 - 104, 2000.
- [106] Hultberg B, Andersson A, Isaksson A, "Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: Potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol," *Toxicology*, tập 156, pp. 93 - 100, 2001.
- [107] Ahamed M, Siddiqui M.K.J, "Environmental lead toxicity and nutritional factors," *Clin Nutr*, tập 26, số 4, pp. 400 - 408, 2007.
- [108] Ahamed M, Siddiqui M.K.J, "Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions," *Clin Chim Acta*, tập 383, số 1, pp. 57 - 64, 2007.
- [109] Flora S.J, Saxena G, Mehta A, "Reversal of lead-induced neuronal apoptosis by chelation treatment in rats: Role of reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺," *Pharmacol Exp Ther*, tập 322, pp. 108 - 116, 2007.
- [110] Lidsky T.I, Schneider J.S, "Lead neurotoxicity in children: Basic mechanisms and clinical correlates," *Brain*, tập 126, pp. 5 - 19, 2003.
- [111] Garza A, Vega R, Soto E, "Cellular mechanisms of lead neurotoxicity," *Med Sci Monit*, tập 12, số 3, pp. RA57 - RA65, 2006.

- [112] Bressler J, Kim K.A, Chakraborti T, Goldstein G, “Molecular mechanisms of lead neurotoxicity,” *Neurochem*, tập 24, số 4, pp. 595 - 600, 1999.
- [113] Riggio M, Filosa S, Parisi E, Scudeiro R. Changes in zinc , “copper and metallothionein contents during oocyte growth and early development of the teleost *Danio rerio* (zebrafish),” *Comp Biochem Physiol Part C*, tập 6, pp. 135 - 191, 2003.
- [114] Xue song Zhao, Shu tao, Wang ,Yuan Wu,Hong Youa, Lina Lv, “Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish,” *Aquatic Toxicology*, Các tập %1 của %2136 -137 , pp. 49 - 59, 2013.
- [115] Kienle C, Köhler H, Gerhardt A, Behavioral and developmental toxicity of chlorpyrifos and nickel chloride to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae., *Ecotoxicol Environ Safety*,1740–1747., 2009.
- [116] Anandhan R, Hemalatha S, Kavitha V, Bhuyan G, Effect of aluminium on development of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*;, 4 (4): 2541 - ???, 2013.
- [117] Govind P, Madhuri S, Heavy metals cause toxicity in animals and fish. *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences*;, 2(2) :17-23, 2014.
- [118] Ansari S, Ansari BA, Effects of Heavy Metals on the Embryo and Larvae of Zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae). *An International Publisher for Academic and Scientific Resources*., , 129-141, 2015.
- [119] Zheng JL, Yuan SS, Wu CW, Li WY, Chronic waterborne zinc and cadmium exposures induced different responses towards oxidative stress in the liver of zebrafish., *Original Research Article*, 22-32., 2016.
- [120] Nguyễn Thị Thu Giang và cộng sự, “Đánh giá tác động của cadmium (cd) lên quá trình phát triển của phôi cá ngựa vằn - *Danio rerio* (Hamilton, 1822),” *Đại học Sư phạm Thành Phố Hồ Chí Minh*, pp. 213 - 131, 2012.
- [121] Nguyễn Thị Thương Huyền, Trần Anh Huy, Nguyễn Thị Thu Giang, Trần Thị Phương Dung, Khảo sát khả năng tích tụ Cadmium trên cá ngựa vằn, *Tạp chí khoa học số 51 ĐHSP. TP Hồ Chí Minh*, trang 90-99, 2013.
- [122] Trần Thị Phương Dung và cộng sự, “Đánh giá sự tác động của chì lên quá trình phát triển phôi cá Ngựa vằn - *Danio rerio* (Hamilton, 1822),” *Tạp chí*

khoa học trường đại học sư phạm TPHCM, tập 61, pp. 122 - 131, 2014.

