

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

----- oOo -----



ĐẶNG ĐĂNG KHOA

**“ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA CROM (VI) LÊN SỰ
PHÁT TRIỂN CỦA CÁ NGỰA VẮN (*Danio rerio*)”**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Tp. Hồ Chí Minh – Năm 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

----- oOo -----

ĐẠNG ĐĂNG KHOA

“ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA CROM (VI) LÊN SỰ
PHÁT TRIỂN CỦA CÁ NGỰA VẪN (*Danio rerio*)”

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số : 9420201

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

Tp. Hồ Chí Minh – Năm 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi, Đặng Đăng Khoa xin cam đoan, luận án Tiến sỹ “Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá ngựa vằn (*Danio rerio*)” là công trình nghiên cứu của tôi cùng với sự hướng dẫn khoa học của PGS.TS Nguyễn Thị Phương Thảo và TS. Lê Thành Long.

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 và tham chiếu đầy đủ.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 14 tháng 3 năm 2024

Tác giả luận án



Đặng Đăng Khoa

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin trình bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc đến PGS.TS Nguyễn Thị Phương Thảo và TS. Lê Thành Long, 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.

Xin gửi lời cảm ơn trân trọng đến GS.TS Cao Việt Hiếu, Hiệu trưởng Trường Đại học Bình Dương đã hỗ trợ thời gian cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Xin gửi lời cảm ơn trân trọng đến 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 học tập, nghiên cứu và hoàn thiện luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến TS. Hồ Nguyễn Quỳnh Chi, ThS. Văn Đức Huy, ThS. Lý Ngọc Cang cùng anh, chị, em tại Phòng Công nghệ Sinh học động vật – Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giúp đỡ và tạo điều kiện để tôi hoàn thiện luận án.

Cuối cùng, tôi xin được cảm ơn cha mẹ, anh chị em, cùng vợ tôi; những người đã đi cùng tôi trong suốt thời gian qua. Tôi muốn gửi lời cảm ơn chân thành nhất của tôi đến cha mẹ tôi vì những lời động viên của họ suốt thời gian tôi làm luận án. Tôi chân thành cảm ơn đến vợ tôi, ThS Nguyễn Thị Yến Liễu, người mà luôn luôn bên cạnh tôi, ủng hộ và động viên tôi trong suốt thời gian nghiên cứu luận án.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 14 tháng 3 năm 2024

Tác giả luận án



Đặng Đăng Khoa

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 |
| DANH MỤC BẢNG..... | x |
| TÓM TẮT | xi |
| ABSTRACT | xii |
| MỞ ĐẦU..... | 1 |
| 1. Tính cấp thiết của đề tài | 1 |
| 2. Mục tiêu của đề tài | 2 |
| 3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu..... | 3 |
| 4. Nội dung nghiên cứu | 3 |
| 5. Những đóng góp mới của luận án | 3 |
| CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU..... | 4 |
| 1.1. Tổng quan về Crom (VI)..... | 4 |
| 1.1.1. Nguồn gốc của kim loại nặng | 4 |
| 1.1.2. Tổng quan về Crom..... | 5 |
| 1.2. Tổng quan về cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)..... | 8 |
| 1.3. Các nghiên cứu về ảnh hưởng của kim loại nặng lên cá ngựa vằn | 14 |
| 1.4. Các gene liên quan đến quá trình apoptosis và kháng oxy hóa | 22 |
| CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | 28 |
| 2.1. Vật liệu | 28 |
| 2.1.1. Cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)..... | 28 |
| 2.1.2. Thiết bị và dụng cụ cần thiết | 28 |
| 2.1.3. Môi trường và hóa chất sử dụng | 29 |
| 2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu | 30 |
| 2.2.1. Định danh cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)..... | 31 |
| 2.2.1.1. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.1.2. Phương pháp sinh học phân tử..... | 31 |
| 2.2.2. Phương pháp nuôi, phối và thu phôi cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)..... | 35 |
| 2.2.2.1. Chuẩn bị môi trường nuôi phôi 1x E3 | 35 |
| 2.2.2.2. Phối cá..... | 35 |
| 2.2.2.3. Thu phôi | 35 |
| 2.2.3. Môi trường Crom (VI) | 36 |
| 2.2.4. Đánh giá sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)..... | 36 |
| 2.2.4.1. Xác định sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>) | 36 |
| 2.2.4.2. Xác định sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên nhịp tim của ấu trùng cá ngựa vằn | 36 |
| 2.2.4.3. Xác định sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn | 37 |
| 2.2.5. Đánh giá sự thay đổi biểu hiện các gene đáp ứng và các gene kiểm soát tổn thương của cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>) khi tiếp xúc với Crom (VI) | 37 |
| 2.2.6. Đánh giá hàm lượng Crom (VI) tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>) | 42 |
| 2.2.7. Đánh giá sự ảnh hưởng Crom (VI) lên cấu trúc nội quan (ruột, gan và buồng trứng) cá ngựa vằn..... | 44 |
| 2.2.8. Phương pháp thống kê..... | 46 |
| CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN..... | 47 |
| 3.1. Định danh cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>) | 47 |
| 3.1.1. Định danh cá ngựa vằn bằng đặc điểm hình thái học | 47 |
| 3.1.2. Định danh cá ngựa vằn bằng phương pháp sinh học phân tử | 51 |
| 3.1.2.1. Phân tích trình tự gene cytochrome b của cá ngựa vằn..... | 51 |
| 3.1.2.2. Phân tích trình tự gene cytochrome c của cá ngựa vằn..... | 53 |
| 3.2. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>) | 55 |
| 3.2.1. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)..... | 55 |

| | |
|---|----|
| 3.2.2. Ảnh hưởng của Crom (VI) đến chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>) | 59 |
| 3.2.3. Ảnh hưởng của Crom (VI) đến nhịp tim ấu trùng cá ngựa vằn | 62 |
| 3.3. Crom (VI) ảnh hưởng đến sự thay đổi biểu hiện các gene đáp ứng và các gene kiểm soát tổn thương lên sự phát triển của cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>) | 64 |
| 3.3.1. Gene <i>gadd45a</i> và <i>gadd45g</i> | 64 |
| 3.3.2. Gene <i>sod1</i> và <i>sod2</i> | 66 |
| 3.3.3. Gene <i>mt2</i> | 68 |
| 3.3.4. Biểu hiện phiên mã của các gene liên quan đến chu kỳ tế bào, ức chế oxy hóa và quá trình apoptosis | 70 |
| 3.3.5. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự biểu hiện một số gene liên quan đến apoptosis và kháng oxy hóa trên cá ngựa vằn | 71 |
| 3.4. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá ngựa vằn trưởng thành..... | 74 |
| 3.4.1. Sự tích tụ Crom (VI) trong cơ thể cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)..... | 74 |
| 3.4.2. Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên cấu trúc mô cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>) | 75 |
| KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ..... | 80 |
| Kết luận | 80 |
| Kiến nghị | 81 |
| CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ | 82 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO..... | 83 |

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

| Từ viết tắt | Tiếng Anh | Tiếng Việt |
|---------------------------------|---|--|
| BCL2 | B-cell leukemia/lymphoma 2 protein | Protein B-cell leukemia/lymphoma 2. |
| BYT | Ministry of Health | Bộ y tế |
| CDKs | Cyclin-dependent kinases | Kinase Phụ thuộc vào Cycline |
| Crom (III) | Chromium (III) Ion | Crom hóa trị ba |
| Crom (VI) | Hexavalent chromium | Crom hóa trị sáu |
| Ct valuae | Cycle threshold value | Giá trị chu kỳ ngưỡng |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid | DNA chứa thông tin di truyền |
| ĐC | Control | Đối chứng |
| EC ₅₀ | Effective concentration 50% | Nồng độ hiệu quả 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 |
| ECL | Enhanced chemiluminescence | Tăng cường phát quang hóa học |
| FSH | Follicle-Stimulating Hormone | Hormone kích thích nang |
| GPx | Peroxidase | Nhóm kháng thể kháng enzyme peroxidase |
| GSH | Glutathione | hợp chất hóa học tự nhiên chứa các axit amin |
| GSI | Gonadosomatic index | Chỉ số gonadosomatic |
| GI | Digestive system | Hệ thống tiêu hóa |
| Hb | Hemoglobin | Huyết sắc tố |
| HSI | Hepatosomatic index | Hệ số gan |
| IgG | Immunoglobulin G | Globulin G |
| LC ₅₀ | Median lethal concentration 50 | Nồng độ gây tử vong 50% |
| LDS | Lithium dodecyl sulfate | Một chất tẩy rửa anion |
| Na ⁺ /K ⁺ | Ion Natri/ ion Kali | Ion Natri/ 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 |
| PCR | Polymerase chain reaction | Phản ứng nhân bản DNA dựa trên các chu kỳ nhiệt |

| | | |
|----------|---|---|
| PVDF | Polyvinylidene fluoride | Màng PVDF |
| QCVN | Vietnam National Technical Regulation | Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia Việt Nam |
| ROS | Reactive oxygen species | Các chất oxy hóa phản ứng |
| RTase | Reverse transcriptase | Một nhóm prôtêin có khả năng xúc tác quá trình phiên mã ngược |
| RT-PCR | Reverse transcription polymerase chain reaction | Phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase sao chép ngược |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis | Điện di polyacrylamide với SDS gel |
| SOD1 | Superoxide dismutase 1 | Enzyme SOD loại 1 |
| SOD2 | Superoxide dismutase 2 | Enzyme SOD loại 2 |
| SODs | Superoxide dismutase genes | Các enzyme SOD |
| US EPA | United States Environmental Protection Agency | Cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ |
| WBCs | White blood cell count | Chỉ số kiểm tra bạch cầu trong máu |
| WHO | World Health Organization | Tổ chức y tế Thế Giới |

DANH MỤC CÁC HÌNH, ĐỒ THỊ

| | |
|--|----|
| Hình 1.1. Sự thay đổi hình dạng phôi giai đoạn blastula tại các mốc thời gian [21]. | 11 |
| Hình 1.2. Sự thay đổi hình dạng quá trình hình thành các cơ quan và thoát nang [21] | 12 |
| Hình 2.1. Sơ đồ tóm tắt quá trình phối và thu phôi cá ngựa vằn | 30 |
| Hình 2.2. Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu phôi và ấu trùng cá ngựa vằn..... | 30 |
| Hình 2.3. Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu cá ngựa vằn trưởng thành | 31 |
| Hình 3.1. Hình mô tả hình dáng cá ngựa vằn đực và cái | 47 |
| Hình 3.2. Phôi cá ngựa vằn | 49 |
| Hình 3.3. Hình các cơ quan ấu trùng cá ngựa vằn | 50 |
| Hình 3.4. Trình tự gene cytochrome b của mẫu cá ngựa vằn trong nghiên cứu | 51 |
| Hình 3.5. Sơ đồ cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự gene cytochrome b của cá ngựa vằn phân lập được với một số loài thuộc bộ Cypriniformes công bố trên ngân hàng GenBank. | 52 |
| Hình 3.6. Trình tự gen cytochrome c của mẫu cá ngựa vằn trong nghiên cứu | 53 |
| Hình 3.7. Sơ đồ cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự gene cytochrome c của cá ngựa vằn phân lập được với một số loài thuộc bộ Cypriniformes công bố trên ngân hàng GenBank. | 54 |
| Hình 3.8. Phôi cá ngựa vằn | 56 |
| Hình 3.9. Ấu trùng phát triển bất thường khi nhiễm Crom (VI)..... | 57 |
| Hình 3.10. Thể hiện tỷ lệ % phôi sống ở các nồng độ Crom (VI). | 57 |
| Hình 3.11. Chiều dài ấu trùng cá ngựa vằn ở ngày thứ 3 của các nhóm thí nghiệm (độ phóng đại 40x và thước đo 100 μ m)..... | 60 |
| Hình 3.12. Chiều dài ấu trùng cá ngựa vằn ở ngày thứ 7 của các nhóm thí nghiệm (độ phóng đại 40x và thước đo 100 μ m)..... | 60 |
| Hình 3.13. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn. .. | 61 |
| Hình 3.14. Biểu đồ thể hiện nhịp tim của ấu trùng cá ngựa vằn tại các nồng độ Crom (VI) ở các ngày..... | 62 |
| Hình 3.15. Mức độ biểu hiện mRNA của gene gadd45a và gadd45g theo etef..... | 64 |
| Hình 3.16. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự biểu hiện phiên mã của gen sod1 | 66 |

| | |
|--|----|
| Hình 3.17. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự biểu hiện phiên mã của gen mt2 trên phôi cá ngựa vằn | 68 |
| Hình 3.18. Sự biểu hiện phiên mã các gene liên quan đến chu trình tế bào (cdk4 và cdk6), kháng oxy hóa (sod1 và sod2) và apoptosis (caspase 3, bcl2, bax)..... | 70 |
| Hình 3.19. Sự biểu hiện của các protein liên quan đến quá trình apoptosis theo Gapdh ở ngày thứ 1 và ngày thứ 3. A: ngày thứ 1; B: ngày thứ 3. | 71 |
| Hình 3.20. Hàm lượng Crom (VI) tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn trưởng thành ... | 74 |
| Hình 3.21. Hình cắt lớp mô ruột cá ngựa vằn sau khi tiếp xúc với nồng độ Crom (VI), độ phóng đại 200, thước đo 100 μ m. | 76 |
| Hình 3.22. Hình cắt lớp mô buồng trứng cá ngựa vằn khi tiếp xúc với nồng độ Crom (VI), độ phóng đại 200, thước đo 100 μ m. | 77 |
| Hình 3.23. Hình cắt lớp mô gan cá ngựa vằn khi tiếp xúc với crom (VI) độ phóng đại 100, thước đo 100 μ m. | 77 |

DANH MỤC BẢNG

| | |
|---|----|
| Bảng 2.1. Một số thiết bị chính sử dụng trong đề tài..... | 28 |
| Bảng 2.2. Một số dụng cụ chính sử dụng trong đề tài | 29 |
| Bảng 2.3. Hóa chất sử dụng trong đề tài | 29 |
| Bảng 2.4. Thông tin các cặp môi được sử dụng trong nghiên cứu | 32 |
| Bảng 2.5. Chu trình nhiệt..... | 32 |
| Bảng 2.6. Các loài Cypriniformes trên ngân hàng GenBank..... | 33 |
| Bảng 2.7. Chu trình nhiệt của phản ứng RT-PCR cho các gene..... | 39 |
| Bảng 2.8. Trình tự môi các gene | 39 |

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, cá ngựa vằn được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá ngựa vằn (*Danio rerio*). Phôi cá ngựa vằn (*Danio rerio*) sau một giờ thụ tinh được xử lý bằng dung dịch chứa Crom (VI) ở các nồng độ khác nhau, bao gồm 0,1 µg/L; 1 µg/L; 3,125 µg/L; 6,25 µg/L; 12,5 µg/L; 25 µg/L; 50 µg/L; 100 µg/L và môi trường 1xE3 làm đối chứng. Sự tác động của Crom (VI) lên sự phát triển của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn được đánh giá bằng cách xác định tỷ lệ sống, nhịp tim và đo chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn giảm có liên quan đến các nồng độ Crom (VI). Việc tiếp xúc với nồng độ Crom (VI) cao hơn dẫn đến giảm chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn. Ngoài ra, nhịp tim tăng rõ rệt đã được quan sát thấy khi tiếp xúc với Crom (VI), đặc biệt là ở nồng độ cao.

Phương pháp Real time RT-PCR và Western blot đã được sử dụng để đánh giá sự tăng hoặc giảm biểu hiện của các gene liên quan đến apoptosis và kháng oxy hóa. Kết quả phân tích Real time RT-PCR cho thấy sự giảm biểu hiện của các gene liên quan đến chu trình tế bào (*cdk4* và *cdk6*) và các gene liên quan đến chất kháng oxy hóa (*sod1* và *sod2*) đã được điều hòa quá mức trong phôi và ấu trùng cá ngựa vằn khi tiếp xúc với Crom (VI). Kết quả phân tích Western blot cho thấy sự tăng biểu hiện của Caspase 3 và Bax, trong khi sự biểu hiện của Bcl2 giảm. Những kết quả này chỉ ra rằng Crom (VI) gây ra những thay đổi trong quá trình phát triển của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn bằng cách thay đổi sự biểu hiện các gene liên quan đến quá trình apoptosis và kháng oxy hóa.

ABSTRACT

In this study, the zebrafish model to assess the impact of hexavalent chromium on the development of zebrafish (*Danio rerio*). The zebrafish embryos (*Danio rerio*), one hour post-fertilization, were treated with solutions containing hexavalent chromium at different concentrations 0.1 µg/L, 1 µg/L, 3.125 µg/L, 6.25 µg/L, 12.5 µg/L, 25 µg/L, 50 µg/L, 100 µg/L, and a 1xE3 medium as a control. The influence of hexavalent chromium on the development of zebrafish embryos and larvae was assessed by determining survival rates, heart rate, and measuring the body length of zebrafish larvae. The results demonstrated a concentration-dependent decrease in the survival rates of zebrafish embryos and larvae exposed to hexavalent chromium. Exposure to higher hexavalent chromium concentrations resulted in a reduction in the body length of zebrafish larvae. Additionally, a significant increase in heart rate was observed upon exposure to hexavalent chromium, especially at higher concentrations.

The Real-time RT-PCR and Western blot methods were employed to assess the changes in the expression of genes associated with the apoptosis and antioxidative processes. The real-time RT-PCR analysis showed that the transcript expressions for cell-cycle-related genes (*cdk4* and *cdk6*) and antioxidant-related genes (*sod1* and *sod2*) were downregulated in the zebrafish embryos treated with hexavalent chromium. Western blot analysis revealed the upregulation of Caspase 3 and Bax, while a downregulation was observed in Bcl2. These results indicated that hexavalent chromium induced changes in zebrafish embryo development by altering apoptosis- and antioxidant-related genes.

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Ô nhiễm kim loại nặng trong môi trường nước luôn là vấn đề nan giải và đang được báo động trên toàn thế giới. Môi trường nước bị ô nhiễm bởi các kim loại nặng thải ra từ nước thải sinh hoạt, quá trình sản xuất công nghiệp, hoạt động nông nghiệp và khai thác mỏ thường chưa được xử lý hoặc xử lý không hiệu quả. Trong số các kim loại nặng, Crom là kim loại được sử dụng nhiều trong các hoạt động sản xuất công nghiệp. Trong tự nhiên, Crom có thể được tìm thấy dưới dạng khoáng chất, tùy thuộc vào hóa trị và liều lượng nó có thể là tác nhân gây ung thư hoặc cũng như một vi chất dinh dưỡng quan trọng [1]. Cơ quan Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ liệt kê Crom là một trong tám chất gây ô nhiễm kim loại nặng phổ biến nhất vì nó được coi là nguyên tố có hại [2]. Crom (III) và Crom (VI) là hai trạng thái hóa trị chính của Crom trong đó Crom (III) ít độc hơn nhiều so với Crom (VI) [3]. Động vật thủy sinh tiếp xúc với Crom (VI) trong thời gian ngắn hoặc thời gian dài sẽ giảm khả năng sinh sản, dị tật, ung thư, giảm sức sống, ức chế sự phát triển của cơ thể và có thể dẫn đến tử vong nghiêm trọng. Crom (VI) được vận chuyển vào các tế bào theo gradient nồng độ anion hóa trị hai thông qua kênh anion clorua phosphate nội bào [4]. Crom (IV) được tạo ra khi Crom (VI) tương tác với glutathione/glutathione synthetase trong các kênh clorua trong tế bào chất và màng bào quan. Chúng lây lan đến ty thể và nhân, nơi chúng có thể gây ra sự rối loạn dịch mã hay giải mã ở DNA [4]. Phơi nhiễm Crom (VI) trước khi sinh gây ra hiện tượng lão hóa sinh sản sớm ở chuột con F1 bằng cách tăng cường quá trình apoptosis của tế bào mầm và tăng sự tan rã của nang tế bào mầm [5]. Tế bào soma và tế bào gốc sinh tinh của chuột đực trải qua quá trình chết theo chương trình phụ thuộc vào ty thể khi tiếp xúc với Crom (VI). Ngoài ra, các quá trình sinh lý của tế bào TM3 Leydig và TM4 Sertoli của chuột cũng bị cản trở bởi Crom (VI), chất này cũng can thiệp vào cơ chế biệt hóa và tự đổi mới của tế bào gốc sinh tinh [6]. Crom (VI) gây ra sự thay đổi trong quá trình phát triển tế bào trứng của chuột bằng cách tăng stress oxy hóa, phá vỡ chuỗi kép DNA, phá vỡ các vi ống và phân tách các nhiễm sắc thể bất thường [7]. Crom (VI) tăng tốc quá trình apoptosis ở tế bào lá nuôi hợp bào, nội mô mạch máu của các tuyến chất béo và biểu mô túi noãn hoàng thông qua các con đường phụ thuộc vào caspase 3 và p53 [8]. Crom (VI) làm

giảm biểu hiện của Bcl2, Bcl-XL và XIAP trong nhau thai đồng thời điều chỉnh tăng quá trình apoptosis ở vùng mê cung và vùng đáy [8].

Nhiều nghiên cứu về độc tính của kim loại nặng khác nhau đã được thực hiện bằng cách sử dụng nhiều mô hình thử nghiệm trên động vật; tuy nhiên, cá ngựa vằn đã trở thành mô hình chính cho các thử nghiệm *in vivo* [9]. Chế độ ăn của cá ngựa vằn trưởng thành bị nhiễm Crom làm giảm khả năng sống sót của cá ngựa vằn con. Crom gây ra những thay đổi trong quá trình trao đổi chất của ấu trùng cá ngựa vằn và gây nhiễm độc thần kinh; hơn nữa, Crom cũng làm thay đổi hệ vi sinh vật và hệ chuyển hóa của cá ngựa vằn, có liên quan đến nhiễm độc thần kinh. Tiếp xúc với Crom ảnh hưởng đến phôi cá ngựa vằn bằng cách gây ra sự phát triển bất thường và gây dị tật, trong đó quá có những biểu hiện nghiêm trọng liên quan đến tim và hệ thần kinh. Trong quá trình phát triển của phôi cá ngựa vằn, Crom cũng làm tăng độc tính phát triển của graphene oxide. Tuy nhiên, không có sự biểu hiện đặc trưng rõ ràng của các gene liên quan đến quá trình apoptosis và các gene liên quan đến chất kháng oxy hóa trong phôi cá ngựa vằn khi tiếp xúc với Crom. Trong nghiên cứu này, tác giả đã sử dụng cá ngựa vằn như một mô hình để đánh giá tác động của Crom (VI) đối với sự phát triển của cá ngựa vằn ở các giai đoạn khác nhau, bao gồm giai đoạn phôi, giai đoạn ấu trùng và giai đoạn cá trưởng thành. Từ những lý do trên, đề tài “*Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá ngựa vằn (Danio rerio)*” được thực hiện.

2. Mục tiêu của đề tài

Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng cá ngựa vằn (*Danio rerio*) để đánh giá tác động của Crom (VI) lên quá trình phát triển của cá ngựa vằn ở các giai đoạn khác nhau, bao gồm ở giai đoạn phôi, ấu trùng và cá trưởng thành. Các mục tiêu cụ thể như sau:

- Đánh giá được tác động của Crom (VI) đối với sự phát triển của cá ngựa vằn thông qua tỷ lệ sống, nhịp tim và chiều dài ấu trùng cá.

- Xác định được sự thay đổi biểu hiện của các gene đáp ứng stress oxy hóa và apoptosis, cũng như thay đổi trong cấu trúc một số nội quan ở cá ngựa vằn khi tiếp xúc với Crom (VI).

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Cá ngựa vằn được nuôi tại Viện Sinh học nhiệt đới để sử dụng làm đối tượng nghiên cứu trong đề tài. Cá ngựa vằn được định danh, đánh giá các thay đổi về hình thái học, cấu trúc mô (ruột, gan và buồng trứng), tỷ lệ sống, nhịp tim, chiều dài tổng cơ thể cá, tích tụ Crom (VI) trong cơ thể cá và mức độ biểu hiện mRNA, protein trong điều kiện *in vitro*.

4. Nội dung nghiên cứu

Các nội dung của nghiên cứu bao gồm:

- Định danh cá ngựa vằn bằng phương pháp phân tích các đặc điểm hình thái và các kỹ thuật sinh học phân tử.
- Đánh giá tác động của Crom (VI) đối với sự phát triển của cá ngựa vằn ở các giai đoạn khác nhau, bao gồm giai đoạn phôi, giai đoạn ấu trùng.
- Đánh giá sự tăng hay giảm sự biểu hiện của các gene đáp ứng và các gene kiểm soát tổn thương của cá ngựa vằn khi tiếp xúc với Crom (VI).
- Đánh giá sự tác động của Crom (VI) đến cấu trúc các nội quan (ruột, gan và buồng trứng) của cá ngựa vằn. Đồng thời xác định hàm lượng tích tụ Crom (VI) trong quá trình phát triển của cá ngựa vằn.

5. Những đóng góp mới của luận án

Những đóng góp mới của luận án bao gồm:

- Nghiên cứu này đã chỉ ra Crom (VI) có khả năng gây ức chế sự phát triển và làm chậm quá trình thoát nang của phôi cá ngựa vằn ở giai đoạn sớm bao gồm giảm tỷ lệ sống, sự thay đổi chiều dài cơ thể ấu trùng, nhịp tim tăng và các hình thái dị tật ở cá.
- Crom (VI) cũng cảm ứng sự sai hỏng trong cấu trúc một số nội quan quan trọng như ruột, gan và buồng trứng của cá ngựa vằn. Điều này làm nổi bật tác động trực tiếp vào sức khỏe nội tiết và hệ tiêu hóa của cá.
- Crom (VI) cảm ứng sự thay đổi biểu hiện của một số gene liên quan quá trình apoptosis.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về Crom (VI)

1.1.1. Nguồn gốc của kim loại nặng

Các kim loại nặng đóng vai trò quan trọng trong hệ sinh thái và quá trình địa chất khác nhau của Trái đất, chúng tồn tại dưới nhiều dạng khác nhau và thường xuất hiện trong môi trường tự nhiên dưới dạng hợp chất với các nguyên tố khác. Trong lớp vỏ Trái đất, chúng ta thấy sự hiện diện đa dạng của các kim loại nặng như sắt, arsen, chì, crom, kẽm, vàng bạc và niken, mỗi loại đều có vai trò riêng trong quá trình địa chất và hóa học của hệ thống Trái đất. Một trong những dạng phổ biến của các kim loại nặng là sulfua, trong đó các nguyên tố được liên kết với lưu huỳnh. Sulfua không chỉ là một chất phổ biến mà còn thường tồn tại theo cặp hoặc kết hợp với các kim loại khác để tạo thành các khoáng sản và tài nguyên thiên nhiên quan trọng. Điển hình là pyrit (FeS_2), một loại sulfua sắt thường được tìm thấy kèm theo đồng (chalcopyrit, CuFeS_2) trong các mỏ quặng. Các sunfua cũng có thể tồn tại dưới dạng nhóm nguyên tố, trong đó các kim loại trong cùng một nhóm thường xuất hiện cùng nhau. Ngoài sulfua, các kim loại nặng cũng có thể tồn tại ở dạng oxit như nhôm, mangan, selen và antimon [10]. Các kim loại có trong đất thường trực tiếp đi vào môi trường nước thông qua các quá trình tự nhiên như sự phong hóa đá, sự bào mòn do nước. Ngoài ra, môi trường nước có pH thấp cũng là một nguyên nhân khiến một số kim loại nặng hòa tan vào nước. Đặc biệt, các hoạt động công nghiệp cũng đóng góp vào việc gia tăng lượng kim loại nặng vào môi trường. Trong quá trình sản xuất công nghiệp, nhiều loại hóa chất và phân bón được sử dụng và trong số đó chứa các kim loại nặng như arsenic (As), chì (Pb) và thủy ngân (Hg). Phân lân là một loại phân bón phổ biến, thường chứa những kim loại nặng này. Hóa chất bảo vệ thực vật, được sử dụng để ngăn chặn sự phát triển của côn trùng và bệnh hại trong nông nghiệp cũng thường chứa nhiều kim loại nặng như arsenic (As), chì (Pb) và thủy ngân (Hg). Ngoài ra, các loại thuốc trừ sâu và thuốc bảo vệ thực vật khác như Macozeb, CuSO_4 , Zineb, cũng chứa các kim loại nặng như mangan (Mn), đồng (Cu), và kẽm (Zn). Khi các loại hóa chất và thuốc này được sử dụng trong nông nghiệp, chúng có thể tan ra vào nước thông qua việc bón phân hoặc phun thuốc, làm tăng sự hiện diện của các kim loại nặng trong môi trường nước [11].

Ô nhiễm kim loại nặng là một trong những vấn đề môi trường quan trọng nhất hiện nay. Các ngành công nghiệp khác nhau sản xuất và xả thải chứa các kim loại nặng khác nhau vào môi trường bao gồm khai thác và luyện kim, khai thác dầu mỏ, ngành phân bón và thuốc trừ sâu, mạ điện, công nghiệp thuộc da, sản xuất các thiết bị điện tử.... Trong số các thành phần chính của chất thải công nghiệp, các kim loại nặng và các chất độc hại chiếm một tỷ trọng quan trọng. Do đó, kim loại như một nguồn tài nguyên đang trở nên khan hiếm và cũng gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng, đe dọa đến sức khỏe con người và hệ sinh thái. Dữ liệu từ các nghiên cứu quan trắc và phân tích môi trường ở các khu vực ven biển gần các thị trấn và trung tâm công nghiệp đã chỉ ra rằng, tại các trung tâm công nghiệp lớn, hàm lượng đồng, chì, cadmium và coban,... trong nước thường cao hơn nhiều so với mức tự nhiên. Ngoài ra, các loại khí thải từ các nhà máy nhiệt điện, các lò hỏa táng, và từ các phương tiện giao thông cũng chứa một lượng lớn kim loại nặng, gây ra ô nhiễm không khí và sau đó là ô nhiễm môi trường nước. Nước thải từ ngành khai thác khoáng sản thường chứa một lượng lớn kim loại nặng, và hầu hết được xả ra môi trường mà không qua các hệ thống xử lý nước thải.

1.1.2. Định nghĩa về Crom

Kim loại Crom tiếng Anh gọi là *Chromium*, nhưng tên nguyên tố Crom này bắt nguồn từ tiếng Hy Lạp *χρῶμα*, *chrōma*, có nghĩa là màu sắc. Crom trong tự nhiên là kim loại màu xám có ánh bạc, các hợp chất của nó có thể thể hiện nhiều màu sắc khác nhau như: lục, đỏ thẫm, vàng, cam. Trong bảng tuần hoàn hóa học, kim loại Crom được biểu thị bằng ký hiệu là Cr và có số nguyên tử là 24. Crom là nguyên tố đầu tiên trong nhóm VI là một kim loại cứng nhất trong tất cả các kim loại và nhiệt độ nóng chảy khá cao so với mặt bằng chung của kim loại.

Trong tự nhiên, kim loại Crom có thể được tìm thấy dưới dạng khoáng chất, tùy thuộc và hóa trị và liều lượng nó có thể được coi là yếu tố gây bệnh ung thư hoặc được xem như một vi chất dinh dưỡng quan trọng [1]. Mặc dù Crom có vai trò quan trọng trong một số quá trình sinh học, cơ quan Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ liệt kê kim loại Crom là một trong tám chất gây ô nhiễm kim loại nặng phổ biến nhất vì nó được coi là nguyên tố có hại [2].

Crom chủ yếu tồn tại ở hai dạng, thứ nhất là dạng Crom hóa trị ba bất động, ít hòa tan, Crom (III) trong điều kiện khử trong khi ở dạng thứ hai là Crom hóa trị sáu

là chất di động, độc hại và có khả năng sinh học trong điều kiện oxy hóa. Trong đó Crom (III) ít độc hơn nhiều so với Crom (VI) [3]. Việc phơi nhiễm ở nồng độ Crom thấp cũng làm tăng sự tích tụ Crom trong tế bào của sinh vật và con người, điều này có thể là tác nhân dẫn đến ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe.

Crom (VI) thường hiện diện trong môi trường do chất thải từ các ngành công nghiệp như luyện quặng, sản xuất thép và hợp kim, mạ kim loại, thuộc da, bảo quản gỗ và nhuộm màu [12]. Nồng độ Crom (VI) thấp 0,5 mg/L trong dung dịch và 5 mg/Kg trong đất có thể gây độc cho thực vật [12]. Sự tồn tại của Crom trong môi trường có thể gây ảnh hưởng đến cả động vật thủy sinh và con người. Mức Crom hòa tan trong nước ngọt thường nằm trong khoảng từ 10 đến 50 ng/L, tuy nhiên, ở nồng độ cao hơn, vượt quá 1 mg/L cũng đã được ghi nhận ở một số khu vực công nghiệp hóa [13, 14].

Động vật thủy sinh tiếp xúc với Crom (VI) có thể gây ức chế sự phát triển, giảm khả năng sinh sản và trong trường hợp tiếp xúc lâu trong môi trường này có thể dẫn đến chết hàng loạt gây mất cân bằng hệ sinh thái [15]. Mô hình động vật và con người đã được sử dụng để nghiên cứu độc tính và khả năng gây ung thư của Crom (VI), kết quả cho thấy các hợp chất Crom (VI) có độ hòa tan trong nước ở nồng độ thấp và cao có thể gây ra ung thư đường hô hấp, hệ tiêu hóa, hệ miễn dịch, gan và thận khi con người và động vật phơi nhiễm với các hợp chất Crom (VI). Trong nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng Crom (VI) có cấu trúc đẳng hướng với photphat và sunfat nên nó dễ dàng được hấp thu qua đường tiêu hóa và thâm nhập vào nhiều mô và cơ quan khắp cơ thể. Từ các nghiên cứu dịch tễ học, có bằng chứng cho rằng Crom (VI) gây tăng nguy cơ ung thư xương, tuyến tiền liệt, u lympho, bệnh Hodgkin, bệnh bạch cầu, ung thư dạ dày, bộ phận sinh học, thận và bàng quang [16].

Quan trọng hơn, các kim loại nặng trong môi trường nước có thể được tích tụ trong cơ quan của động vật thủy sinh như cá ngựa vằn [17]. Cách Crom (VI) được vận chuyển vào các tế bào trong cơ thể là thông qua gradient nồng độ anion-2 và các kênh anion clorua phosphate nội bào [4]. Crom (IV) được tạo ra khi Crom (VI) tương tác với glutathione/glutathione synthetase trong các kênh clorua trong tế bào chất và màng bào quan. Chúng lây lan đến ty thể và nhân, nơi chúng có thể gây ra sự gián đoạn DNA [4].

Nghiên cứu trên chuột đã cho thấy rằng phơi nhiễm Crom (VI) trước khi sinh gây ra hiện tượng lão hóa sinh sản sớm ở chuột con F1 bằng cách tăng cường quá trình apoptosis của tế bào mầm và tăng sự tan rã của nang tế bào mầm [5]. Tế bào soma và tế bào gốc sinh tinh của chuột đực trải qua quá trình apoptosis phụ thuộc vào ty thể khi tiếp xúc với Crom (VI). Crom (VI) cũng can thiệp vào quá trình sinh lý của nhiều loại tế bào khác nhau, bao gồm tế bào TM3 Leydig và TM4 Sertoli của chuột, gây cản trở cơ chế biệt hóa và tự động đổi mới của tế bào gốc sinh tinh [6].

Crom (VI) được chứng minh là gây ra sự thay đổi trong quá trình phát triển tế bào trứng của chuột bằng cách tăng stress oxy hóa, phá vỡ chuỗi kép DNA, phá vỡ cấu trúc các vi ống và phân tách các nhiễm sắc thể bất thường [7]. Crom (III) đã được ghi nhận là làm giảm tỷ lệ phôi nang, giảm số lượng tế bào trong phôi, tạo ra sự biệt hóa dòng dõi bất thường và tăng cường stress oxy hóa và quá trình apoptosis [18].

Crom (VI) có khả năng tăng tốc quá trình apoptosis ở nhiều loại tế bào khác nhau, bao gồm tế bào lá nuôi, niêm mạc mạch máu của các tuyến chất béo và biểu mô túi noãn hoàng thông qua các con đường phụ thuộc vào *caspase 3* và *p53* [8]. Crom (VI) làm giảm biểu hiện của các protein Bcl2, Bcl-XL và XIAP trong nhau thai và điều chỉnh tăng quá trình apoptosis ở vùng mê cung và vùng đáy [8].

Trong nghiên cứu về độc tính của kim loại Crom, đã có nhiều nghiên cứu được tiến hành bằng nhiều mô hình động vật khác nhau như: chuột, thỏ và các động vật có vú bậc cao khác. Tuy nhiên, cho tới thời điểm hiện tại, chưa có bất kỳ nghiên cứu nào sử dụng mô hình cá ngựa vằn để nghiên cứu một cách toàn diện và chi tiết về sự ảnh hưởng của các nồng độ Crom (VI) lên sự phát triển của loài này. Sự thiếu hụt thông tin về tác động của Crom (VI) đối với sự phát triển cá ngựa vằn có thể gây thiếu cơ sở dữ liệu cho các nghiên cứu về độc tính của kim loại nặng và ảnh hưởng của chúng lên sức khỏe con người trong tương lai. Do đó, nghiên cứu này, việc sử dụng mô hình cá ngựa vằn để xác định các nồng độ Crom (VI) ảnh hưởng đến sự phát triển của cá ngựa vằn ở các giai đoạn phát triển khác nhau, bao gồm phôi, ấu trùng và trưởng thành. Sự phân tích trong nghiên cứu này bao gồm việc quan sát và đánh giá hình thái, cấu trúc mô, tỷ lệ sống, nhịp tim cũng như đánh giá sự thay đổi biểu hiện của các gene liên quan đến quá trình apoptosis và kháng oxy hóa. Những nghiên cứu này có thể cung cấp thông tin quan trọng về tác động của Crom (VI) lên động vật thủy

sinh và có thể ứng dụng cho các nghiên cứu về tác động của kim loại nặng khác đối với sức khỏe con người trong tương lai.

1.2. Tổng quan về cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

Cá ngựa vằn (*Danio rerio*) là một trong những loài cá được sử dụng như một sinh vật mẫu quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu độc chất sinh thái để đánh giá tác động của hóa chất và xác định rủi ro của chúng đối với môi trường và chúng được sử dụng rộng rãi trong nhiều nghiên cứu khác [19, 20]. Đặc biệt, trong lĩnh vực nghiên cứu độc tính thủy sinh của các kim loại nặng khác nhau đã được tiến hành trên nhiều mô hình động vật khác nhau như: chuột, ếch, thỏ và các loài khác. Tuy nhiên, cá ngựa vằn được coi là một trong những mô hình động vật có xương sống thuận lợi nhất cho các nghiên cứu *in vivo* về độc tính thủy sinh [9].

Cá ngựa vằn thuộc loài cá nước ngọt có nguồn gốc từ Nam Á (Nepal, Ấn Độ). Chúng được biết đến bằng tên tiếng anh là *Zebrafish* hoặc *Zebra danio*, thuộc họ Danionidae và bộ Cypriniformes. Cá ngựa vằn thường được tìm thấy ở các ao cạn, kênh rạch và suối.