- [123] Nguyễn Thị Thương Huyền, Đoàn Lê Minh Hiền, “Đánh giá ảnh hưởng của kẽm lên sự sống cá ngựa vằn giai đoạn ấu trùng (1 - 7 ngày tuổi),” *Tạp chí khoa học Đại học sư phạm TP.HCM*, tập 6, số 84, pp. 103 - 116, 2016.
- [124] Nguyễn Thị Thương Huyền, Trần Thị Trúc Đào, Hoàng Nghĩa Sơn, “Đánh giá sự ảnh hưởng arsen lên sự phát triển phôi cá ngựa vằn (*Danio rerio*),” *Tạp chí sinh học*, tập 40, số 1, pp. 51 - 61, 2018.
- [125] Kang J, Nachtrab G, & Poss KD, “Crosstalk Dkk1 lumps from creature ornaments interfered with fin regeneration of injured male zebrafish,” *Growing Cells*, tập 27, pp. 19 - 31, 2013.
- [126] Jayasinghe C D, Jayawardena U A, “Toxicity Assessment of Herbal Medicine Using Zebrafish Embryos: A Systematic Review,” *Based Complement*, 2019.
- [127] Ioanna Katsiadaki, Tim Ellis, Linda Andersen, “Dying for change: A roadmap to refine the fish acute toxicity test after 40 years of applying a lethal endpoint,” *Ecotoxicology and Environment safety*, tập 223, 2021.
- [128] Thomas Braunbeck, Melanie Böttcher, Henner Hollert, Thomas Kosmehl, Eva Lammer, Erik Leist, Mark Rudolf and Nadja Seitz, “Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species,” *Pub Med*, tập 22, số 2, pp. 87 - 102, 2005.
- [129] W Lilienblum, W Dekant, H Foth, T Gebel, J G Hengstler, R Kahl, P-J Kramer, H Schweinfurth, K-M Wollin, “Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH),” *Pub Med*, tập 82, số 4, p. 208, 2008.
- [130] Amir Modarresi Chahardehi et al, “Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants,” *Plants (Basel)*, tập 9, số 10, p. 1345, 2020.
- [131] Howe K., Clark M., Torroja C., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Collins J.E., Humphray S., McLaren K., Matthews L., et al., The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, ;496:498–503. doi: 10.1038/nature12111, 2013.
- [132] Andrei Avanesov, Jarema Malicki, “Analysis of the Retina in the Zebrafish

- Model,” *Methods Cell Biol*, tập 100, pp. 153 - 204, 2010.
- [133] Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., & Voelker, D, “The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing,” *Environmental Science and Pollution Research*, tập 15, số 5, pp. 394 - 404, 2008.
- [134] Dương Thùy Linh, Hoàng Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Lai Thành, “Đánh giá tác động của Acetaminophen lên sự phát triển phôi cá ngựa vằn (*Danio rerio*),” *Đại học Quốc gia Hà Nội*, tập 32, số 1, pp. 60 - 66, 2016.
- [135] V. A. Tuấn, “Đánh giá độc tính của Sodium Benzoate, Propyl Gallate, Tartrazine, Amaranth, Monosodium Glutamate và Formaldehyde trên mô hình phát triển phôi cá ngựa vằn,” trong *Đại học Quốc gia Hà Nội*, 2015.
- [136] J. M. McKim, “Evaluation of Tests with Early Life Stages of Fish for Predicting Long-Term Toxicity,” *ournal of the Fisheries Research Board of Canada*, tập 34, pp. 1148 - 1154, 1977.
- [137] EU, “DIRECTIVE 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes,” *Environment*, 10 2010.
- [138] Charles b. Kimmel, Uilliam W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie Ullmann, Thomas F. Schilling, “Stages of Embryonic Development of the Zebrafish,” *Developmental Dynamics*, tập 203, số DEVELOPMENTAL DYNAMICS, pp. 253 - 310 , 1995.
- [139] Berger, J, Currie, P. D, “Zebrafish models flex their muscles to shed light on muscular dystrophies,” *Disease Models & Mechanisms*, tập 5, pp. 726 - 732, 2012.
- [140] Zhang, C., Frazier, J. M., Chen, H., Liu, Y., Lee, J.-A., & Cole, G. J, “Molecular and morphological changes in zebrafish following transient ethanol exposure during defined developmental stages,” *Neurotoxicology and Teratology*, tập 40, pp. 70 - 80, 2014.
- [141] Lammer E, Carr, G, “Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?,” *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, tập 149, pp. 196 - 209, 2009.
- [142] Rottbauer, W., Baker, K., Wo, Z. G., Mohideen, M.-A. P. K., Cantiello, H. F., & Fishman, M. C, “Growth and Function of the Embryonic Heart Depend upon the Cardiac-Specific L-Type Calcium Channel $\alpha 1$ Subunit,”