Ở Việt Nam, cá ngựa vằn thường được nuôi làm cá cảnh, đặc biệt là được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu. Điều này là do cá ngựa vằn rất dễ nuôi, với sự thay đổi của môi trường sinh sống cá thích nghi tốt, ưu điểm trong nghiên cứu về độc tính. Do có nhiều ưu điểm nên cá ngựa vằn được dùng trong nghiên cứu, các ưu điểm bao gồm: cá trưởng thành có kích thước nhỏ, việc chăm sóc đơn giản ít tốn công sức, phát triển nhanh, vòng đời của cá ngắn. Trong điều kiện thích hợp, cá ngựa vằn mỗi lần sinh sản số lượng phôi lớn từ 100 phôi đến 150 phôi. Giai đoạn phôi cá ngựa vằn, noãn hoàng được bao bọc bởi lớp vỏ trong suốt và đây cũng là giai đoạn quan trọng và nhạy cảm trong quá trình phát triển của cá. Hơn nữa, cá ngựa vằn phát triển nhanh chóng các cơ quan như: não, tim, tuyến tụy, thận, ruột, xương, cơ, gan, buồng trứng và các hệ thống cảm giác mà tất cả hoạt động đầy đủ vào ngày thứ 3 sau khi thụ tinh [21].

Hệ gene cá ngựa vằn và hệ gene con người có mức độ tương đồng trên 70% và sự phát triển của cá ngựa vằn và động vật có vú bậc cao có sự tương đồng đáng kể với quá trình phát triển [22, 23]. Cá ngựa vằn có bộ gen lưỡng bội chứa 25 cặp nhiễm sắc thể và điều này tạo ra sự tương đồng với bộ gen của động vật có vú bậc cao (chuột, thỏ...) đặc biệt là con người (khoảng 70% với bộ gen của con người). Các công cụ để

ngiên cứu về cấu trúc và chức năng gene cá ngựa vằn đang được phát triển. Vào tháng 2/2001, Viện Sanger khởi động dự án giải trình tự bộ gene cá ngựa vằn. Theo báo cáo cuối cùng của Ensembl vào tháng 7/2009 có khoảng 26,000 trình tự tương đương 1,5/2 tỷ cặp nucleotide đã được giải mã và 14,707 gene đã được định danh [24]. Hiện nay, thư viện cDNA cá ngựa vằn đã sẵn sàng để phục vụ các kỹ thuật như *microarray*, kỹ thuật lai *in situ* phôi và can thiệp bằng *antisense morpholino oligonucleotide*... Các phòng thí nghiệm trên thế giới đang tập trung vào việc thiết lập bản đồ gene và bản đồ EST của cá ngựa vằn.

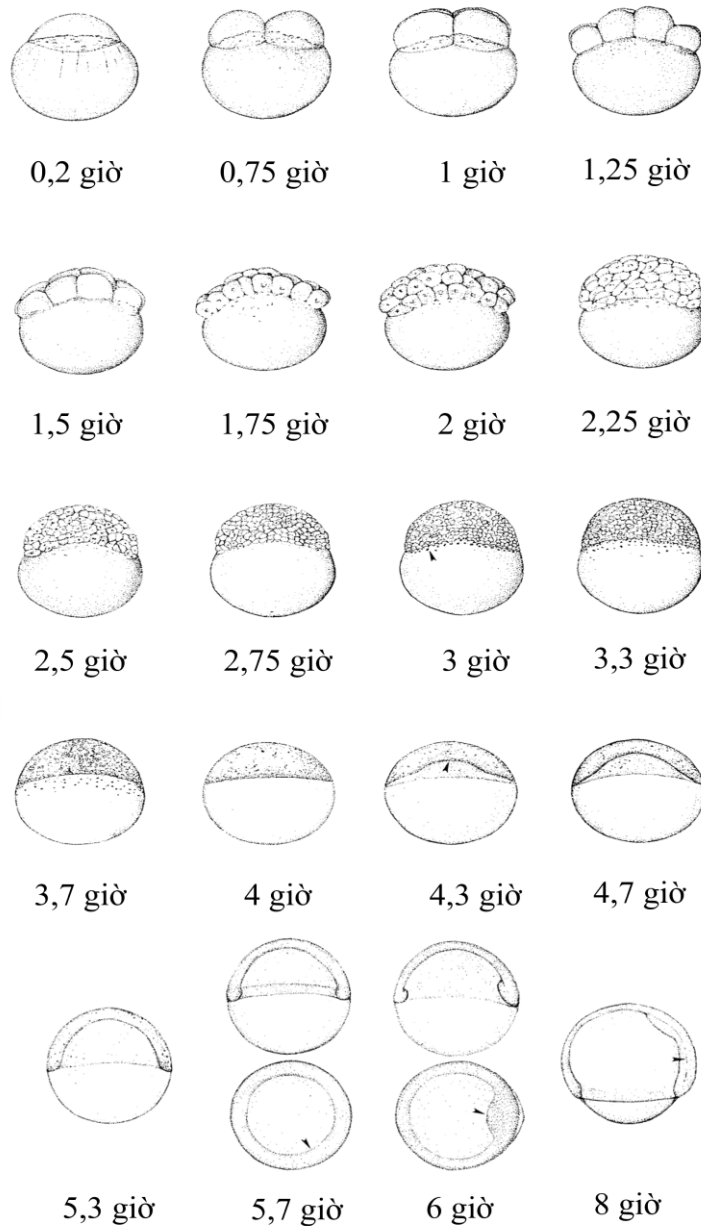
Theo Bradley và cộng sự (2007), mặc dù chỉ mới có 523 gene và EST cá ngựa vằn được đưa lên bản đồ đã xác nhận được 80% tương đồng với bộ gene người [25]. So với đánh giá trước đây với 124 gene chiếm 64%, điều này cho thấy rằng càng nhiều trình tự của cá ngựa vằn được so sánh, phần trăm tương đồng với bộ gene người sẽ tăng lên và có thể đạt tới 100% trong tương lai. Do đó, cá ngựa vằn đang trở thành sự lựa chọn quan trọng cho nhiều mô hình nghiên cứu. Điều này được thể hiện qua sự gia tăng đáng kể trong số lượng bài báo công bố trên Pubmed trong những năm gần đây, tăng gấp 10 lần so với cách đây một thập kỷ. Khoảng 50% đến 70% các chất hóa học tác động lên chu kỳ tế bào hữu nhũ thì cũng có tác dụng tương tự trên cá ngựa vằn [26]. Trong đó, có những nghiên cứu cho thấy kết quả giống nhau lên đến 95%. Đáng chú ý, khi so sánh trình tự bộ gene người và bộ gen cá ngựa vằn, cho thấy có sự bảo tồn của các gene liên quan đến chu kỳ tế bào, các gene tăng cường hoặc ức chế ung thư và các gene đột biến gây bệnh ung thư (oncogen).

Trong các nghiên cứu y học cá ngựa vằn hay được sử dụng, chúng có các đặc điểm như yếu tố về gene, vòng đời ngắn, các đặc điểm thuận lợi về phôi và ấu trùng là trong suốt dễ quan sát, số lượng lớn dễ dàng bố trí thí nghiệm. Trong nghiên cứu khoa học về phát triển thuốc điều trị ung thư, u ác tính và bệnh tim mạch cá ngựa vằn được sử dụng. Trong các nghiên cứu y khoa, nghiên cứu ảnh hưởng của các loại thuốc kháng sinh đến các giai đoạn phát triển của 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. 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, chất bảo quản thực phẩm.

Thông tin từ các giai đoạn phát triển khác nhau của phôi và ấu trùng đóng vai trò quan trọng và chính xác trong việc nghiên cứu sự phát triển của loài. Điều này bởi vì các phôi và ấu trùng phát triển theo các tỷ lệ và quá trình khác nhau. Trong các thí nghiệm sử dụng mô hình cá ngựa vằn, có nhiều cấp độ và tiêu chí để đánh giá. Cách đơn giản nhất là đánh giá các tác động của hóa chất lên sự biến đổi về hình thái bên ngoài cũng như biểu hiện bên trong của phôi và ấu trùng. Khi tiếp xúc với các hóa chất độc hại đến một ngưỡng nhất định sẽ ảnh hưởng đến sức sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn, cũng như gây dị tật, đột biến. Các tiêu chí quan sát để so sánh với nhóm đối chứng rất đa dạng, bao gồm các yếu tố như kích thước của mắt, nhịp tim, hoạt động não bộ, sự phát triển của trứng, và kích thước cơ thể. Dữ liệu thu thập sau khi tiến hành phân tích thống kê và xây dựng các đường cong phản ứng với các nồng độ hóa chất thử nghiệm, từ đó đánh giá các chỉ số độc học như giá trị LC_{50} , là nồng độ của chất thử gây tử vong cho 50% tổng số phôi trong lô thí nghiệm.

Sau giai đoạn thụ tinh, phôi của cá ngựa vằn không ngừng trải qua một chuỗi các giai đoạn phát triển phức tạp. Giai đoạn đầu tiên trong quá trình này là giai đoạn blastula, một giai đoạn quyết định trong sự phát triển ban đầu của phôi. Trong giai đoạn blastula, các gene của phôi được kích hoạt để bắt đầu quá trình biểu hiện gen và phát triển cấu trúc. Trước đó, các gene này đã được kiểm soát thông qua các tín hiệu được lưu giữ trong trứng suốt quá trình hình thành trứng, trong đó mRNA từ mẹ đóng vai trò quan trọng. Sự kích hoạt của các gene trong phôi xảy ra khi giai đoạn blastula bắt đầu, đặc biệt là khi lần phân chia tế bào thứ 10 xuất hiện. Ở giai đoạn này, phôi có hình dạng của một cầu và bao gồm hàng trăm tế bào, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phát triển và hình thành cấu trúc. Tiếp theo, phôi tiến vào giai đoạn chuyển giao blastula, một giai đoạn quan trọng trong sự phát triển. Trong giai đoạn này, các tế bào trong phôi bắt đầu phân biệt và tự tổ chức thành ba lớp tế bào khác nhau. Lớp đầu tiên, được hình thành trong lần phân cắt thứ 9 và 10, được biết đến là lớp hợp bào noãn hoàng (YSL - yolk syncytial layer), đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển. Quá trình bao phủ, một quá trình quan trọng khác, bắt đầu xảy ra khi giai đoạn blastula muộn và tiếp tục kéo dài trong giai đoạn gastrula. Trong giai đoạn này, các sự kiện sinh học quan trọng xảy ra, đóng vai trò quyết định trong việc hình thành cấu trúc và chức năng của phôi cá ngựa vằn trong tương lai [27]. Hình 1.1.

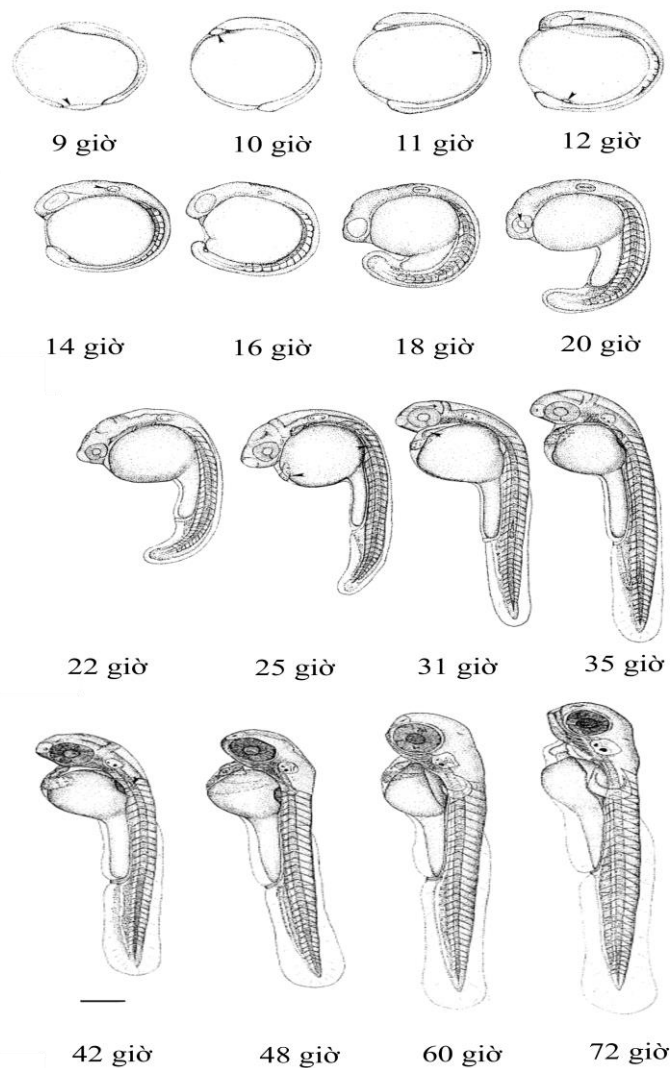
miêu tả sự thay đổi hình dạng phôi ở giai đoạn blastula tại các mốc thời gian giống với nghiên cứu của Kimmel và cộng sự (1995) [21].



Hình 1.1. Sự thay đổi hình dạng phôi giai đoạn blastula tại các mốc thời gian [21].

Giai đoạn tiếp theo trong sự phát triển của phôi cá ngựa vằn là giai đoạn gastrula, một giai đoạn quan trọng đánh dấu sự hình thành các lớp tế bào phân biệt. Giai đoạn này bắt đầu khi phôi bì mở rộng đạt khoảng một nửa diện tích của noãn hoàng, với một phần của bề mặt đã được bao phủ bởi noãn hoàng khoảng 50%. Trong quá trình này, các tế bào ở rìa của phôi bì bắt đầu di chuyển từ vị trí ban đầu của mình và bắt đầu lan rộng trên đỉnh của lớp hợp bào noãn hoàng (YSL), quá trình này được gọi là sự thoái triển. Sự thoái triển là quá trình quan trọng định hình sự phát triển của

phôi, khiến cho các tế bào bề mặt của phôi bì di chuyển vào bên trong và tạo ra hai lớp tế bào khác biệt. Lớp tế bào ở phía ngoài của phôi bì sẽ phát triển thành lớp ngoài bì của phôi, trong khi lớp tế bào ở phía bên trong sẽ tạo thành lớp nội bì. Lớp ngoài bì, còn được gọi là ectoderm, sẽ phát triển thành các cấu trúc bên ngoài của cơ thể cá ngựa vằn, bao gồm da và hệ thần kinh. Trong khi đó, lớp nội bì, hay endoderm, sẽ tạo thành các cấu trúc bên trong của cơ thể, bao gồm các cơ, xương, hệ tuần hoàn, thận, hệ sinh dục và tuyến sinh dục, cùng với các phần nội bì có chức năng trong hệ tiêu hóa và ruột. Sự phát triển của giai đoạn gastrula là bước quan trọng trong quá trình hình thành và phát triển của phôi cá ngựa vằn, tạo nên các nền móng cho việc hình thành các bộ phận và cấu trúc cơ thể sau này. Hình 1.2 miêu tả sự thay đổi hình dạng quá trình hình thành các cơ quan và thoát nang của cá ngựa vằn theo mô tả của Kimmel và cộng sự (1995) [21].



Hình 1.2. Sự thay đổi hình dạng quá trình hình thành các cơ quan và thoát nang [21]

Sau 8 giờ, sự hình thành các cơ quan diễn ra nhanh chóng, với hầu hết cấu trúc cơ quan thô sơ được hình thành trong vòng 24 giờ. Ở giai đoạn này, ấu trùng trong phôi đã phát triển đủ để có 30 cặp đốt sống, tim đã bắt đầu đập, nhưng cấu trúc và sắc tố ở mắt và da vẫn chưa hoàn thiện. Cặp đốt sống đầu tiên hình thành sau 10 giờ phát triển, và sau đó sau mỗi 1/2 giờ sẽ hình thành thêm một cặp mới. Điều này có nghĩa là trong vài giờ, ta có thể quan sát một số cặp đốt sống mới.

Hệ thần kinh cũng phát triển, đĩa thần kinh xuất hiện trong vòng 10 giờ, giống như cặp đốt sống đầu tiên. Sau đó, đĩa thần kinh gấp lại vào trong tạo thành sống thần kinh (13 giờ) và phát triển đường thần kinh (16 giờ). Đường thần kinh tạo lỗ để hình thành nên ống thần kinh lõm (bắt đầu lúc 18 giờ, khi phôi đạt 18 đốt sống). Vùng não có thể bắt đầu được xác định là các vùng sưng phồng phân biệt gọi là đốt thần kinh (neuromere). Khi đạt 18 giờ, có thể xác định được 10 đốt thần kinh, bao gồm 3 đốt đầu tiên tương ứng với bộ não cùng, bộ não trung gian, bộ não giữa và 7 đốt cuối cùng tương ứng với bộ não sau.

Sau khi trải qua giai đoạn thụ tinh, phôi của cá ngựa vằn bắt đầu một chuỗi các biến đổi đáng kể trong quá trình phát triển. Khoảng sau 24 giờ, phôi bắt đầu phản ứng với môi trường xung quanh và các yếu tố khác như sự tiếp xúc và sự hiện diện của các sắc tố. Đây là giai đoạn quan trọng khi mà các biến đổi về hình dạng cơ thể bắt đầu trở nên rõ ràng, với việc hình thành từng phần của các bộ phận cơ thể diễn ra đồng thời và đồng bộ. Ở giai đoạn này, ấu trùng phôi bắt đầu thực hiện các hoạt động chủ yếu như quay mình, một hoạt động mà chúng tiến hành liên tục từ giai đoạn phân đốt cho đến giai đoạn hậu họng. Đồng thời, cơ thể của phôi cũng bắt đầu trải qua sự phát triển, một quá trình quan trọng trong việc làm rách vỏ nang của phôi, giúp cho phôi có thể thoát khỏi lớp vỏ nang và tiếp tục phát triển dưới dạng ấu trùng. Các biến đổi và hoạt động tại giai đoạn này đóng vai trò quan trọng trong việc chuẩn bị cho sự phát triển tiếp theo của phôi cá ngựa vằn, là bước quan trọng trước khi chúng bước vào giai đoạn phát triển và trưởng thành tiếp theo.

Trong vùng hậu họng, hàm và nắp mang được tạo thành từ hai vòm hậu họng đầu tiên và sau đó các vòm họng sau cũng được hình thành rõ rệt (còn gọi là vòm mang tạo thành mang). Hệ thống đường viền bên gồm một loạt các đường ống chứa cấu trúc cảm ứng gọi là khối thần kinh giác quan (neuromast), giúp phát hiện những chuyển động chậm trong nước và cung cấp thông tin cho cá về môi trường xung

quanh. Khi đạt đến giai đoạn 18 cặp đốt sống, các khối thần kinh giác quan bắt đầu di chuyển trong biểu bì, mỗi giờ di chuyển từ một cặp đốt sống sang đốt sống khác và tiếp tục cho đến đuôi đuôi vào khoảng 40 giờ. Ấu trùng phôi thoát nang trong vòng 48 – 72 giờ. Khi bước vào giai đoạn này, ấu trùng cá ngựa vằn hoàn thiện hầu hết quá trình phát triển về hình thái và tiếp tục tăng trưởng một cách nhanh chóng. Trong suốt ngày tiếp theo, có sự thay đổi rõ rệt về hình dạng của chúng, bao gồm bong bóng bên trong cơ thể căng phồng và miệng tiếp tục kéo dài. Trong khi đó, màu sắc của chúng dần trở nên sáng hơn và kéo dài ra. Các ống ruột tập trung nhiều ở bụng và có thể dễ dàng quan sát được. Khác với giai đoạn phôi, ấu trùng giai đoạn sớm bắt đầu bơi một cách linh hoạt và cử động bằng hàm miệng, vây ngực và mắt. Những phát triển này giúp cá đáp ứng môi trường xung quanh, hô hấp, ẩn trốn kẻ săn mồi và tìm thức ăn. Sau 5 ngày sau khi thụ tinh và khi ra khỏi màng đệm, chúng bắt đầu tự kiếm ăn một cách độc lập.

1.3. Các nghiên cứu về ảnh hưởng của kim loại nặng lên cá ngựa vằn

Cá ngựa vằn đang dần thay thế các động vật khác như: chuột, thỏ,... trong việc nghiên cứu và thử nghiệm độc tính với những ưu điểm như sinh sản nhanh, số lượng phôi nhiều và dễ bố trí thí nghiệm trong phòng thí nghiệm.