Developmental Cell, tập 1, pp. 265 - 275, 2001.

- [143] McKee, R. A., & Wingert, R. A, “Zebrafish Renal Pathology: Emerging Models of Acute Kidney Injury,” *Current Pathobiology Reports*, tập 3, pp. 171 - 181, 2015.
- [144] Perez-Pinera, P., Ousterout, D. G., & Gersbach, C. A, *Current Opinion in Chemical Biology*, tập 16, pp. 268 - 277, 2012.
- [145] W.Y. Hwang, Y. Fu, D. Reyon, M.L. Maeder, S.Q. Tsai, J.D. Sander, R.T. Peterson, J.R.J. Yeh, J.K. Joung, Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system, *Nat. Biotechnol.*, 31 (2013), pp. 227-229, 2013.
- [146] A. L. Rubinstein, “Zebrafish assays for drug toxicity screening,” *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, tập 2, pp. 231 - 240, 2006.
- [147] Pitchai, A., Rajaretnam, R. K., & Freeman, J. L, “Zebrafish as an Emerging Model for Bioassay-Guided Natural Product Drug Discovery for Neurological Disorders,” *Medicines*, tập 6, p. 61, 2019.
- [148] Andrew Kataba et al, “Acute exposure to environmentally relevant Pb levels induces oxidative stress and neurobehavioral alterations in larval zebrafish (*Danio rerio*),” *Aquat Toxicol*, tập 227, số 105627, pp. 1-35, 2020.
- [149] Kiyun Park et al, “Effects of thermal stress-induced lead (Pb) toxicity on apoptotic cell death, inflammatory response, oxidative defense, and DNA methylation in zebrafish (*Danio rerio*) embryos Effects of thermal stress-induced lead (Pb) toxicity on apoptotic cell death, inf,” *Aquat Toxicol*, tập 224, số 105479, pp. 1 - 9, 2020.
- [150] Vittoria Curcio et al, “Nghiên cứu sự thay đổi về hình thái và phân tử do chì gây ra trong phôi và ấu trùng của *Danio rerio*,” *Applied Sciences*, tập 11, số 7464, pp. 1 - 16, 2021.
- [151] A. Schafer, “Gadd45 proteins: key players of repair-mediated DNA demethylation,” *National Library of Medicine*, tập 793, pp. 35 - 50, 2013.
- [152] Walmsley, R. M, Tate, M, “The GADD45a-GFP GreenScreen HC Assay,” *Genetic Toxicology*, pp. 231 - 250, 2011.
- [153] “Analysis of the Mammalian gudd45 Gene and Its Response,” *Biol Chem*, tập 268, số Hollander MC, Alamo I, Jackman J, Wang MG, McBride OW, p. 24385 24393, 1993.

- [154] Sánchez R, Pantoja-Uceda D, Prieto J, Diercks T, Marcaida MJ, Montoya G, Campos-Olivas R, Blanco FJ, “Solution structure of human growth arrest and DNA damage 45alpha (Gadd45alpha) and its interactions with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Aurora A kinase,” *Biol. Chem*, tập 285, pp. 22196 - 22201, 2010.
- [155] Kentaro Ishida, Yohei Yuge, Masato Yasukawa,, “Gadd45g regulates dental epithelial cell proliferation through p38 MAPK-mediated p21 expression,” *Genes Cells*, tập 18, số 8, pp. 660 - 671, 2013.
- [156] J M Shefner, A G Reaume, D G Flood, “Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy,” *National Library of Medicine*, tập 53, số 6, pp. 1239 -1246, 1999.
- [157] Jing Wang, Hong Cao, “Zebrafish and Medaka: Important Animal Models for Human Neurodegenerative Diseases,” *Mol Sci*, tập 22, p. 10766, 2021.
- [158] Tennore Ramesh, Alison N. Lyon, Ricardo H. Pineda, Arthur H. M. Burghes, Christine E. Beattie, “A genetic model of amyotrophic lateral sclerosis in zebrafish displays phenotypic hallmarks of motoneuron disease,” *Disease Models & Mechanisms*, tập 3, số . (2010). . , 3(9), 2010.
- [159] Xiaohui Liu, Liang Zhang, Pan Wang, “Sirt3-dependent deacetylation of SOD2 plays a protective role against oxidative stress in oocytes from diabetic mice,” *Cell cycle*, tập 16, số 13, pp. 1302 - 1308, 2017.
- [160] Sudha Sharma, Susmita Bhattarai, “SOD2 deficiency in cardiomyocytes defines defective mitochondrial bioenergetics as a cause of lethal dilated cardiomyopathy,” *Elsevier*, tập 37, p. 101740, 2020.
- [161] James M. Rice, Adam Zweifach, Michael A. Lynes , “Metallothionein regulates intracellular zinc signaling during CD4+ T cell activation,” *Springer*, tập 13, 2016.
- [162] Xi Liu, Jun Quan, Zhaolong Shen, “Metallothionein 2A (MT2A) controls cell proliferation and liver metastasis by controlling the MST1/LATS2/YAP1 signaling pathway in colorectal cancer,” *Cancer Cell International*, tập 205, p. 1367, 2022.
- [163] Samuel N Louma, Philip S Rainbow, “Why Is Metal Bioaccumulation So Variable? Biodynamics as a Unifying Concept,” *Critical Review*, tập 39, pp. 1921 - 1931, 2005.

- [164] Đặng Công Thuận, “Nghiên cứu các đặc điểm chẩn đoán hình ảnh, giải phẫu bệnh và tình trạng thụ thể nội tiết bệnh ung thư vú tại bệnh viện trường đại học y dược Huế,” *Tạp chí phụ sản*, tập 10, số 3, pp. 250 - 257, 2012.
- [165] N. Vargesson, “Researchgate,” *Zebrafish in 'Manual of Animal Technology*, tập 12, 2007.
- [166] Magda Dubinska-Magiera, Małgorzata Daczewska, Anna Lewicka, Marta Migocka-Patrzałek, Joanna Niedbalska-Tarnowska and Krzysztof Jagla, Zebrafish: A Model for the Study of Toxicants Affecting Muscle Development and Function, ; 17(11): 1941.doi: 10.3390/ijms17111941, 2016.
- [167] Rubio R, Tineo P, Torreblanca A, Del Ramo J, Diaz Mayans J, Histological and electron microscopical observations on the effects of lead on gills and midgut gland of *Procambarus clarkii*, *Toxicol Environ Chem* 31: 347-352, 1991.
- [168] Dave G, Xiu R, Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch Environ Contam, Toxicol* 21: 126-134., 1991.
- [169] Malgorzata Witeska, Barbara Jezierska, Jerzy Chaber, The influence of cadmium on common carp embryos and larvae, Poland: Department of Animal Physiology, WSRP, Ul. Prusa 12, 08110 Siedlce, Poland, *Aquaculture* 129 (1995) 129-132, 1995.
- [170] Shabnam Ansari, Badre Alam Ansari, Effects of Heavy Metals on the Embryo and Larvae of Zebrafish, *Danio rerio*, ©Scholars Academic and Scientific Publisher: Sch. Acad. J. Biosci., 2015; 3(1B):52-56, 2015.
- [171] Trần Thị Phương Dung, Trần La Giang, Khảo sát sự tác động của ion đồng (Cu^{2+}) lên các hoạt động sinh lí trong giai đoạn phôi cá ngựa vằn *DANIO RERIO HAMILTON*, 1822, *Tạp chí Khoa học*, Trường đại học Sư Phạm TP HCM, tập 15, số 9: 136-143, 2018.
- [172] Barbara Jezierska, Katarzyna Ługowska, Małgorzata Witeska, The effect of temperature and heavy metals on heart rate changes in common carp *Cyprinus carpio* L. and grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Val.) during embryonic development, *Archives of Polish Fisheries*, Vol. 10, Fasc. 2, 153-165, 2002.
- [173] Witeska, Barbara Jezierska and Małgorzata, The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters, Prusa 12, 08-110 Siedlce, Poland, 2006.