Nhờ các yếu tố về hình thái như sự trong suốt của phôi và thời gian ngắn để hình thành đầy đủ các cơ quan, cá ngựa vằn đã trở thành một công cụ quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu y học. Sự trong suốt của phôi cho phép các nhà nghiên cứu quan sát một cách dễ dàng và chi tiết, giúp họ hiểu rõ hơn về quá trình phát triển của cơ thể và cơ chế của các bệnh lý. Điều này đặc biệt quan trọng trong việc phát triển các loại thuốc mới để phòng ngừa và điều trị ung thư, u ác tính và các bệnh tim mạch [28]. Phôi cá ngựa vằn có thể được quan sát thông qua mắt thường hoặc dưới kính hiển vi để nghiên cứu sự phát triển và các quá trình sinh học bên trong. Mỗi lần sinh sản, một cặp cá đực và cái có thể sinh ra một lượng lớn phôi, thường từ 100 đến 150 phôi trong mỗi lần đẻ. Đặc biệt, sự phát triển của phôi cá ngựa vằn diễn ra nhanh chóng và hiệu quả, với sự hình thành của các cơ quan và bộ phận cơ thể sớm. Điều này tương tự như quá trình phát triển của các loài động vật khác có xương sống, cho thấy tính đa dạng và quan trọng của loài cá ngựa vằn trong nghiên cứu sinh học so sánh.

Sau ba ngày kể từ quá trình thụ tinh, phôi đã phát triển đến giai đoạn ấu trùng. Trong quá trình này, các biến đổi quan trọng bắt đầu xuất hiện, đánh dấu sự chuyển từ giai đoạn phôi sang giai đoạn phát triển tiếp theo của cá ngựa vằn [29]. Điều này cung cấp điều kiện thuận lợi cho các nhà nghiên cứu theo dõi và nghiên cứu sự phát triển của cá ngựa vằn từ giai đoạn phôi đến giai đoạn ấu trùng trong môi trường thí nghiệm, giúp chúng ta hiểu rõ hơn về quá trình này và tác động của các yếu tố môi trường đối với sự phát triển của loài cá này. Dựa vào các tác động của môi trường lên phôi cá ngựa vằn có thể đưa ra dự đoán các nguy cơ đối với môi trường ảnh hưởng đến sức khỏe con người [30].

Nghiên cứu của Riggio và cộng sự (2003) đã tìm hiểu về sự tích lũy của Zn, Cu trong tế bào trứng cá ngựa vằn. Kết quả nghiên cứu này cho thấy cả Zn và Cu đều tích lũy trong quá trình phát triển của tế bào trứng cá ngựa vằn và xâm nhập vào bên trong tế bào trứng [31]. Kết quả chứng minh rằng hàm lượng kim loại tích tụ trong noãn bào tăng theo thời gian tiếp xúc. Trong quá trình phát triển của phôi sau khi thụ tinh giai đoạn 512 tế bào, việc tiếp xúc với Cu và Zn làm cho hàm lượng Cu và Zn tăng, sau đó giảm ở giai đoạn giữa gastrula.

Nghiên cứu thực hiện bởi Zhao và đồng nghiệp (2013) đã tiến hành một loạt thí nghiệm để khảo sát tác động của hạt ZnO đến quá trình phát triển của cá ngựa vằn. [32]. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy rằng hạt ZnO không chỉ gây ra sự gián đoạn trong quá trình nở của phôi, mà còn dẫn đến việc tăng tỷ lệ phát hiện các dị tật ở ấu trùng. Đặc biệt, các hạt ZnO được tìm thấy có khả năng tác động đến biểu hiện gen trong quá trình phát triển của phôi cá ngựa vằn. Sự thay đổi trong biểu hiện gen này có thể là nguyên nhân gây ra sự gián đoạn và dị tật trong quá trình phát triển của cá ngựa vằn. Những kết quả này đã làm nổi bật vai trò quan trọng của hạt ZnO trong việc ảnh hưởng đến sức khỏe sinh sản và phát triển của loài cá ngựa vằn. Điều này đặc biệt quan trọng trong ngữ cảnh của bảo vệ môi trường và quản lý nguồn lợi của các hệ sinh thái nước ngọt, nơi mà cá ngựa vằn thường sinh sống và đóng vai trò quan trọng trong chuỗi thức ăn.

Nghiên cứu của Kienle và cộng sự (2009) khi cá ngựa vằn tiếp xúc với $ZnCl_2$ cho thấy phôi phát triển bất thường, tỷ lệ nở thấp và chậm nở ở nồng độ $ZnCl_2$ cao [33]. Nghiên cứu của Anandhan và cộng sự (2013), đã chỉ ra rằng Al có tác động nghiêm trọng đối với sự phát triển của cá ngựa vằn. Kết quả nghiên cứu này cho thấy

ngay cả ở nồng độ thấp nhất của Al cũng có thể gây độc tính nghiêm trọng đối với các động vật thí nghiệm và tác động này không thể phục hồi trong một thời gian dài. Tương tự như việc nghiên cứu về Zn và Cu đã đề cập trước đó, sự tích lũy của Al cũng có thể gây ra sự suy giảm trong sự phát triển và gây ra các dị tật như cong vẹo cột sống ở cá ngựa vằn [34]. Điều này cho thấy tác động tiêu cực của kim loại Al đối với sự sinh trưởng và phát triển của loài cá này.

Nghiên cứu của Govind và cộng sự (2014) chỉ ra Pb gây độc tính đối với động vật và cá. Tiếp xúc với Pb có thể gây thiệt hại cho sản lượng sinh sản của một số động vật thủy sinh và gây ra các thay đổi trong hệ thần kinh [35].

Nghiên cứu của Ansari cũng chỉ ra rằng, ở giai đoạn đầu của cá ngựa vằn rất nhạy cảm với các kim loại nặng (Zn, Ni và Cr) ở mức rất thấp và tác động này có ảnh hưởng đáng kể tỷ lệ 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 và sinh sản của cá [36].

Nghiên cứu của Zheng và cộng sự (2016) phát hiện ra việc tiếp xúc của cá ngựa vằn với Zn và Cd trong thời gian dài có thể gây ra các phản ứng khác nhau đối với quá trình oxy hóa trong gan của chúng [37]. Điều này cho thấy sự đa dạng trong cách mà kim loại nặng tác động lên cơ thể cá ngựa vằn và có thể gây ra những hậu quả khác nhau cho sức khỏe loài cá này. Cá ngựa vằn tiếp xúc Zn không ảnh hưởng đến khối lượng cơ thể, chiều dài và tỷ lệ sống. Ngược lại, tiếp xúc với Cd gây ức chế khối lượng cơ thể và tỷ lệ sống.

Nghiên cứu của Chen và cộng sự (2021) đã đánh giá tác động chung của hợp chất oxit graphene (GO) và Crom (VI) liên quan đến sự phát triển của cá ngựa vằn ở giai đoạn phôi [38]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy tác động của GO và Crom (VI) đã được đánh giá thông qua thử nghiệm độc tính trên phôi cá ngựa vằn. Sự phối hợp của Crom (VI) (1 mg/L) và GO (0,01 mg/L) đã làm ức chế quá trình nở. So với việc tiếp xúc riêng lẻ với GO hoặc Crom (VI), việc tiếp xúc kết hợp của chúng (GO và Crom (VI)) đã tăng cường độc tính hình thái theo một mô hình phụ thuộc vào nồng độ và cong vẹo cột sống đã được quan sát là biểu hiện chính của sự biến dạng. Go và Crom (VI) đã thay đổi cấu trúc protein thứ cấp của phôi do sự tạo ra của ROS và căng thẳng oxy hóa. Sự suy thoái của màng cơ dọc và xương sụn đã được quan sát trong nhóm tiếp xúc kết hợp, chứng tỏ rằng GO và Crom (VI) đã gây ra sự rối loạn trong

quá trình phát triển của hệ cơ xương sụn. Các gen *coll1a1a*, *col2a1a* và *postnb* bị giảm biểu hiện trong khi các gen *acta1b* và *mmp9* tăng biểu hiện bởi GO và Crom (VI). Các nhóm chứa oxy của GO có thể bắt giữ thêm các cấu trúc β -sheet, gây ra căng thẳng oxy hóa, làm rối loạn quá trình phát triển của cơ xương và xương sụn ở ấu trùng cá ngựa vằn. Phát hiện này quan trọng để đánh giá rủi ro sinh thái của các loại vật liệu nano dẫn xuất của graphene trong môi trường tự nhiên.

McKim đã tiến hành một nghiên cứu tổng hợp phức tạp, trong đó tác giả đã tổng hợp và phân tích thông tin từ 150 nghiên cứu độc học đa dạng liên quan đến các giai đoạn phát triển khác nhau của cá. Nghiên cứu này không chỉ đánh giá tác động của các chất độc hại vào các giai đoạn phát triển của cá ngựa vằn mà còn tập trung vào việc xác định mức độ dự đoán của các tác nhân độc hại này đối với kết quả độc tính dài hạn. Kết quả của nghiên cứu này đã phát hiện ra một khía cạnh quan trọng: tác động đối với các giai đoạn đầu của phát triển của cá ngựa vằn có thể được sử dụng để dự đoán kết quả độc tính ảnh hưởng lâu dài với một mức độ chính xác đáng kể, đạt tới ít nhất 80%. Điều này cho thấy tiềm năng của việc sử dụng các giai đoạn phát triển sớm của cá ngựa vằn như một mô hình hiệu quả để đánh giá tác động của các chất độc hại và dự đoán nguy cơ độc hại trong tương lai [39].

Theo hướng dẫn của Tổ chức OECD (Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế), được công bố trong tài liệu số 236 vào năm 2013, các thử nghiệm trên phôi cá thường chỉ kéo dài trong khoảng từ 4 đến 5 ngày [40]. Trong giai đoạn này, ấu trùng cá vằn vẫn đang ở mức phát triển sơ khai và chưa có khả năng tự cung cấp dinh dưỡng cho bản thân, do đó chúng chưa được coi là cơ thể động vật hoàn chỉnh. Điều này làm cho việc sử dụng phôi cá không bị ràng buộc bởi các quy định nghiêm ngặt đối với việc thử nghiệm trên động vật, như các quy định đối với việc sử dụng động vật thí nghiệm trong các nghiên cứu. Thêm vào đó, một con cá cái có khả năng đẻ một lượng lớn trứng mỗi lần phối, thường từ 50 đến 200 trứng, tùy thuộc vào loài. Sự khả dụng của một lượng lớn phôi từ một lần phối giúp nâng cao khả năng thực hiện các thử nghiệm lặp lại và đa dạng hóa mẫu, giúp tăng tính đáng tin cậy và khả năng áp dụng kết quả vào các nghiên cứu về sinh thái và độc hại. [21]. Một lượng lớn phôi có thể chủ động tạo ra trong phòng thí nghiệm để sử dụng giá lượng lớn các thí nghiệm. Mô hình sử dụng phôi cá ngựa vằn có nhiều cấp độ và tiêu chí để đánh giá tác động của các chất thử nghiệm. Cấp độ đánh giá đơn giản nhất là dựa trên các tác động của chất

thử nghiệm đến hình thái bên ngoài của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn. Hầu hết các loại hóa chất có thể gây độc tùy thuộc và liều lượng và nồng độ sử dụng. Khi chất thử nghiệm vượt qua một ngưỡng nào đó, chúng sẽ gây ra các biểu hiện bất thường như dị tật, quái thai hoặc ảnh hưởng đến sức sống của phôi hoặc ấu trùng trong thí nghiệm. Các tiêu chí quan sát thường được sử dụng để so sánh với đối chứng là rất đa dạng, bao gồm hình dạng bên ngoài, mắt, vùng tim, vùng noãn hoàng và nhiều yếu tố khác. Số liệu thu được sẽ được phân tích thống kê để xây dựng đường cong thể hiện sự đáp ứng của cá ngựa vằn đối với các nồng độ thí nghiệm và tính toán các chỉ số độc học như giá trị LC_{50} (Nồng độ gây chết 50% - Median lethal concentration) hoặc giá trị EC_{50} (Nồng độ hiệu quả 50% - Median effective concentration). Những nghiên cứu sàng lọc di truyền quy mô lớn đã làm sáng tỏ một sự tương đồng đáng kể giữa các đột biến gene ở cá ngựa vằn và các bệnh di truyền ở con người. Điều này đã góp phần tạo ra một môi trường nghiên cứu phong phú và tiềm năng, trong đó cá ngựa vằn không chỉ là một loài động vật thủy sinh quan trọng mà còn là một mô hình hữu ích để hiểu rõ hơn về bệnh lý di truyền. Ví dụ, những nghiên cứu đã phát hiện ra rằng một số đột biến gene ở cá ngựa vằn tương đồng hoặc gây ra các biểu hiện giống nhau với các bệnh lý tế bào trong người. Trong trường hợp của đột biến "sapie", ví dụ, sự suy yếu của gen dystrophin ở cá ngựa vằn tương đương với gen bị ảnh hưởng trong hội chứng loạn dưỡng cơ Duchenne ở con người. Điều này cho thấy mối quan hệ chặt chẽ giữa các cơ chế bệnh lý ở cá và người, mở ra cơ hội mới trong việc sử dụng cá ngựa vằn làm một mô hình để nghiên cứu và phát triển các phương pháp điều trị tiềm năng cho các bệnh di truyền. Sự hiểu biết sâu sắc về các đối tượng nghiên cứu như cá ngựa vằn không chỉ giúp mở rộng kiến thức về sinh học phát triển mà còn mang lại hy vọng trong việc tìm ra các giải pháp mới cho những vấn đề sức khỏe con người. Đồng thời, sự tương đồng giữa các cơ chế bệnh lý ở cá và người cũng có thể dẫn đến những cơ hội hợp tác quốc tế trong lĩnh vực nghiên cứu y học, từ đó nâng cao hiểu biết và cải thiện sức khỏe của cả hai loài [41].

Khi tiếp xúc với cùng một 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, một loại hóa chất có thể gây ra hiện tượng cyclopia trên phôi cá ngựa vằn. Cyclopia là hiện tượng mắt hình thành gần nhau hoặc liền kề nhau trên ấu trùng cá ngựa vằn khi tiếp xúc 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 [42]. 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.

Nghiên cứu của Lammer và đồng nghiệp (2009) đã sử dụng độc tố thủy sinh nhằm so sánh với kết quả từ các nghiên cứu trên các mô hình phôi của các loài cá khác nhau [43]. Kết quả phân tích chỉ ra rằng mô hình phôi cá ngựa vằn có độ tương đồng cao với mô hình thí nghiệm trên cá ngựa vằn trưởng thành, cũng như với các loài cá nói chung. Điều này cũng chứng tỏ rằng phôi cá ngựa vằn là một 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 của phôi, từ khoảng 30-36 giờ sau thụ tinh, tim của phôi bắt đầu đập những nhịp đầu tiên. Sau đó, hoạt động của tim diễn ra dần đều và theo một chu kỳ rõ ràng hơn. Việc tiếp xúc với hóa chất cũng có thể ảnh hưởng đến chức năng của tim, và điều này thường được biểu hiện thông qua số nhịp tim trong một phút. Nhịp tim cũng là một trong những tiêu chí quan trọng để đánh giá ảnh hưởng chức năng tim, cũng như trong các nghiên cứu sàng lọc thuốc trên cá ngựa vằn [44]. 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 [44].

Để nghiên cứu sự ảnh hưởng của hóa chất đến hệ vận động và thần kinh cũng như biểu hiện hành vi của cá, việc sử dụng các tiêu chí đa dạng là rất quan trọng. Các thử nghiệm chức năng cơ quan và hệ cơ quan, như đánh giá sự hoạt động của các cơ quan như tim, gan, thận, cũng như sự phản ứng của hệ thần kinh, có thể cung cấp thông tin cụ thể về tác động của hóa chất đến các hệ cơ thể của cá. Đặc biệt, việc theo dõi biểu hiện hành vi của cá sau khi tiếp xúc với hóa chất có thể giúp phát hiện các thay đổi trong hành vi tự nhiên, như thay đổi trong cách di chuyển, sự tương tác với môi trường xung quanh và hành vi săn mồi hoặc tránh né. Ngoài ra, để hiểu rõ hơn về cơ chế ảnh hưởng của hóa chất lên cấu trúc và chức năng của cơ thể, các phương pháp phân tích gene và protein cũng được sử dụng. Sự biểu hiện của gen và protein có thể được đánh giá thông qua các phương pháp như RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) để xác định mức độ biểu hiện của gen sau khi phơi nhiễm với hóa chất. Ngoài ra, việc sử dụng phương pháp lai tại chỗ (in situ hybridization) có thể giúp xác định vị trí và mức độ biểu hiện của gen trong mẫu cá. Đối với các nghiên cứu tiên tiến hơn, việc chuyển gen bằng các công cụ hướng đích

như Zinc-finger có thể được áp dụng để thay đổi mức độ biểu hiện của các gen cụ thể và nghiên cứu về các cơ chế phản ứng của cá khi tiếp xúc với hóa chất. Các phương pháp này không chỉ giúp hiểu rõ hơn về tác động của hóa chất lên cơ thể của cá mà còn có thể mở ra cơ hội cho việc phát triển các phương pháp chẩn đoán và điều trị trong lĩnh vực y học và bảo vệ môi trường [45]. Crispr cũng có thể được sử dụng trên mô hình phôi của cá ngựa vằn để nghiên cứu các thay đổi di truyền và liên quan đến bệnh ung thư [46]. Hơn nữa, các quá trình sinh học như sự saponis hóa, lưu thông máu trong mạch, và sự hình thành xương trên phôi của ấu thể cá cũng được nghiên cứu thông qua việc sử dụng các thuốc nhuộm đặc hiệu để nhuộm mẫu.

Ở Việt Nam, cá ngựa vằn cũng là mô hình nghiên cứu được nhiều nhà khoa học sử dụng để đánh giá độc tính, thử nghiệm thuốc trong y khoa. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thương Huyền và cộng sự (2012) đã đánh giá tác động cadmium (Cd) lên quá trình phát triển phôi cá ngựa vằn [47]. Nghiên cứu này đã sử dụng một loạt các nồng độ Cd khác nhau để đánh giá tác động của kim loại này thông qua việc theo dõi chức năng tim và nhịp quây mình của cá ngựa vằn ở các giai đoạn phát triển khác nhau. Các nồng độ được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: 0,1 $\mu\text{g/L}$; 1 $\mu\text{g/L}$; 5 $\mu\text{g/L}$; 10 $\mu\text{g/L}$; 20 $\mu\text{g/L}$; 50 $\mu\text{g/L}$ và 100 $\mu\text{g/L}$. Kết quả nghiên cứu này cho thấy các nồng độ này vẫn chưa đủ để gây chết phôi cá ngựa vằn. Tuy nhiên, nghiên cứu đã chỉ ra rằng Cd có tác động đến sự phát triển của phôi cá ngựa vằn bằng cách tăng nhịp tim và đồng thời làm giảm nhịp quây mình [47].

Kết quả nghiên cứu của Trần Thị Phương Dung và cộng sự (2014) cho thấy các nồng độ Pb được khảo sát trong nghiên cứu này chưa đạt ngưỡng gây chết (LD_{50}) cho phôi cá ngựa vằn [48]. Tỷ lệ sống của phôi vẫn còn cao nằm trong khoảng 88,28 đến 92,81%. Tuy tỷ lệ sống vẫn cao, nhưng điều quan trọng là nghiên cứu đã xác định được Pb có tác động đến quá trình phát triển của phôi cá ngựa vằn. Tại các nồng độ chì khảo sát, nhịp tim tăng tuyến tính theo thứ tự các nồng độ khảo sát, trong khi nhịp quây mình và tỉ lệ nở giảm.