- [174] Cretì P, Trinchella F, Scudiero R, Heavy metal bioaccumulation and metallothionein content in tissues of the sea bream *Sparus aurata* from three different fish farming systems. *Environ. Monit. Assess.*, 165: 321-329., 2010.
- [175] Castro-González MI, Méndez-Armenta M, Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 26: 263-271., 2008.
- [176] Bộ Y Tế, QCVN 8-2:2011/BYT, Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với giới hạn ô nhiễm kim loại nặng trong thực phẩm, 2011.
- [177] Tulasi, S.J., P.J. Reddy and J.V.R. Rao, Accumulation of lead and effects on total lipids and lipid derivatives in the freshwater fish *Anabus testudineus*(Bloch), *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 23: 33-38, 1992.
- [178] SINGH, A. K., AND SINGH, T. P, Seasonal fluctuation in lipid and cholesterol content of ovary, liver and blood serum in relation to annual sexual cycle in *Heteropneustes fossilis* (Bloch)., *Endokrinology* 73(1), 47-54., 1979.
- [179] Jinling Cao, Guodong Wang, Tianyu Wang, Jianjie Chen, Guo Wenjing, Panhong Wu, Xinjin He, Lingtian Xie, Copper caused reproductive endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*), *Aquatic Toxicology* 211, DOI: 10.1016/j.aquatox.2019.04.003, 2019.
- [180] Mukesh Mehta Ambani, Effects of reproductive biology on heavy metal pollution on the histopathological structure of gonads in India, Department of Zoology, Acharya N. G. Ranga Agricultural University, Hyderabad, India., 2015.
- [181] M. B. B. C. R. Chhaya Bhatnagar, FLUORIDE-INDUCED HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN GILL, KIDNEY, AND INTESTINE OF FRESH WATER TELEOST, *LABEO ROHITA*, *Fluoride* 40(1)55–61, 2007.
- [182] Hossam Abdelhamed, Iman Ibrahim, Wes Baumgartner, Mark L. Lawrence, Attila Karsi, Characterization of Histopathological and Ultrastructural Changes in Channel Catfish Experimentally Infected with Virulent *Aeromonas hydrophila*, *Microbiol*, 2017.
- [183] El-Sayed Mohamed Younis, Abdel-Wahab Abdel-Moez Abdel-Warith, Nasser Abdulla Al-Asgah, Hossam Ebaid, Mohamed Mubarak, Histological Changes in the Liver and Intestine of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*,

- Exposed to Sublethal Concentrations of Cadmium, *Pakistan J. Zool.*, vol. 45(3), pp. 833-841, 2013.
- [184] Hanna, MI, SB Iman và NS Elias, A contribution on chromium and lead toxicity in cultured *Oreochromis niloticus.*, *Egyptian J. aquat. Biol. Fish.*, 9:177-209. , 2005.
- [185] Kanungo J., Cuevas E., Ali S.F., Paule M.G, Zebrafish model in drug safety assessment. *Neurotoxicol. Teratol.*, ;33:5416–5429. doi: 10.2174/1381612820666140205145658., 2014.
- [186] Lê Thị Hoa, Nghiên cứu khả năng lắng đọng và vận chuyển của chì (Pb) trong môi trường nước, Trường đại học khoa học tự nhiên., 2006.
- [187] Hou JL, Zhuang P, Zhang LZ, Feng L, Zhang T, Liu JY, et al, Morphological deformities and recovery, accumulation and elimination of lead in body tissues of Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, early life stages: a laboratory study. *J Appl Ichthyol* 27: 514-519., 2011.
- [188] Sarnowski P, Jezierska B, The effect of lead exposure on grass carp spermatozoa and developing embryos., In: Lovejoy D.A. (Ed.) *Heavy metals in the environment: an integrated approach*, Vilnius, Lithuania, pp 304–308, 1999.
- [189] Jennifer C, Samson, Jonathan Shenker, The teratogenic effects of methylmercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio*, USA: Department of Biological Sciences, Florida Institute of Technology, 150 West University Blvd., Melbourne, FL 32901, 2000.
- [190] M.N.R. ROSLI, S.B. SAMAT, M.S. YASIR & M.F.M. YUSOF, Analysis of Heavy Metal Accumulation in Fish at Terengganu Coastal Area, Malaysia, *Sains Malaysiana* 47(6): 1277–1283, 2018.
- [191] Cohen AR, Trotzky MS, Margret S, “Reassessment of microcytic Anemia of Lead Poisoning,” *Pediatrics*, tập 67, pp. 904 - 906, 1981.
- [192] Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld E.K, Rothenberg S.J, “Lead exposure and cardiovascular disease - A systematic review,” *Environ. Health Perspec*, tập 115, số 3, pp. 472 - 482, 2007.
- [193] Landis, W. G. and Ming-Ho Y, *Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems*, Florida: Lewis Publishers Boca Raton, 2003.

- [194] M. L.R, “ Minerals in Animal and Human Nutrition,” *Amsterdam: Elsevier Science*, tập 2nd ed, pp. 361 - 364, 2003.
- [195] Queensland Governmetn, “Ecosystem health indicators,” *Department of Environment*, 6 2012.
- [196] Vũ Hoàng Phương, Nguyễn Ngọc Tú, Mạc Thị Lê, “Nghiên cứu khả năng hấp phụ ion chì trong dung dịch nước của vật liệu chế tạo từ đất sét, tro trấu,” *Đại học Sao Đỏ*, tập 73, số 2, pp. 96 - 102, 2021.
- [197] Ondrej Zitka, Slvie Skalickova, “Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients,” *Oncology Letters*, tập 4, số 6, pp. 1247 - 1253, 2012.
- [198] Mohammed Abdulrazzaq Assi, Mohd Noor Mohd Hezmee, “The detrimental effects of lead on human and animal health,” *Veterinary World*, tập 9, số 6, pp. 660 - 671, 2016.
- [199] Ab Latif Wani, Anjum Ara, Jawed Ahmad Usmani, “Lead toxicity: a review,” *toxicology*, tập 8, số 2, pp. 55 - 64, 2015.
- [200] Merrill JC et al, “Principles and Methods of Toxicology,” *CRC Press*, tập 5, 2007.
- [201] Karri SK et al, “Lead Encephalopathy Due to Traditional Medicines,” *Curr Drug Saf*, tập 3, pp. 54 - 59, 2008.
- [202] Barbosa F et al, “A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs,” *Environ Health Perspect*, tập 113, pp. 1669 - 1674, 2005.
- [203] Dart RC et al, “Lead. In: Dart RC, editor,” *Medical Toxicology*, tập 3, 2004.
- [204] White LD et al, “New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead,” *Toxicol App Pharmacol*, tập 225, pp. 1 - 27, 2007.
- [205] N. H, “Lead poisoning,” *Annu Rev Med.*, tập 55, pp. 209 - 222, 2004.
- [206] K. MJ, “Lead. In: Olson K.R, editor,” *Poisoning and Drug Overdose*, tập 5, 2006.
- [207] CDC, “Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention,” 2012.