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thương Huyền và cộng sự (2016) đã tiến hành đánh giá ảnh hưởng của kẽm lên sự sống cá ngựa vằn giai đoạn ấu trùng (1 - 7 ngày tuổi) [49]. Trong nghiên cứu này, phôi cá ngựa vằn mới thụ tinh đã được tiếp xúc với dung dịch muối kẽm ở mức độ khác nhau, từ 1 đến 10 mg/L , cùng với một nhóm đối chứng không chứa kẽm (0 mg/L), trong môi trường nước máy. Sau khi nở, các ấu

trùng được chăm sóc trong môi trường với các nồng độ kẽm tương ứng. Kết quả cho thấy rằng nồng độ 1 mg/L là ngưỡng tác động đến tỉ lệ sống của ấu trùng. Nghiên cứu đã xây dựng một phương trình dự đoán tỉ lệ sống của ấu trùng cá ngựa vằn dựa trên tương tác giữa nồng độ kẽm và thời gian nuôi, cũng như xác định giá trị LCt50 - nồng độ gây tử vong cho 50% ấu trùng từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7. Ngoài ra, những biểu hiện như nhịp tim và kích thước của ấu trùng cá ngựa vằn đã giảm tuyến tính theo sự tăng của nồng độ kẽm và thời gian nuôi.

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thương Huyền và cộng sự (2018) đã đánh giá được sự ảnh hưởng của asen lên sự phát triển phôi cá ngựa vằn (*Danio rerio*) [50]. Nhóm nghiên cứu đã thực hiện một thử nghiệm để đánh giá tác động của asen (As) lên quá trình phát triển của phôi cá ngựa vằn ở các giai đoạn khác nhau, bao gồm phân cắt, phôi nang, phôi vị, phôi đốt, hình thành hầu họng và giai đoạn nở (thoát nang). Phôi cá ngựa vằn mới thụ tinh đã được tiếp xúc với As ở 9 nồng độ khác nhau (từ 20 µg/L đến 260 µg/L) và một nhóm đối chứng không chứa As (0 µg/L), trong môi trường Hank's phôi. Kết quả cho thấy rằng tỷ lệ sống của phôi giảm theo sự tăng dần của nồng độ As và giai đoạn phát triển của phôi. Tuy nhiên, ở các nồng độ As được khảo sát, chưa có nồng độ nào đạt ngưỡng gây chết LCt50 của phôi cá ngựa vằn. Ở các nồng độ As khảo sát, tần số nhịp tim tăng theo thứ tự các nồng độ, với mức cao nhất được ghi nhận tại nồng độ 260 µg/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 cũng làm giảm tần suất quẫy mình của mỗi giai đoạn theo sự tăng dần của nồng độ, với mức thấp nhất ghi nhận được ở giai đoạn hầu họng ($2,53$ nhịp/phút so với $5,50$ nhịp/phút ở lô đối chứng, $p < 0,05$). Đồng thời, As cũng làm chậm và giảm tỷ lệ nở của phôi, với tỷ lệ nở chỉ còn 77,78% ở nồng độ 260 µg/L so với 98,86% ở lô đối chứng, sau 72 giờ thụ tinh ($p < 0,05$).

Trong nghiên cứu của Ngô Văn Tuấn (2023) đã đánh giá được sự ảnh hưởng của các nồng độ Chì khác nhau, bao gồm nồng độ 0,1µg/L, 1µg/L, 10µg/L, 20µg/L và 100µg/L lên quá trình phát triển của cá ngựa vằn ở giai đoạn 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 168 giờ đồng thời xác định hàm lượng Chì tích tụ trong nội quan cá và ảnh hưởng của Chì lên cấu trúc mô ruột, mô buồng trứng và sự thay đổi biểu hiện các gene *gadd45a*, *gadd45g*, *sod1*, *sod2* và *mt2* [51]. Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các nồng độ Chì đều ảnh hưởng đến sự phát triển của cá ngựa vằn: tỷ lệ sống và nhịp

tim. Hàm lượng Chì tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn có xu hướng tăng dần theo nồng độ tăng đồng thời gây tổn thương cho cấu trúc nội quan: mô ruột và mô buồng trứng. Đặc biệt là, mức độ biểu hiện của các gene có sự thay đổi sai lệch trong quá trình tiếp xúc với các nồng độ Chì. 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 [52]. 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.

Từ các nghiên cứu trên thế giới và tại Việt Nam nhiều tác giả đã đánh giá tác động của kim loại nặng như Chì, Kẽm, Asen, Cadmium, Crom lên sự phát triển của phôi cá ngựa vằn ở nhiều dãy nồng độ khác nhau. 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 để xác định tỷ lệ sống, khả năng tích tụ kim loại, sự ảnh hưởng đến nhịp tim, chiều dài, cấu trúc mô ruột, mô gan và buồng trứng, ảnh hưởng đến sự biểu hiện các gene liên quan đến quá trình apoptosis và kháng oxy hóa trên cá ngựa vằn (*Danio rerio*). Do đó, tác giả đã tiến hành thử nghiệm để đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) với các nồng độ khác nhau (0,1; 1; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 và 100 $\mu\text{g/L}$) trong quá trình phát triển của cá ngựa vằn, đồng thời sử dụng nước không chứa Crom (VI) làm đối chứng. Để có được cái nhìn rõ hơn về ảnh hưởng của Crom (VI) lên cá ngựa vằn cần có nghiên cứu về tác động của nó lên tất cả các quá trình phát triển từ phôi cho đến cá trưởng thành như: tỷ lệ sống, nhịp tim, chiều dài cơ thể, tích tụ, cấu trúc mô ruột, mô gan và mô buồng trứng, sự thay đổi biểu hiện các gene liên quan đến quá trình apoptosis và kháng oxy hóa. Từ đó rút ra ảnh hưởng của Crom (VI) lên cơ thể con người.

1.4. Các gene liên quan đến quá trình apoptosis và kháng oxy hóa

Apoptosis còn được gọi là sự chết tế bào theo chương trình diễn ra tự nhiên trong cơ thể. Thuật ngữ apoptosis lần đầu tiên được Kerr và cộng sự (1972) sử dụng để mô tả sự co rút tế bào, chảy máu màng, ngưng tụ hạt nhân và phân mảnh hạt nhân hiện được công nhận rộng rãi là dấu hiệu đặc trưng của cái chết tế bào apoptotic [53].

Apoptosis là một phần quan trọng trong sự phát triển bình thường của nhiều hệ thống cơ quan và mô. Để duy trì sự phát triển bình thường của cơ thể, quá trình apoptosis được kích hoạt để loại bỏ các tế bào hư hỏng, rối loạn chức năng, không cần thiết và thay thế bằng các tế bào mới khỏe mạnh. Apoptosis cũng được kích hoạt để bảo vệ các phản ứng miễn dịch hoặc các tế bào bị tổn thương do tiếp xúc với các chất độc hại, virus hoặc các bệnh xâm nhập cơ thể [54].

Gene *gadd45a* (*Growth Arrest and DNA Damage 45 Alpha*) là một gene quan trọng trong quá trình ứng phó với tổn thương DNA và kiểm soát sự phát triển của tế bào. Gene này thường được kích hoạt bởi các loại tổn thương gây ra cho DNA, bao gồm tia cực tím, hóa chất độc hại và stress oxi hóa. Nhiệm vụ chính của gene *gadd45a* là sửa chữa DNA. Khi DNA của tế bào bị tổn thương, gene *gadd45a* hoạt động bằng cách kích hoạt các protein và enzym tham gia vào quá trình sửa chữa DNA. Điều này giúp duy trì tính toàn vẹn của genôm và ngăn chặn sự phát triển của tế bào bất thường. Ngoài việc sửa chữa DNA, gene *gadd45a* còn có khả năng kiểm soát sự phát triển của tế bào. Khi DNA không thể được sửa chữa, nó có thể kích hoạt quá trình trì hoãn hoặc quá trình apoptosis của tế bào để ngăn chặn sự phát triển của chúng. Một tác động quan trọng khác của gene *gadd45a* là điều chỉnh sự biểu hiện của các gene khác. Gene này có thể ảnh hưởng đến việc hoạt động của nhiều gene khác trong tế bào, đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh các phản ứng tế bào và sự đáp ứng của tế bào đối với các tác nhân gây tổn thương. Sự sao chép gây tổn thương DNA của gene này được trung gian bởi cơ chế phụ thuộc *p53*. Protein được mã hóa bởi gene này phản ứng với các căng thẳng môi trường bằng cách trung gian kích hoạt con đường P38/JNK thông qua MTK1/MEKK4 Kinase [55]. Thực tế là sự biểu hiện của gene 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 [56]. *Gadd45a* (Bất giữ tăng trưởng và tổn thương DNA gây tổn thương Alpha) là một gene 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 gene này là *gadd45g*.

Gene *gadd45g* (*Growth Arrest and DNA Damage 45 Gamma*) là thành viên của một nhóm các gene *gadd45*, có vai trò qua trọng trong quá trình kiểm soát tổn thương của DNA và kiểm soát sự phát triển của tế bào. Gene *gadd45g* thường được kích hoạt bởi các tác nhân gây tổn thương DNA như tia cực tím, hóa chất độc hại và stress oxy hóa. Tương tự như gene *gadd45a*, gene *gadd45g* kích hoạt các protein và enzym cần thiết thực hiện quá trình sửa chữa DNA để giúp duy trì tính bảo tồn của genom và ngăn chặn sự phát triển của tế bào bất thường. Gene *gadd45g* tham gia vào nhiều quá trình khác nhau, bao gồm phát triển sinh dục và phát triển não đặc trưng của con người. Ngoài ra, gene này còn có vai trò trong ức chế khối u và phản ứng căng thẳng của tế bào [57]. Gene 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. Việc xóa một chất tăng cường gắn với gene *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. 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*. Gene *gadd45a* và *gadd45g* có liên quan đến tăng trưởng đầu khiếm khuyết, và trực ngắn hơn. *Gadd45a* và *gadd45g* 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 [58].

Sod (*Superoxide Dismutase*) là các enzyme quan trọng được tìm thấy trong tất cả các sinh vật sống sử dụng oxy. Chúng đóng vai trò quan trọng trong việc xúc tác quá trình biến đổi superoxide thành oxy và hydrogen peroxide [59]. Điều cần thiết là ngăn chặn việc tạo ra ROS (Reactive Oxygen Species) là một phần quan trọng để ngăn chặn sự tổng hợp ROS bởi các tế bào khỏe mạnh khi tiếp xúc với kim loại nặng [60]. Trong trường hợp phơi nhiễm kim loại nặng trong thời gian dài có thể gây ra stress oxy hóa, làm tăng quá trình tạo ra ROS và gây ra quá trình apoptosis của ấu trùng cá ngựa vằn [61]. Gene *sod1* (Superoxide Dismutase 1) mã hóa protein bởi gene này gắn với các ion Cu và Zn 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. Hydrogene 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 *bcl2*. *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 gene *sod1* ức chế apoptosis bằng cách tương tác với protein Bcl2 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 gene *sod1* làm giảm khối lượng kích thước cơ bắp, phát triển sớm đục thủy tinh thể, thoái hóa điểm vàng, xâm lấn tuyến ức, ung thư tế bào gan và rút ngắn tuổi thọ. Nghiên cứu cho thấy rằng mức biểu hiện Sod1 tăng có thể là một dấu ấn sinh học cho độc tính kim loại nặng [62]. Cá ngựa vằn trong giai đoạn đầu phát triển, sự hiện diện của gene *sod1* đột biến đã gây ứng chế tế bào thần kinh, kích thích các biểu hiện căng thẳng trên nó [63]. 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 gene *sod1* gây motoneuron tủy 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 tủy sống [64].

Gene *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. Gene 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 [65, 66]. 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 [66].

Gene *mt2* là một thành viên của họ gene metallothionein. Protein được mã hóa bởi họ gene 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 gene 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 gene này có liên quan đến tăng nguy cơ ung thư [67]. *Mt2a* (Metallothionein 2A) là một gene mã hóa protein. Các bệnh liên quan đến *mt2a* bao gồm Pthirus Pubis Infestation và chấy 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 gene 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 [68].

Các thành viên của họ *cdk* (*cyclin-dependent kinase*) đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh quá trình phân chia tế bào và điều chỉnh quá trình phiên mã, làm thay đổi quá trình tăng sinh tế bào và quá trình apoptosis [69, 70]. Cụ thể, *Cdk4* và *cdk6* kiểm soát quá trình phân chia tế bào bằng cách liên kết với *Cyclin D*. Những

thay đổi trong *cdk4* và *cdk6* có thể gây ra rối loạn trong điều hòa quá trình phân chia tế bào [71]. Việc giảm biểu hiện của *cdk4* và *cdk6* có thể dẫn đến việc kích hoạt quá trình apoptosis [70]. Nghiên cứu về các mức độ phiên mã liên quan đến quá trình apoptosis đã cho thấy việc kích hoạt quá trình apoptosis ở phôi cá ngựa vằn. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng các kim loại nặng tạo ra ROS có thể làm thay đổi các biểu hiện gene liên quan đến quá trình apoptosis [61, 72].

Caspase được coi là chỉ số của quá trình apoptosis do stress oxy hóa diễn ra trong phôi cá ngựa vằn, vì chúng là thành phần quan trọng của quá trình apoptosis. Trong đó, Caspase 3 là một trong những điểm hội tụ của nhiều con đường khác nhau điều chỉnh quá trình apoptosis [73]. Các thành viên thuộc nhóm *bcl2* đóng một vai trò quan trọng trong việc làm trung gian cho sự cân bằng giữa quá trình apoptosis và sự sống sót trong các tế bào nhân chuẩn [74]. Sự rối loạn của con đường truyền tín hiệu này có thể gây ra nhiều bệnh liên quan đến rối loạn phát triển và thoái hóa [75].

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

Cá ngựa vằn nuôi tại Viện Sinh học nhiệt đới được sử dụng trong các thí nghiệm. Cá được duy trì trong chu kỳ sáng tối (14 giờ sáng và 10 giờ tối), nhiệt độ nước được duy trì ở mức $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Cá được cho ăn 2 lần/ngày bằng *artemia* vào buổi sáng và thức ăn viên công nghiệp vào buổi chiều.

Cá ngựa vằn trưởng thành có 05 sọc màu chạy dọc theo thân từ sau đầu đến cuối tia vây đuôi. Hình dáng cơ thể cá: cá đực thân mình mỏng trong khi đó cá cái có thân mình dày hơn, bụng phình to rõ rệt. Trên vây hậu môn có sọc rõ rệt, có 12-14 tia vây. Cá trưởng thành có chiều dài $3,82 \pm 0,08$ cm và $1,24 \pm 0,33$ g trọng lượng. Cá được nuôi trong bể thủy tinh, đáy bể được trải bi thủy tinh. Nước trong bể duy trì ở mức 2/3 bể.

Trong quá trình phát triển của cá ngựa vằn được phân chia gồm các giai đoạn: Giai đoạn phôi, giai đoạn ấu trùng và giai đoạn trưởng thành có sức sống tốt, được sử dụng cho các thí nghiệm.

2.1.2. Thiết bị và dụng cụ cần thiết

Thiết bị và dụng cụ sử dụng trong đề tài được liệt kê ở Bảng 2.1 và Bảng 2.2.

Bảng 2.1. Một số thiết bị chính sử dụng trong đề tài

| STT | Tên thiết bị | Hãng sản xuất | Nước sản xuất |
|-----|---|-------------------|---------------|
| 1 | Tủ -20°C và -80°C | Panasonic | Nhật |
| 2 | Máy PCR | Agilent | Mỹ |
| 3 | Máy Realtime PCR Piko Thermo | Thermo Scientific | Mỹ |
| 4 | Cân kỹ thuật | Ohaus | Mỹ |
| 5 | Máy đo pH | Milwaukee | Mỹ |
| 6 | Máy ly tâm | Hettich | Đức |
| 7 | Máy Vortex | Labnet | Đức |
| 8 | Hệ thống điện di Western blot | GE Healthcare | Mỹ |
| 9 | Tủ lạnh | Sanyo | Nhật |
| 10 | Kính hiển vi | Meiji | Nhật |
| 11 | Bể điều nhiệt | Memmert | Đức |

Bảng 2.2. Một số dụng cụ chính sử dụng trong đề tài

| STT | Tên thiết bị | Hãng sản xuất | Nước sản xuất |
|-----|---|---------------|---------------|
| 1 | Eppendorf (1500 và 2000 μ l) | Eppendorf | Đức |
| 2 | Đầu tip 20 μ l, 100 μ l, 1000 μ l) | Eppendorf | Đức |
| 3 | Ống ly tâm 15 ml | Corning | Hoa Kỳ |
| 4 | Micropipette (5-50 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l) | Nychiro | Nhật |
| 5 | Bình tam giác thủy tinh erlen (50ml, 100ml) | Duran | Đức |
| 6 | Đĩa petri thủy tinh (40x12mm, 60x15mm, 80x15mm, 100x10mm) | Duran | Đức |
| 7 | Beaker (50 ml, 100 ml) | Schott | Đức |
| 8 | Erlen (100 ml, 250 ml) | Schott | Đức |
| 9 | Ống đông lạnh | Corning | Mỹ |
| 10 | Bình tam giác thủy tinh erlen (50ml, 100ml) | Duran | Đức |

2.1.3. Môi trường và hóa chất sử dụng

Hóa chất được sử dụng trong đề tài được liệt kê ở Bảng 2.3

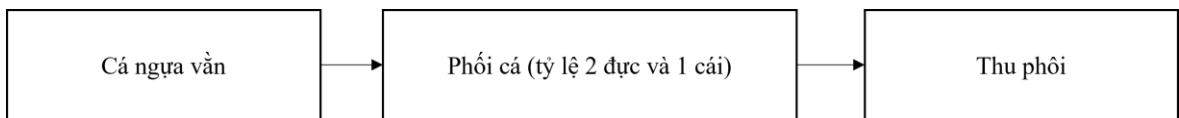
Bảng 2.3. Hóa chất sử dụng trong đề tài

| STT | Tên thiết bị | Hãng sản xuất | Nước sản xuất |
|-----|--------------------------------------|-------------------|---------------|
| 1 | Cồn | Merk | Đức |
| 2 | 2x qPCR SyGreen 1-Step Go Hi-ROX kit | PCRBiosystem | Anh |
| 3 | CL-XPosure Film | Thermo Scientific | Mỹ |
| 4 | Precast Gel SDS-PAGE 4-12 % | Abcam | Mỹ |
| 5 | ECL Western Blotting Substrate Kit | Abcam | Mỹ |
| 6 | Màng PVDF | Abcam | Mỹ |
| 7 | AUTOMATIC X-RAY kit | Fujifilm | Nhật Bản |

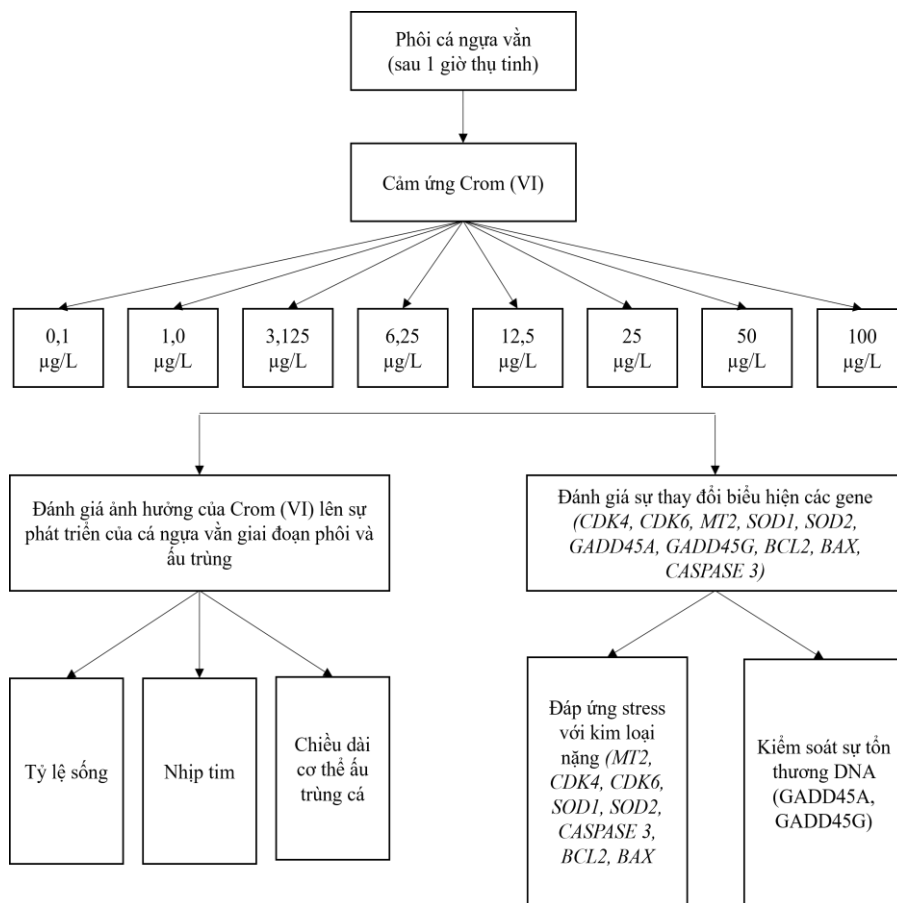
| STT | Tên thiết bị | Hãng sản xuất | Nước sản xuất |
|-----|---------------------------------|---------------|---------------|
| 8 | Giấy lọc Extra Thick Blot Paper | Bio-Rad | Mỹ |
| 9 | Blocking Buffer | Abcam | Mỹ |
| 10 | Kháng thể Western Blot | Abcam | Mỹ |
| 11 | Optiblot LDS Sample Buffer | Abcam | Mỹ |
| 12 | Optiblot SDS Run Buffer | Abcam | Mỹ |
| 13 | Potassium Dichromate | Merk | Đức |