- [208] Casaret LJ et al, "Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons," *Toxic effects of metals.*, p. 7, 2007.
- [209] Brunton LL et al, Goodman and Gillmans Manual of Pharmacology and Therapeutics. Mcgraw Hill Professional, Chỉ huy. Trong: Rudolph CD, biên tập viên. Khoa nhi của Rudolph. tái bản lần thứ 21. McGraw Hill chuyên nghiệp; 2003, 2003.
- [210] Xu J et al, "Effects of lead exposure on hippocampal metabotropic glutamate receptor subtype 3 and 7 in developmental rats," *J Negat Results Biomed*, tập 5, p. 8, 2009.
- [211] B. DC, " Very low lead exposures and children's neurodevelopment," *Curr Opin Pediatr*, tập 20, pp. 172 - 177, 2008.
- [212] Brunton LL et al, Goodman and Gillmans Manual of Pharmacology and Therapeutics, 2007.
- [213] Jacobs DE et al, "The prevalence of lead based paint hazards in U.S. housing," *Environ Health Perspect*, tập 110, pp. 599 - 606, 2002.
- [214] Mycyk M et al, Paediatric Toxicology: Diagnostic and management of the Poisoned Child., Mcgraw Hill Professional, 2005.
- [215] Dart RC et al, Medical Toxicology, Lippincot Williams and Wilkins, 2004.
- [216] Nevin, "Understanding international crime trends: the legacy of early childhood lead exposure," *Environment Res*, tập 104, pp. 315 - 336, 2007.
- [217] Park SK et al, "Air pollution and heart rate variability: Modification effects due to chronic lead exposure," *Epidemiology*, tập 19, pp. 111 - 120, 2008.
- [218] Lammer E et al, "Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test," *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*, tập 149, số 2, pp. 196 - 209, 2009.
- [219] C Bailey, I Kitchen, "Ontogenesis of proenkephalin products in rat striatum and the inhibitory effects of low-level lead exposure," *Dve Brain Res*, tập 2, pp. 75 - 79, 1985.
- [220] P. T. Minh, Sinh lý học, Đại học Y Hà Nội, 2011.

PHỤ LỤC

1. Phụ lục 1: Định danh cá ngựa vằn

Cộng Hòa Xã Hội Chủ Nghĩa Việt Nam
Độc lập – Tự do – Hạnh Phúc

TP. Hồ Chí Minh, ngày 04 tháng 01 năm 2018

PHIẾU ĐỊNH DANH



Tên Việt Nam: Cá ngựa vằn

Tên Khoa học:

Danio rerio (Hamilton, 1822)

Giống: *Danio*

Họ: Danionidae

Bộ: Cypriniformes

Lớp: Actinopteri

Đặc điểm nhận dạng: Cá có 5 sọc màu xanh đen chạy dọc theo thân từ phía sau đầu đến cuối tia vây đuôi. Trên vây hậu môn có sọc rõ rệt, có 10-12 tia vây. Số đốt sống thân giao động từ 31-32 đốt. Cá không có đường bên. Kích thước tối đa của cá khoảng 4 cm.

NGƯỜI ĐỊNH DANH

NGUYỄN XUÂN ĐÔNG

XÁC NHẬN CỦA TRƯỞNG PHÒNG

NGÔ XUÂN QUẢNG

XÁC NHẬN CỦA CƠ QUAN
PHÓ VIỆN TRƯỞNG



Nguyễn Văn Cứ

2. Phụ lục 2:

Bảng 1: Tỷ lệ (%) phôi sống qua các giai đoạn phát triển ở các nồng độ (Pb^{2+}) khảo sát.