2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

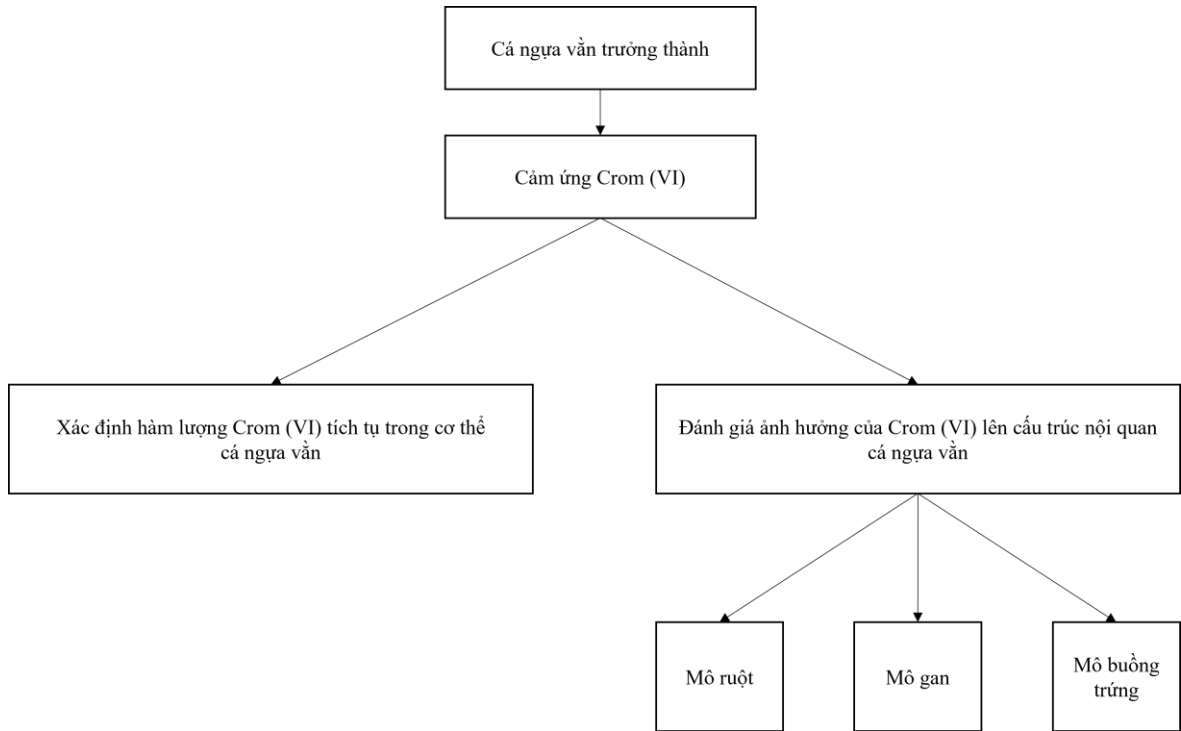
Sơ đồ tóm các nội dung nghiên cứu của đề tài trong Hình 2.1, Hình 2.2, Hình 2.3.



Hình 2.1. Sơ đồ tóm tắt quá trình phối và thu phôi cá ngựa vằn



Hình 2.2. Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu phôi và ấu trùng cá ngựa vằn



Hình 2.3. Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu cá ngựa vằn trưởng thành

2.2.1. Định danh cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

2.2.1.1. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái

Trong nghiên cứu này, sử dụng phương pháp quan sát ghi nhận số liệu trong nghiên cứu kết hợp với phương pháp so sánh, đối chiếu với các tài liệu đã công bố. Dụng cụ và thiết bị hỗ trợ: Máy ảnh, thước đo (10cm).

2.2.1.2. Phương pháp sinh học phân tử

Sau khi các đặc điểm hình thái được ghi nhận, mẫu cá ngựa vằn được cắt và chuyển vào ống eppendorf bổ sung 20 μL dung dịch đệm Worm Lysis Buffer và 0,45% Tween 20. Tách chiết DNA tổng số, sử dụng 1 μL protein K thêm vào ống chứa mẫu cá với dung dịch đệm, ủ 60 phút ở nhiệt độ 70°C. Mẫu sau đó được ly tâm 10,000 vòng trong 1 phút.

Khuếch đại DNA bằng kỹ thuật PCR: MyTaq Mix (BIO-25041, Đức) được sử dụng để khuếch đại trình tự mục tiêu, PCR được thực hiện, trong thể tích ống MIX chứa 25 μL gồm 2,5 μL Master MIX, 1 μL mẫu DNA, 1 μL Primer, 20,5 μL nước cất. Mỗi khuếch đại Cytochrome b và Cytochrome c được liệt kê trong Bảng 2.4. PCR được thực hiện, chu trình nhiệt của PCR đối với hai cặp mồi Cytochrome b và Cytochrome c (Bảng 2.5). Sau khi chạy PCR, điện di sản phẩm PCR được thực hiện trên gel agarose 1%. Tất cả các sản phẩm PCR đều được chuẩn bị kỹ lưỡng, dán nhãn

và đóng gói cẩn thận để ngăn ngừa mẫu bị nhiễm trước khi gửi đến công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa để giải trình tự.

Phân tích trình tự gene được thực hiện thông qua các trình tự phân tích từ kết quả giải trình tự gene được so sánh với các nhóm trình tự gene khác lấy từ Genbank, sử dụng phần mềm MEGA v11.0.13. Để xác minh tính chính xác của các chuỗi trình tự thu được, các cây phả hệ được xây dựng bằng cách sử dụng phần mềm MEGA v11.0.13 và áp dụng phương pháp Neighbour-joining tree (NJ) cùng với mô hình khoảng cách so sánh từng đôi một (pairwise distance). Bootstrap 1000 được sử dụng để đánh giá độ tin cậy của sự phân nhánh trên các cây phả hệ NJ. Để đánh giá mức độ tương đồng giữa trình tự gene Cytochrome b và Cytochrome c của cá ngựa vằn (*Danio rerio*) trong nghiên cứu này được so sánh với các nhóm cá khác (Bảng 2.6) được thực hiện bằng phương pháp BLAST. Phương pháp này giúp xác định sự tương đồng hoặc độ khác biệt giữa trình tự gene của cá ngựa vằn (*Danio rerio*) và các nhóm cá khác trên Genbank.

Bảng 2.4. Thông tin các cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu

| | Primer | Trình tự mồi (5'-3') | Nguồn |
|--------------|---------------|-----------------------------|--------------|
| Cytochrome b | LA-danio | GACTYGAARAACCACYGTTG | [76] |
| | HA-danio | CTCCGATCTTCGGATTACAAG | |
| COI | LCO1490 | GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG | [76] |
| | HCO2198 | TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA | |

Bảng 2.5. Chu trình nhiệt

| Phản ứng | Nhiệt độ | Thời gian |
|-----------------|-----------------|------------------|
| Tách mạch | 95°C | 1 phút |
| 40 chu kì | 95°C | 15 giây |
| | 60°C | 30 giây |
| | 72°C | 30 giây |
| Trữ mẫu | 4°C | 30 phút |

Bảng 2.6. Các loài Cypriniformes trên ngân hàng GenBank

| Stt | Phân loại | COI | Cyt b |
|-----|-------------------------------------|----------|----------|
| 1 | <i>Crossostoma lacustre</i> | NC001727 | NC001727 |
| 2 | <i>Lefua echigonia</i> | NC004696 | NC004696 |
| 3 | <i>Carpiodes carpio</i> | NC005257 | NC005257 |
| 4 | <i>Myxocyprinus asiaticus</i> | NC006401 | NC006401 |
| 5 | <i>Cobitis sinensis</i> | NC007229 | NC007229 |
| 6 | <i>Cobitis striata</i> | NC004695 | NC004695 |
| 7 | <i>Carassius auratus</i> | NC006580 | NC006580 |
| 8 | <i>Carassius carassius</i> | NC006291 | NC006291 |
| 9 | <i>Cyprinus carpio</i> | NC001606 | NC001606 |
| 10 | <i>Sawbwa resplendens</i> | EF452895 | N/A |
| 11 | <i>Sarcocheilichthys variegatus</i> | NC004694 | NC004694 |
| 12 | <i>Campostoma anomalum</i> | EF452850 | AF452079 |
| 13 | <i>Hemitremia flammea</i> | EF452851 | AY281054 |
| 14 | <i>Luxilus chrysocephalus</i> | EF452852 | AF117167 |
| 15 | <i>Nocomis biguttatus</i> | EF452853 | AY486057 |
| 16 | <i>Notemigonus crysoleucas</i> | EF452854 | U01318 |
| 17 | <i>Notropis atherinoides</i> | EF452855 | AY281062 |
| 18 | <i>Opsopoeodus emiliae</i> | EF452856 | U17270 |
| 19 | <i>Phoxinus erythrogaster</i> | EF452857 | AY281055 |
| 20 | <i>Richardsonius balteatus</i> | EF452858 | AY096011 |
| 21 | <i>Boraras maculatus</i> | EF452859 | N/A |
| 22 | Boraras merah | EF452884 | N/A |
| 23 | Boraras sp. cf. micros | EF452885 | N/A |
| 24 | <i>Boraras urophthalmoides</i> | EF452886 | N/A |
| 25 | <i>Chela cachius</i> | EF452891 | EF452745 |
| 26 | <i>Chela dadiburjori</i> | EF452892 | EF452746 |
| 27 | <i>Danio choprai</i> | EF452879 | EF452740 |
| 28 | <i>Danio erythromicron</i> | EF452867 | EF452737 |
| 29 | <i>Danio feegradei</i> | EF452861 | EF452732 |

| Stt | Phân loại | COI | Cyt b |
|------------|---|------------|--------------|
| 30 | <i>Danio kyathit</i> | EF452862 | EF452733 |
| 31 | <i>Danio nigrofasciatus</i> | EF452863 | N/A |
| 32 | <i>Danio</i> sp. “hikari” | EF452860 | EF452731 |
| 33 | <i>Danio</i> sp. “panther” | EF452864 | EF452734 |
| 34 | <i>Danio rerio</i> | NC002333 | NC002333 |
| 35 | <i>Danio roseus</i> | EF452865 | EF452735 |
| 36 | <i>Danionella</i> sp. | EF452887 | EF452741 |
| 37 | <i>Devario devario</i> | EF452866 | EF452736 |
| 38 | <i>Esomus</i> sp. cf. <i>ahli</i> | EF452888 | EF452742 |
| 39 | <i>Inlecypris auropurpurea</i> | EF452889 | EF452743 |
| 40 | <i>Microrasbora kubotai</i> | EF452868 | EF452738 |
| 41 | <i>Microrasbora rubescens</i> | EF452890 | EF452744 |
| 42 | <i>Opsaridium</i> sp. | EF452893 | EF452747 |
| 43 | <i>Opsariichthys uncirostris</i> | EF452894 | EF452748 |
| 44 | <i>Rasbora argyrotaenia</i> | EF452880 | N/A |
| 45 | <i>Rasbora brittani</i> | EF452869 | N/A |
| 46 | <i>Rasbora caudimaculata</i> | EF452870 | N/A |
| 47 | <i>Rasbora cephalotaenia</i> | EF452881 | N/A |
| 48 | <i>Rasbora daniconius</i> | EF452872 | N/A |
| 49 | <i>Rasbora dorsiocellata</i> | EF452873 | N/A |
| 50 | <i>Rasbora rubrodorsalis</i> | EF452874 | N/A |
| 51 | <i>Rasbora</i> sp. cf. <i>bankanensis</i> | EF452871 | N/A |
| 52 | <i>Rasbora sumatrana</i> | EF452882 | N/A |
| 53 | <i>Rasbora trilineata</i> | EF452883 | N/A |
| 54 | <i>Rasbora vaterifloris</i> | EF452876 | N/A |
| 55 | <i>Rasbora vulcanus</i> | EF452875 | N/A |
| 56 | <i>Sundadanio axelrodi</i> | N/A | EF452739 |
| 57 | <i>Trigonostigma espei</i> | EF452877 | N/A |
| 58 | <i>Trigonostigma hengeli</i> | EF452878 | N/A |
| 59 | <i>Zacco platypus</i> | EF452896 | EF452749 |

| Stt | Phân loại | COI | Cyt b |
|-----|------------------|----------|----------|
| 60 | Zacco temminckii | EF452897 | EF452750 |

2.2.2. Phương pháp nuôi, phối và thu phôi cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

2.2.2.1. Chuẩn bị môi trường nuôi phôi 1x E3

Môi trường 1x E3 được dùng để nuôi phôi và ấu trùng cá ngựa vằn [77].

Để pha dung dịch gốc 60x E3, cần hòa tan 34,8g NaCl; 1,6g KCl; 5,8g CaCl₂.2H₂O; 9,78g MgCl₂.6H₂O trong 1950mL H₂O. Điều chỉnh pH đến 7,2 bằng NaOH và HCl. Sau đó thêm H₂O để thể tích dung dịch bằng 2000mL. Nước sử dụng để pha môi trường nuôi phôi và ấu trùng cá ngựa vằn được sử dụng từ nguồn nước cất không chứa Crom và nước máy theo tiêu chuẩn của Bộ Y tế QCVN01: 2009/BYT.

Để pha môi trường nuôi phôi 1x E3, pha loãng 16,5 mL dung dịch 60x E3 trong 1000mL H₂O. Thêm 100μL Metylen Blue 1%.

2.2.2.2. Phối cá

Nuôi riêng cá ngựa vằn đực và cái để tối ưu hóa khả năng sinh sản. Tạo bể phối cá hình chữ nhật có thể tích là 1000mL nước được trải bi thủy tinh làm giá đỡ cho phôi lắng xuống đáy hộp ngăn chặn cá ăn phôi sau khi phối. Đổ nước đã được xử lý vào 2/3 bể. Cho cá đực và cá cái theo tỉ lệ 1 cá đực và 2 cá cái. Tắt đèn phòng tối để tạo chu kỳ sáng tối cho cá (14 giờ sáng và 10 giờ tối). Để thu phôi theo thời gian mong muốn, cần tạo vách ngăn bằng tấm nhựa trong để tách cá đực và cá cái. Loại bỏ vách ngăn này vào buổi sáng để cá đực và cá cái có thời gian tiếp xúc với nhau thụ tinh và đẻ trứng. Sau 30 phút loại bỏ vách ngăn, kiểm tra sơ bộ bằng cách quan sát dưới đáy hộp để chắc chắn có phôi. Khi đã chắc chắn có phôi, tiến hành tách cá đực, cái ra riêng và tiến hành thu phôi.

2.2.2.3. Thu phôi

Sau khi cá đực và cá cái được cách ly tiến hành sử dụng một ống cao su nhỏ thông hai đầu và chứa đầy nước. Một đầu ống ra soát mặt đáy của bể để hút phôi ra, đầu kia cho vào một cốc thủy tinh 500mL mới để đựng phôi. Khi đó, phôi sẽ theo đường ống chảy vào cốc thủy tinh.

Để lắng khoảng 2 – 3 phút, sau đó dùng ống hút chuyên dụng để chia phần nước chứa phôi vào các đĩa petri đường kính 100mm (100-150 phôi/đĩa). Loại bỏ nước còn lại trong đĩa petri và đồng thời thêm môi trường 1x E3 để rửa phôi. Lặp lại

2 đến 3 lần để loại bỏ các phôi bị hư, cặn và phân cá. Cuối cùng là thêm lại môi trường 1x E3 để nuôi phôi.

2.2.3. Môi trường Crom (VI)

Potassium Dichromate ($K_2Cr_2O_7$, độ tinh khiết N 99%) được mua từ hãng Merc của Đức. Để chuẩn bị dung dịch gốc có nồng độ 1000 $\mu\text{g/L}$ được điều chế bằng cách pha Potassium Dichromate với dung dịch 1xE3 được pha ở nội dung 2.2.2.1, sau đó pha loãng dung dịch gốc về các nồng độ: 0,1 $\mu\text{g/L}$; 1 $\mu\text{g/L}$; 3,125 $\mu\text{g/L}$; 6,25 $\mu\text{g/L}$; 12,5 $\mu\text{g/L}$; 25 $\mu\text{g/L}$; 50 $\mu\text{g/L}$ và 100 $\mu\text{g/L}$ để sử dụng cho các nội dung thí nghiệm.

2.2.4. Đánh giá sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

2.2.4.1. Xác định sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

Trong thí nghiệm này, để đánh giá sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn tác giả đã bố trí thí nghiệm như sau:

Phôi cá ngựa vằn sau một giờ thụ tinh được xử lý bằng dung dịch chứa Crom (VI) ở các nồng độ lần lượt là: 0,1 $\mu\text{g/L}$; 1 $\mu\text{g/L}$; 3,125 $\mu\text{g/L}$; 6,25 $\mu\text{g/L}$; 12,5 $\mu\text{g/L}$; 25 $\mu\text{g/L}$; 50 $\mu\text{g/L}$; 100 $\mu\text{g/L}$ và môi trường 1x E3 làm đối chứng. Ở mỗi nồng độ, nuôi 50 phôi trong đĩa Petri 100mm. Mỗi nồng độ thử nghiệm đã được thực hiện ba lần để đảm bảo tính chính xác và độ tin cậy của kết quả. Cách 24 giờ thay môi trường một lần, các phôi chết được loại bỏ để không làm ảnh hưởng đến các phôi sống còn lại.

Kính hiển vi soi nổi được sử dụng để quan sát và ghi nhận số phôi và ấu trùng chết, phôi nở, phôi và ấu trùng phát triển bất thường. Số liệu ở ngày thứ 1, ngày thứ 2, ngày thứ 3, ngày thứ 4, ngày thứ 5, ngày thứ 6 và ngày thứ 7 được ghi nhận. Dựa vào số liệu đã ghi nhận ở các nồng độ so sánh với nhóm đối chứng để tính tỷ lệ phôi và ấu trùng sống sót ở các nồng độ Crom (VI).

Chỉ tiêu đánh giá: Tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng ở các nồng độ Crom (VI) so với nhóm đối chứng.

2.2.4.2. Xác định sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên nhịp tim của ấu trùng cá ngựa vằn

Ở ngày thứ 3, cấu trúc tim được hoàn thiện, phôi nở thành ấu trùng và được đưa về nhiệt độ phòng để ổn định trong 30 phút. Mỗi nồng độ chọn 10 ấu trùng ngẫu

nhiên và quan sát dưới kính hiển vi soi nổi để ghi nhận lại nhịp tim mỗi lần đếm nhịp tim trong 15 giây lặp lại 3 lần.