Các giai đoạn của phôi	Tỷ lệ (%) phôi sống ở các nồng độ Pb^{2+} gây nhiễm					
	ĐC	0,1 $\mu\text{g/l}$	1 $\mu\text{g/l}$	10 $\mu\text{g/l}$	20 $\mu\text{g/l}$	100 $\mu\text{g/l}$
Hình thành 26 đốt sống (22h)	98,33±0,83	95,83±0,83	96,67±1,67	92,50±1,44	93,33±0,83	94,17±0,83
Thoát nang (48h)	95,83±0,83	94,17±0,83	92,50±0,00	90,83±0,83	91,67±0,83	88,33±1,67
Giai đoạn hậu hống (72h)	95,83±0,83	90,83±0,83	91,67±0,83	82,50±0,00	74,17±0,83	52,50±1,44
Tiêu noãn hoàng (168h)	90,83±0,83	77,50±1,44	70,00±2,50	6,67±0,83	5,83±0,83	4,17±0,83

3. Phụ lục 3:

Bảng 2: sự thay đổi cấu trúc mô ruột và buồng trứng sau khi gây nhiễm chì (Pb^{2+})

Các cơ quan	Sự thay đổi mô ruột và buồng trứng ở các nồng độ Pb^{2+} khi gây nhiễm				
	ĐC	0,1 $\mu\text{g/l}$	1 $\mu\text{g/l}$	10 $\mu\text{g/l}$	100 $\mu\text{g/l}$
Ruột	0.0136±0.001	0.0261±0.004	0.0159±0.000	0.028±0.005	0.0298±0.002
Buồng trứng	0,6167±0.0821	0,4594±0.0261	0,344±0.0351	0,3194±0.046	0,2863±0.0235

4. Phụ lục 4:

Bảng 3: Xác định được hàm lượng chì (Pb^{2+}) tích tụ trong một số cơ quan cá ngựa vằn

Các cơ quan	Mức độ tích tụ chì (Pb^{2+}) nội quan, cơ và xương của cá ngựa vằn ở các nồng độ gây nhiễm				
	ĐC	0,1 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$
Nội quan	0,00 \pm 0,00	0,38 \pm 0,01	0,49 \pm 0,01	1,30 \pm 0,06	12,31 \pm 0,30
Cơ và xương	0,00 \pm 0,00	0,27 \pm 0,01	0,27 \pm 0,00	0,71 \pm 0,01	1,22 \pm 0,04

5. Phụ lục 5

Bảng 4: Mức độ biểu hiện gen giai đoạn 24h của cá ngựa vằn ở các nồng độ gây nhiễm chì (Pb^{2+})

Gen	Mức độ biểu hiện gen giai đoạn 24h của cá ngựa vằn ở các nồng độ gây nhiễm chì (Pb^{2+})			
	ĐC	0.1 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$
<i>GADD45A</i>	1,00	0,62 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01	1,97 \pm 0,05
<i>GADD45G</i>	1,00	1,23 \pm 0,1	2,38 \pm 0,4	17,21 \pm 2,1
<i>SOD1</i>	1,00	1,34 \pm 0,2	1,36 \pm 0,3	18,52 \pm 2,8
<i>SOD2</i>	1,00	0,88 \pm 0,1	1,19 \pm 0,2	14,23 \pm 2,3
<i>MT2</i>	1,00	1,20 \pm 0,3	1,50 \pm 0,2	9,04 \pm 1,1

6. Phụ lục 6

Bảng 5: Mức độ biểu hiện gen giai đoạn 168h của cá ngựa vằn ở các nồng độ gây nhiễm chì (Pb^{2+})

Gen	Mức độ biểu hiện gen giai đoạn 168h của cá ngựa vằn ở các nồng độ gây nhiễm chì (Pb^{2+})			
	ĐC	0.1 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$
<i>GADD45A</i>	1,00	0,25 \pm 0,08	0,24 \pm 0,05	0,36 \pm 0,03
<i>GADD45G</i>	1,00	0,09 \pm 0,009	0,24 \pm 0,04	0,11 \pm 0,01
<i>SOD1</i>	1,00	0,38 \pm 0,06	0,42 \pm 0,05	0,55 \pm 0,07
<i>SOD2</i>	1,00	0,50 \pm 0,07	0,56 \pm 0,07	0,43 \pm 0,05
<i>MT2</i>	1,00	0,12 \pm 0,08	0,23 \pm 0,04	0,44 \pm 0,01