Số liệu ở ngày ngày thứ 3, ngày thứ 4, ngày thứ 5, ngày thứ 6 và ngày thứ 7 được ghi nhận. Dựa vào số liệu đã ghi nhận ở các nồng độ so sánh với nhóm đối chứng để phân tích mức độ ảnh hưởng của các nồng độ Crom (VI) lên nhịp tim ấu trùng cá ngựa vằn.

Chỉ tiêu đánh giá: Mức độ ảnh hưởng của các nồng độ Crom (VI) lên nhịp tim của ấu trùng cá ngựa vằn so với nhóm đối chứng.

2.2.4.3. *Xác định sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn*

Ở các ngày lần lượt là ngày thứ 3, ngày thứ 4, ngày thứ 5, ngày thứ 6 và ngày thứ 7, mỗi nồng độ chọn 10 ấu trùng cá ngẫu nhiên để đo chiều dài cơ thể. Sử dụng máy ảnh kỹ thuật số gắn trên kính hiển vi soi nổi, ấu trùng cá ngựa vằn được chụp hình sau khi điều chỉnh ấu trùng cá ngựa vằn nằm song song với thước kẻ. Phần mềm Image J 1.53c (Viện Y tế Quốc gia, Bethesda, MD, Hoa Kỳ) được sử dụng để đo chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn theo trục cơ thể. Để thiết lập thang đo, một đường thẳng được vẽ giữa hai điểm có khoảng cách đã biết của thước đo trên hình, sau đó tới phân tích và chọn đặt tỷ lệ trên phần mềm. Gỡ khoảng cách đã biết và đơn vị đo trong các ô thích hợp của cửa sổ Set Scal. Để đo chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn, một đường thẳng được vẽ dọc theo trục cơ thể sau đó vào phân tích và chọn đo để chuyển các giá trị sang cửa sổ dữ liệu. Những dữ liệu này được sử dụng để ước tính chiều dài cơ thể của ấu trùng cá ngựa vằn.

Dựa vào dữ liệu đã ghi nhận ở các nồng độ so sánh với nhóm đối chứng để phân tích mức độ ảnh hưởng của các nồng độ Crom (VI) lên chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn.

Chỉ tiêu đánh giá: Mức độ ảnh hưởng của các nồng độ Crom (VI) lên chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn so với nhóm đối chứng.

2.2.5. *Đánh giá sự thay đổi biểu hiện các gene đáp ứng và các gene kiểm soát tổn thương của cá ngựa vằn (Danio rerio) khi tiếp xúc với Crom (VI)*

Đánh giá biểu hiện mức phiên mã các gene

RNA tổng của cá ngựa vằn (*Danio rerio*) được tách bằng kit E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (R6834-02, Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA). Ống eppendorf chứa

phôi và ấu trùng cá ngựa vằn sau khi thu hoạch được giữ lạnh ở ni tơ lỏng và được bổ sung 350 μ L Lysis Buffer (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA, USA), hút lên xuống đều để ly giải mẫu. Cho 350 μ L ethanol 70% và ly tâm ở tốc độ tối đa 12,000 vòng/phút trong 5 phút. Dung dịch thu được sau khi ly giải được cho vào cột Minicolumn (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA, USA) có gắn màng lọc và ly tâm với tốc độ 10,000 vòng/phút trong 1 phút. Dịch thải ra ống thu được loại bỏ. RNA thu được trên màng lọc của cột Minicolumn được rửa với 500 μ L dung dịch RNA Wash I. Ly tâm với tốc độ 10,000 vòng/phút trong 30 giây. Dịch thải ra ống thu được loại bỏ. RNA thu được trên màng lọc của cột Minicolumn được rửa với 500 μ L dung dịch RNA Wash II. Tiếp tục ly tâm với tốc độ 10,000 vòng/phút trong 1 phút. Dịch thải ra ống thu được loại bỏ. Cột được chuyển sang ống thu mới, được bổ sung 500 μ L RNA Wash II vào cột. Tiếp tục ly tâm với tốc độ 10,000 vòng/phút trong 1 phút. Cột được chuyển sang ống eppendorf mới sau đó bổ sung 100 μ L nước cất Nuclease-Free Water, tiếp tục ly tâm với tốc độ 10,000 vòng/phút trong 1 phút để thu dịch RNA. Cuối cùng là tiến hành chạy Realtime RT-PCR.

Biểu hiện mức độ phiên mã của các gene *cdk4*, *cdk6*, *sod1*, *sod2*, *mt2*, *gadd45a*, *gadd45g*, *caspase 3*, *bax*, *bcl2* được đánh giá bằng phương pháp Realtime RT-PCR. Gene *ETEF* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, like 1) được sử dụng để làm đối chứng. Realtime RT-PCR được chạy bằng máy Real-Time PCR System (Thermo Scientific, Mỹ), sử dụng kit SuperScript[®] III Platinum[®] SYBR[®] Green One-Step (11736-059, Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Tổng thể tích một phản ứng là 20 μ L bao gồm 1 μ L RNA mẫu, 2 μ L hỗn hợp môi xuôi và môi ngược, 10 μ L 2X Mix Hi-ROX, 1 μ L RTase và 6 μ L dung dịch H₂O. Đặt chu trình nhiệt cho phản ứng như trong Bảng 2.7. Các cặp môi đặc trưng cho các gene khảo sát được tổng hợp trong Bảng 2.8. Giá trị C_t của mẫu được tính bằng phương pháp 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} [78].

Phương pháp 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} (Livak) (Real-time PCR Applications Guide – Biorads) được áp dụng để đánh giá mức độ biểu hiện tương đối sự biểu hiện gene [78]. Phương pháp này giả định rằng gene đích và gene tham chiếu được khuếch đại với hiệu quả gần 100% và trong phạm vi 5% của mỗi gene. Để xác định sự khác biệt tương đối trong mức độ biểu hiện của gene 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 gene mục tiêu với gene 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, tỉ lệ biểu hiện được tính theo công thức:

$$\text{Tỉ lệ biểu hiện} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Chỉ tiêu đánh giá:

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

Kết quả nghiên cứu này là sự tăng hay giảm theo tỷ lệ của gene đích trong mẫu thí nghiệm tương quan với mẫu chuẩn và được chuẩn hóa theo sự biểu hiện của gene tham chiếu. Chuẩn hóa sự biểu hiện của gene đích theo gene tham chiếu bù đắp cho những khác biệt về lượng mẫu. Trong nghiên cứu này, gene ETEF được sử dụng làm gene tham chiếu để đánh giá mức độ biểu hiện của gene *cdk4*, *cdk6*, *sod1*, *sod2*, *mt2*, *gadd45a*, *gadd45g*, *caspase 3*, *bax*, *bcl2*.

Bảng 2.7. Chu trình nhiệt của phản ứng RT-PCR cho các gene

| Phản ứng | Nhiệt độ | Thời gian |
|-----------|----------|-----------|
| 1 chu kì | 45°C | 15 phút |
| 1 chu kì | 95°C | 5 phút |
| 40 chu kì | 95°C | 15 giây |
| | 60°C | 30 giây |
| 71 chu kì | 60°C | 30 giây |
| Trữ mẫu | 4°C | 30 phút |

Bảng 2.8. Trình tự môi các gene

| STT | Gene | Trình tự môi (5' – 3') | Nguồn |
|-----|-------------|---|-------|
| 1 | <i>cdk4</i> | f-GTATGAGCCAGTAGCAGAGATCG r-AGTTGTGGTGGGAAAGAGTGAC | [79] |
| 2 | <i>cdk6</i> | f-GTACAAGGCTCGGGATTTG | [79] |

| STT | Gene | Trình tự môi (5' – 3') | Nguồn |
|-----|------------------|---|-------|
| | | r-CTCTGGGGCTCGATACCATA | |
| 3 | <i>sod1</i> | f-TGAGACACGTCGGAGACC r-TGCCGATCACTCCACAGG | [80] |
| 4 | <i>sod2</i> | f-TTCAGGGGCTCAGGCTGG r-ATGGCTTTAACATAGTCCGGT | [80] |
| 5 | <i>mt2</i> | f-CCTGCAAGTGCACATAATTGCCAGT r-TCTGTTTCAAGAAGCCGAAAGCCC | [81] |
| 6 | <i>gadd45a</i> | f-AACGTGGTCTTGTGTCTGCT r-AGGTCCATCGACTCTCCTCC | [82] |
| 7 | <i>gadd45g</i> | f-CGCCTTGGATACGTCCGATT r-CTCTTGACACGCGACCAGTA | [82] |
| 8 | <i>caspase 3</i> | f-ATGAACGGAGACTGTGTGGA r--GTATCTGAAGGCATGGGATTGA | [69] |
| 9 | <i>bcl2</i> | f-GGATGACTGACTACCTGAACGG r-GTATGAAAACGGGTGGAACACA | [69] |
| 10 | <i>bax</i> | f-TGCCTTTTATTAGAAAGACCTGCAT r-TCCAGCAAGGAAAACCTCCAACCT | [69] |
| 11 | <i>etef</i> | f-GTACTACTCTTCTTGATGCC r-GTACAGTTCCAATACCTCCA | [81] |

Đánh giá biểu hiện mức dịch mã các gene điều hòa chu kỳ tế bào:

Trong nghiên cứu này, phương pháp Western Blot để đánh giá mức độ biểu hiện của các protein liên quan đến chu kỳ tế bào như Caspase 3, Bcl2 và Bax. Protein Gapdh được sử dụng làm đối chứng. Các bước thực hiện Western blot bao gồm các bước sau:

- Ly giải protein: Phôi và ấu trùng cá ngựa vằn sau khi thu mẫu được ly giải bằng Optiblot LDS Sample Buffer (ab119196, Abcam, Mỹ) ở bể ổn nhiệt 70°C trong 10 phút.

- Điện di SDS-PAGE: các protein thu được từ các mẫu được chuyển với lượng bằng nhau vào các giếng gel Precast Gel SDS-PAGE 4-12% (ab139596, Abcam, Mỹ)

và được điện di trong Optiblot SDS Run Buffer (ab119197, Abcam, Mỹ) trong 2 giờ ở 50V. Bể điện di được giữ lạnh bằng đá gel để tránh sự thoái hóa protein.

- Chuyển màng PVDF: các protein đã được phân tách trong Precast Gel SDS-PAGE được chuyển lên màng PVDF (ab133411, Abcam, Mỹ) được kẹp bỏ một lớp giấy lọc Extra Thick Blot Paper (1703966, Bio-Rad, Mỹ) và một lớp bột biển ở mỗi bên và đặt cố định vào cassette. Cassette này được đặt vào bể điện di chứa buffer TBST sao cho mặt gel nằm ở phía cực âm (cathode) và màng PVDF nằm phía cực dương (anode) và được điện di trong 2 giờ ở 50V.

- Khóa màng: Màng PVDF sau đó được khóa màng qua đêm ở 4°C trong Blocking Buffer (ab126587, Abcam, Mỹ).

- Ủ kháng thể sơ cấp: Màng PVDF này tiếp tục được ủ với kháng thể sơ cấp trong Blocking Buffer qua đêm ở 4°C. Các kháng thể được sử dụng bao gồm kháng thể Caspase 3 (ab44976, Abcam, Mỹ), kháng thể Bax (ab53154, Abcam, Mỹ) và kháng thể Bcl2 (ab196495, Abcam, Mỹ) được pha loãng với tỉ lệ 1: 5000. Kháng thể Gapdh (ab181602, Abcam, Mỹ) được pha loãng với tỉ lệ 1: 10000. Sau khi ủ qua kháng thể sơ cấp, màng PVDF được rửa 3 lần, mỗi lần 10 phút với dung dịch TBST.

- Ủ kháng thể thứ cấp: Màng này sau đó được ủ với kháng thể thứ cấp Goat Anti-Rabbit IgG (HRP) (ab6721, Abcam, Mỹ) và Goat Anti-Mouse IgG (HRP) (ab6789, Abcam, Mỹ) trong Blocking Buffer ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

- Hiện phim: Các vạch protein được hiển thị bằng ECL Western Blotting Substrate Kit (ab65623, Abcam, Mỹ). Màng PVDF được cố định trên cassette. Dung dịch A và B được trộn đều với tỉ lệ 1:1 và nhỏ trực tiếp lên màng PVDF với thể tích 0,125 ml/cm² diện tích màng. Màng được ủ trong 1 phút ở nhiệt độ phòng. Dung dịch hiển thị ECL được hút bỏ trước khi tiến hành quá trình hiện phim.

Kết quả Western Blot trong nghiên cứu này được hiển thị bằng phương pháp hiện phim sử dụng kit AUTOMATIC X-RAY (873498, Fujifilm, Nhật Bản). Quá trình hiện phim được thao tác trong phòng tối. Tấm phim CL-Xposure Film (34090, Thermo Scientific, Mỹ) được đặt lên màng PVDF và ủ trong 1 phút. Sau đó, phim được nhúng vào dung dịch Develop trong 15 giây và chuyển qua dung dịch Fixing trong 15 giây. Cuối cùng, phim được rửa bằng nước cất trong 30 giây. Các vạch protein phát huỳnh quang trên màng PVDF được hiển thị âm bản trên phim. Phần

mềm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Mỹ) được dùng để đo cường độ các vạch protein trong kết quả hiện phim [83].

2.2.6. Đánh giá hàm lượng Crom (VI) tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

Cá ngựa vằn trưởng thành được nuôi trong môi trường nhiễm crom (VI) với nồng độ lần lượt là LC_{50} và $LC_{6.25}$. Thời gian khảo nghiệm là 30 ngày.

Mỗi nồng độ nuôi 300 con cá ngựa vằn trưởng thành. Ở các ngày lần lượt là ngày 5, ngày 10, ngày 20, ngày 30, sử dụng 50 cá ngựa vằn trưởng thành ở mỗi nồng độ mang phân tích. Đối chứng là cá ngựa vằn trưởng thành không tiếp xúc với Crom (VI).

Mẫu cá ngựa vằn được gửi công ty TNHH phân tích kiểm nghiệm Việt Tín phân tích.

Chỉ tiêu đánh giá: Hàm lượng Crom (VI) tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn qua các ngày: ngày thứ 5, ngày thứ 10, ngày thứ 20, ngày thứ 30 so sánh với đối chứng là cá ngựa vằn không tiếp xúc với Crom (VI).

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

- Các mẫu được sấy khô và tro hóa ở nhiệt độ 450°C . HCl 6M được thêm vào và làm bay hơi dung dịch đến khô. Phần cặn được hòa tan trong HNO_3 0,1 M và chất phân tích được xác định bằng ngọn lửa và quy trình graphit.

- Máy đo quang phổ hấp thụ nguyên tử: Sử dụng đèn đốt không khí axetylen cho ngọn lửa và lò nung graphit để xác định nhiệt điện, với hiệu chỉnh nên (s^r 0,11; $RSDR^c$: 20; r^s 0,31). Đèn phóng điện không điện cực cho tất cả các nguyên tố được xác định. Lò đốt ở nhiệt độ 450°C . Tấm gia nhiệt có điều khiển gia nhiệt, để gia nhiệt lên đến 300°C

- 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.

- Dung dịch chuẩn Crom (VI): 1 mg/mL hòa tan 1,000 g Crom (VI) trong 7mL HNO₃ trong bình định mức 1 L. Pha loãng thể tích bằng H₂O.

- Cách thức tiến hành

Sử dụng thiết bị không gây nhiễm. 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°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°C. Tăng nhiệt độ với tốc độ tối đa 50°C/h đến 450°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 cặn 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

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

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 Crom (VI) trong cơ thể cá ngựa vằn

2.2.7. Đánh giá sự ảnh hưởng Crom (VI) lên cấu trúc nội quan (ruột, gan và buồng trứng) cá ngựa vằn

Để đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên cấu trúc một số nội quan, cá ngựa vằn ở các nhóm thí nghiệm xử lý Crom (VI) với nồng độ LC₅₀ tại các thời điểm ngày thứ 5, ngày thứ 10, ngày thứ 20, ngày thứ 30 và nhóm đối chứng được thu nhận và cố định trong paraformaldehyde. Các mẫu này được gửi đến Đại học Y dược thành phố Hồ Chí Minh để thực hiện cắt lát mô. Các mẫu mô nội quan cá được nhuộm với HE (Hematoxylin and Eosin) và quan sát dưới kính hiển vi quang học ở các độ phóng đại khác nhau. Phương pháp này để đánh giá đặc điểm cấu trúc mẫu mô dựa trên biểu hiện màu của các thành phần khác nhau trong mẫu. Hematoxylin sẽ nhuộm các thành phần hạt nhân màu tím, trong khi Eosin sẽ nhuộm các thành phần cytoplasm và các mô mềm màu hồng.

Phẩm nhuộm được pha theo cách thức sau:

- Hematoxylin Harris:

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

- Các bước tiến hành pha:

- + Hòa tan Hematoxylin trong cồn
- + Hòa 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

+ Thêm 2 ml acid acetic lạnh khi bình đun lạnh hẳn để làm tăng tính nhuộm nhân

+ Eosine Y: 0,5% trong cồn 95°

- L.G. Koss pha theo công thức:

+ Eosine Y (CI. No 45830) 16g

+ Dichromat Kali 8g

+ Acid picric (nước bão hòa) 160 mL

+ Cồn Etanol 95° 160mL

+ Hòa tan Eosin và Dichromat Kali vào nước cất, đun nóng, 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 lần thể tích mẫu. Thời gian cố định từ 1-24 giờ tùy theo kích cỡ mẫu.

Sau khi cố định mẫu được thực hiện qua các khâu kỹ thuật sau:

- Chuyển mẫu

- Vùi parafin

- Đúc khối parafin

- Cắt và dán mảnh cắt

- Nhuộm:

+ Tẩy parafin trong 3 bể toluen (hoặc xylen) trong 5 phút mỗi bể

+ Qua bể cồn 4 lần bao gồm 100°, 95°, 80° và 70°. Mỗi bể nhúng 15 lần.

+ Rửa nước cất: 15 lần

+ Nhuộm nhân bằng Hematoxylin Harris: 5 phút

+ Rửa nước chảy: 10 phút

+ Kiểm tra màu của nhân qua kính hiển vi, nếu đậm, tẩy nhẹ bằng cồn-acid

+ Rửa nước chảy: 60 giây

+ Nhuộm Eosin 1%: 2 phút

+ Rửa nước chảy: 60 giây

+ Biệt hóa trong bể cồn 95° và 100°, mỗi bể nhúng 15 lần

+ Qua 3 bể toluen, bể I và II nhúng 15 lần, bể III: 10 phút

+ Gắn lá kính

Tiến hành quan sát và đọc kết quả dưới kính hiển vi.

Chỉ tiêu đánh giá: Đánh giá các biến đổi hoặc thay đổi cấu trúc xảy ra trong mẫu như hình dạng, kích thước, tổ chức tế bào và các biến đổi cấu trúc khác có thể được ghi nhận và đánh giá.

2.2.8. Phương pháp thống kê

Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 03 lần và các kết quả thí nghiệm được trình bày ở dạng $\bar{x} \pm SD$. Sử dụng phần mềm Sigma Plot của SYSTAT Software (Mỹ) để xử lý kết quả thí nghiệm và thông qua phân tích ANOVA để đánh giá sự khác biệt giữa các nghiệm thức $p < 0,05$.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Định danh cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

3.1.1. Định danh cá ngựa vằn bằng đặc điểm hình thái học

Cá ngựa vằn sử dụng trong nghiên cứu này được nuôi tại Viện sinh học nhiệt đới. Các cá đực và cá cái được lựa chọn dựa trên hình dạng cơ thể cá để đảm bảo khỏe mạnh và sẵn sàng cho việc sinh sản.

Kết quả Hình 3.1 cho thấy, thân cá ngựa vằn có 05 sọc màu chạy dọc từ sau đầu đến cuối tia vây đuôi. Khi quan sát hình dáng cơ thể cá, chúng ta thấy có sự khác biệt giữa cá đực và cá cái. Cá đực thường có thân mình mỏng hơn, trong khi đó, cá cái thường có thân mình lớn hơn đặc biệt trong giai đoạn mang thai thì bụng cá cái phình to rõ rệt do chứa trứng. Trên vây hậu môn có sọc rõ rệt, có 10-12 tia vây. Cá không có đường bên, ở miệng cá có râu nhỏ. Kích thước trung bình cá trưởng thành là $3,82 \pm 0,08$ cm. Các đặc điểm này giúp phân biệt giữa cá đực và cá cái trong loài cá và thường có vai trò quan trọng trong quá trình sinh sản và giao phối chúng.



Hình 3.1. Hình mô tả hình dáng cá ngựa vằn đực và cái

(A: Cá ngựa vằn đực, B: Cá ngựa vằn cái)

Việc nuôi riêng cá ngựa vằn đực và cá cái nhằm tối ưu hóa khả năng sinh sản, giúp thuận lợi cho việc quan sát đặc tính sinh sản của cá, cũng như dễ dàng trong việc chăm sóc và thu phôi cá ở giai đoạn sớm.

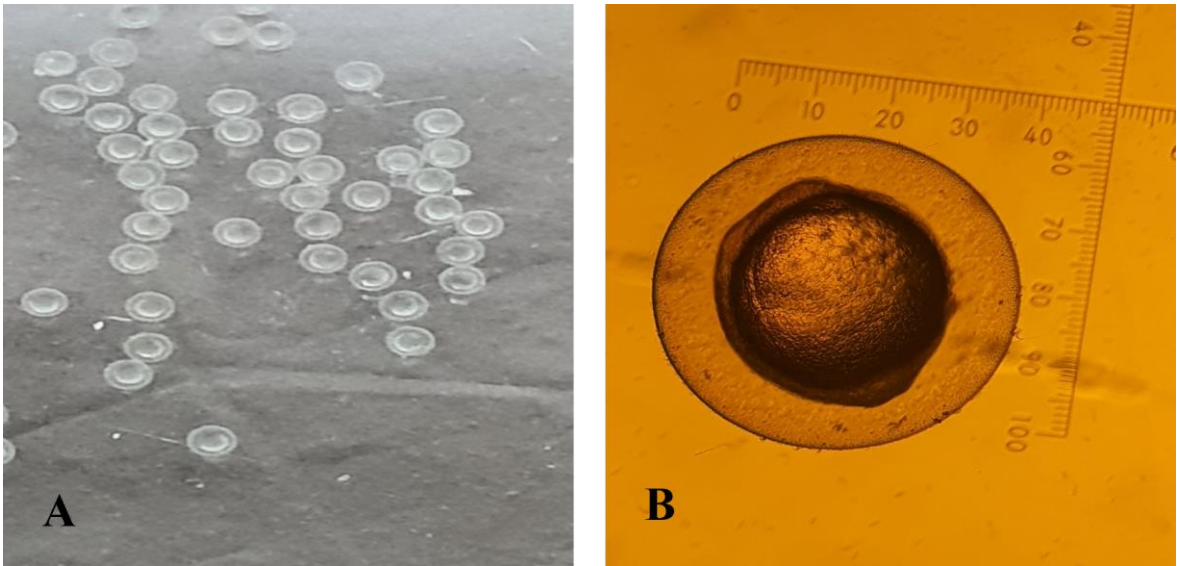
Việc sử dụng bể phối cá đực trái bi thủy tinh làm giá đỡ là một biện pháp quan trọng để đảm bảo phôi không bị cá ăn sau khi phối. Điều này đặc biệt quan trọng trong việc thu được phôi hay không đối với loài cá có tập tính ăn tạp như cá ngựa vằn, vì chúng có thể ăn phôi nếu không có biện pháp bảo vệ. Biện pháp này giúp đảm bảo sự thành công của quá trình phối cá và nghiên cứu đặc tính sinh sản của chúng. Đồng thời, nó cũng tạo ra một môi trường tương tự như trong tự nhiên cho cá. Trước khi tiến hành phối cá, mô phỏng chu kỳ sáng tối theo tỷ lệ 14 giờ sáng và 10 giờ tối để đảm bảo rằng điều kiện ánh sáng đúng tự nhiên và thích hợp cho quá trình phối cá.

Quá trình phối cá của cá ngựa vằn, được thực hiện bằng cách tháo vách ngăn để cho phép cá đực và cá cái tiếp xúc sau khi bật đèn, là một phần quan trọng của việc thu phôi theo ý muốn trong môi trường nghiên cứu. Quá trình này cho phép cá đực và cá cái tương tác và thụ tinh.

Qua quan sát bể phối cá cho thấy, trước khi thụ tinh cá đực rượt theo cá cái trước khi cá cái đẻ trứng. Sau khi cá cái đẻ trứng, cá đực sẽ rượt tinh trùng trong khu vực có trứng để thụ tinh. Một lần giao phối, trung bình một cặp cá ngựa vằn có thể đẻ được từ 100 đến 150 phôi.

Kết quả của quan sát này đã xác định được cá ngựa vằn là động vật có xương sống thụ tinh ngoài và sinh sản số lượng phôi lớn. Quá trình giao phối của cá thường diễn ra trong khoảng thời gian từ 30 đến 45 phút. Sau khi giao phối thành công, cá ngựa vằn thường có xu hướng tìm kiếm thức ăn để bổ sung chất dinh dưỡng. Điều này giúp duy trì sức khỏe của chúng và chuẩn bị cho quá trình sinh sản tiếp theo. Trong vòng một tuần, một cặp cá có thể giao phối 3 đến 4 lần, cho phép cá sinh sản một lượng lớn phôi để duy trì dòng gene và thích nghi với môi trường tự nhiên.

Sau khi xác định quá trình giao phối của cá kết thúc, cá đực và cá cái được tách riêng khỏi bể phối và tiến hành thu phôi. Phôi cá được rửa kỹ nhiều lần để loại bỏ tạp chất, phân cá và phôi chết. Các phôi có sức sống tốt được nuôi trong môi trường 1x E3 để tiến hành quan sát.



Hình 3.2. Phôi cá ngựa vằn

(A – Phôi cá được quan sát ở điều kiện bình thường, B – Phôi cá được quan sát bằng kính hiển vi soi nổi độ phóng đại 40X thước 100 μm)

Phôi cá ngựa vằn (Hình 3.2) được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi cho thấy: cấu trúc phôi trong suốt, khối noãn hoàng đều đặc và vị trí nằm giữa, dòng sinh chất chảy đều trong phôi. Phôi có đường kính $45 \pm 0,5 \mu\text{M}$.

Phôi sau 8 giờ thụ tinh, quá trình hình thành các cơ quan bên trong phôi diễn ra nhanh chóng và hầu hết cấu trúc cơ quan cơ bản được hình thành trong vòng 24 giờ. Ở giai đoạn này, ấu trùng trong phôi đã phát triển đủ để có 30 cặp đốt sống, tim đã bắt đầu đập, nhưng cấu trúc và sắc tố ở mắt và da vẫn chưa hoàn thiện. Cặp đốt sống đầu tiên hình thành sau 10 giờ phát triển và sau đó sau 30 phút sẽ hình thành thêm một cặp mới. Điều này có nghĩa là trong vài giờ, có thể quan sát một số cặp đốt sống mới.

Hệ thần kinh cũng phát triển, đĩa thần kinh xuất hiện trong vòng 10 giờ, giống như cặp đốt sống đầu tiên. Sau đó, đĩa thần kinh gấp lại vào trong tạo thành sống thần kinh (13 giờ) và phát triển đường thần kinh (16 giờ). Đường thần kinh tạo lỗ để hình thành nên ống thần kinh lõm (bắt đầu lúc 18 giờ, khi phôi đạt 18 đốt sống).

Vùng não có thể bắt đầu được xác định là các vùng sưng phồng phân biệt gọi là đốt thần kinh (neuromere). Khi đạt 18 giờ, có thể xác định được 10 đốt thần kinh, bao gồm 3 đốt đầu tiên tương ứng với bộ não cùng, bộ não trung gian, bộ não giữa và 7 đốt cuối cùng tương ứng với bộ não sau. Sau 24 giờ, phôi bắt đầu phản ứng với sự tiếp xúc và sắc tố trở nên rõ rệt. Giai đoạn này có nhiều biến đổi về hình dạng cơ thể,

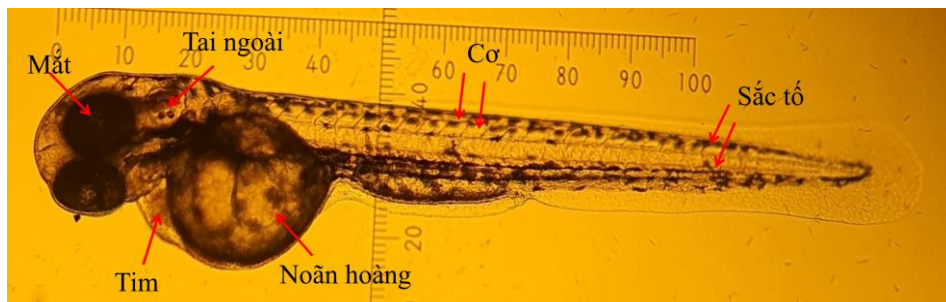
với việc hình thành từng phần của các bộ phận cơ thể. Lúc này, ấu trùng phôi đã bắt đầu hoạt động quẫy mình, hoạt động này kéo dài từ giai đoạn phân đốt đến giai đoạn hầu họng, đồng thời cơ thể bắt đầu phát triển góp phần làm rách lớp vỏ phôi làm phôi thoát nang và chuyển sang giai đoạn ấu trùng.

Trong vùng hầu họng, hàm và nắp mang được tạo thành từ hai vòm hầu họng đầu tiên và sau đó các vòm họng sau cũng được hình thành rõ rệt (còn gọi là vòm mang tạo thành mang). Hệ thống đường viền bên gồm một loạt các đường ống chứa cấu trúc cảm ứng gọi là khối thần kinh giác quan (neuromast), giúp phát hiện những chuyển động chậm trong nước và cung cấp thông tin cho cá về môi trường xung quanh.

Khi đạt đến giai đoạn 18 cặp đốt sống, các khối thần kinh giác quan bắt đầu di chuyển trong biểu bì, mỗi giờ di chuyển từ một cặp đốt sống sang đốt sống khác và tiếp tục cho đến đuôi vào khoảng 40 giờ.

Ấu trùng phôi thoát nang trong vòng 48 – 72 giờ. Khi bước vào giai đoạn này, ấu trùng cá ngựa vẫn hoàn thiện hầu hết quá trình phát triển về hình thái và tiếp tục tăng trưởng một cách nhanh chóng. Trong suốt ngày tiếp theo, có sự thay đổi rõ rệt về hình dạng của chúng, bao gồm bong bóng bên trong cơ thể căng phồng và miệng tiếp tục kéo dài. Trong khi đó, màu sắc của chúng dần trở nên sáng hơn và kéo dài ra. Các ống ruột tập trung nhiều ở bụng và có thể dễ dàng quan sát được. Khác với giai đoạn phôi, ấu trùng giai đoạn sớm bắt đầu bơi một cách linh hoạt và cử động bằng hàm miệng, vây ngực và mắt.

Những phát triển này giúp cá đáp ứng môi trường xung quanh, hô hấp, ẩn trốn kẻ săn mồi và tìm thức ăn. Sau 5 ngày sau khi thụ tinh và khi ra khỏi màng đệm, chúng bắt đầu tự kiếm ăn một cách độc lập.



Hình 3.3. Hình các cơ quan ấu trùng cá ngựa vằn

Kết quả hình 3.3 cho thấy chi tiết các cơ quan: mắt, tai ngoài, tim, cơ, sắc tố, noãn hoàng và tuần hoàn máu trong cơ thể cá được quan sát và ghi nhận. Dưới kính hiển vi soi nổi, độ phóng đại 40X và thước 100 μm cho thấy kích thước của ấu trùng cá ngựa vẫn tăng theo thời gian (từ ngày 3 đến ngày thứ 7) và kích thước đo được tăng từ 2982 μm lên 3461 μm .

3.1.2. Định danh cá ngựa vằn bằng phương pháp sinh học phân tử

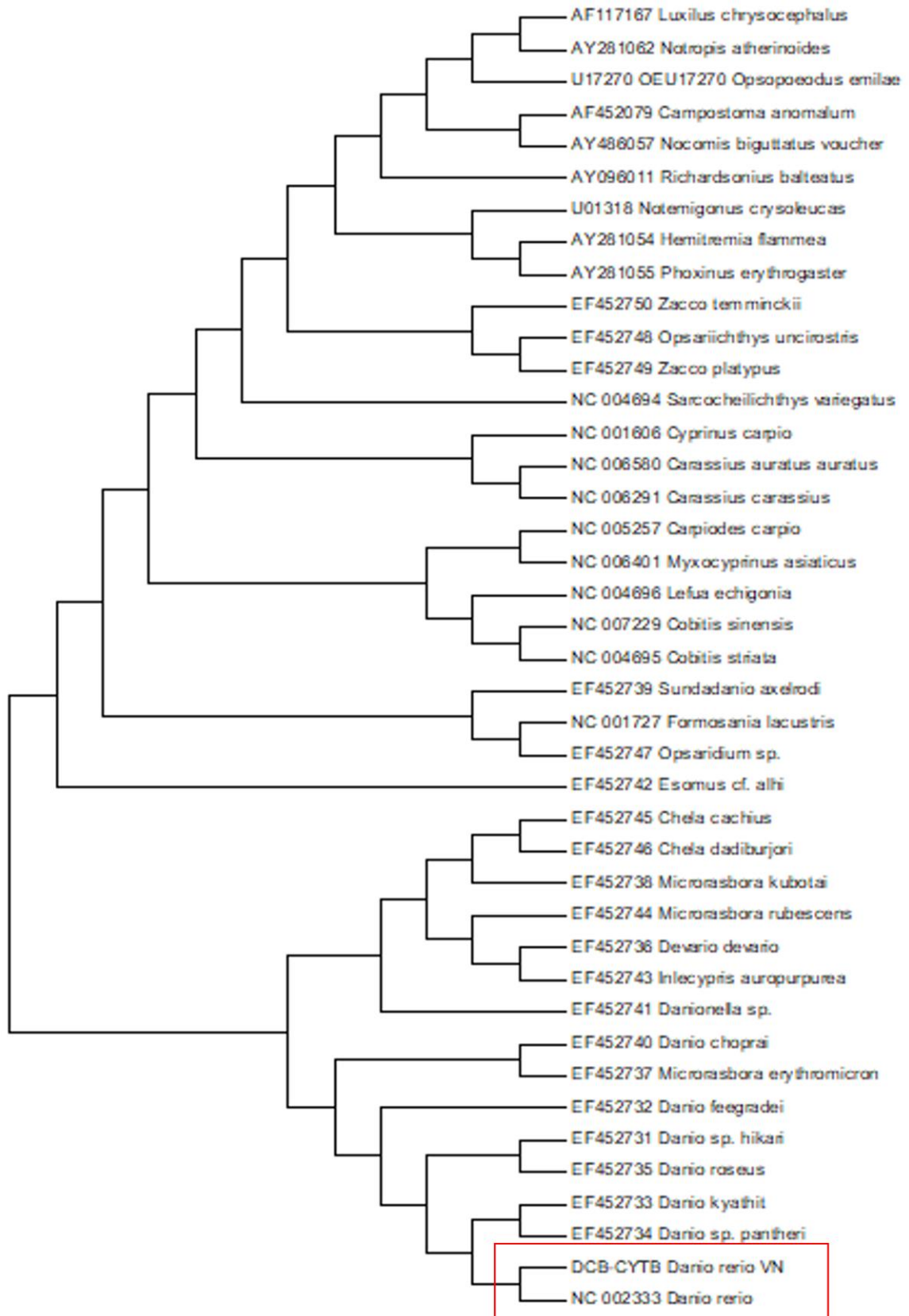
3.1.2.1. Phân tích trình tự gene cytochrome b của cá ngựa vằn

```

Query 15446 ACAGGACTATTTTGTAGCAATACACTACACCTCAGACATCTCAACAGCATTTCATCTGTT 15505
|||||
Sbjct 1 ACAGGACTATTTTGTAGCAATACACTACACCTCAGACATCTCAACAGCATTTCATCTGTT 60
Query 15506 GTGCATATTTGCCGAGATGTAATAATTCGGCTGACTTATTCGGAGCATCCATGCCAATGGG 15565
|||||
Sbjct 61 GTGCATATTTGCCGAGATGTAATAATTCGGCTGACTTATTCGGAGCATCCATGCCAATGGG 120
Query 15566 GCTTCCTTCTTCTTCATCTGCCTGTATATTCACATCGCCCGAGGACTATATTACGGATCT 15625
|||||
Sbjct 121 GCTTCCTTCTTCTTCATCTGCCTGTATATTCACATCGCCCGAGGACTATATTACGGATCT 180
Query 15626 TATCTTTATAATGAAACTTGAAACATCGGAGTAGTCTGTTCTTACTTGTAAATAACA 15685
|||||
Sbjct 181 TATCTTTATAATGAAACTTGAAACATCGGAGTAGTCTGTTCTTACTTGTAAATAACA 240
Query 15686 GCTTTTGTGGGCTACGTCCTTCCATGGGGCCAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTAATT 15745
|||||
Sbjct 241 GCTTTTGTGGGCTACGTCCTTCCATGGGGCCAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTAATT 300
Query 15746 ACTAACCTATTATCGGCCGTTCCCTACGTGGGAGATACCCTAGTGAATGAATCTGAGGG 15805
|||||
Sbjct 301 ACTAACCTATTATCGGCCGTTCCCTACGTGGGAGATACCCTAGTGAATGAATCTGAGGG 360
Query 15806 GGATTCTCAGTAGACAATGCAACCCTTACACGATTCTTCGCATTCCACTTTTTATTACCA 15865
|||||
Sbjct 361 GGATTCTCAGTAGACAATGCAACCCTTACACGATTCTTCGCATTCCACTTTTTATTACCA 420
Query 15866 TTTATTATCATCGCCATAGTTATTCTACACTGCTATTTCTCCACGAAACCGGATCAAA 15925
|||||
Sbjct 421 TTTATTATCATCGCCATAGTTATTCTACACTGCTATTTCTCCACGAAACCGGATCAAA 480
Query 15926 AACCCCTTGGCCTAAACCCACACATGGATAAAATCCCTTTCATCCTTATTTTTCAAA 15985
|||||
Sbjct 481 AACCCCTTGGCCTAAACCCACACATGGATAAAATCCCTTTCATCCTTATTTTTCAAA 540
Query 15986 AAAGACCTCCTTGGTTTTGTAATTATATTATTTCCCTCTCACTATTAGCACTATTCTCA 16045
|||||
Sbjct 541 AAAGACCTCCTTGGTTTTGTAATTATATTATTTCCCTCTCACTATTAGCACTATTCTCA 600
Query 16046 CCAAACCTCTTAGGAGATCCAGAAAATTTCAACCCTGCTAACCTCTAGTAACACCTCCT 16105
|||||
Sbjct 601 CCAAACCTCTTAGGAGATCCAGAAAATTTCAACCCTGCTAACCTCTAGTAACACCTCCT 660
Query 16106 CACATTAACCCAGAATGATATTTCTATTCGCATACGCCATTCTACGATCTATCCCAAAC 16165
|||||
Sbjct 661 CACATTAACCCAGAATGATATTTCTATTCGCATACGCCATTCTACGATCTATCCCAAAC 720
Query 16166 AAACCTAGGAGGTGTACTAGCTCTCTTATTTCCATTTTAGTATTAATAGTAGTACCAATT 16225
|||||
Sbjct 721 AAACCTAGGAGGTGTACTAGCTCTCTTATTTCCATTTTAGTATTAATAGTAGTACCAATT 780
Query 16226 TTACACACTTCTAAACAGCGAGGAATAGCATTCCGCCAGT 16266
|||||
Sbjct 781 TTACACACTTCTAAACAGCGAGGAATAGCATTCCGCCAGT 821

```

Hình 3.4. Trình tự gene cytochrome b của mẫu cá ngựa vằn trong nghiên cứu



Hình 3.5. Sơ đồ cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự gene *cytochrome b* của cá ngựa vằn phân lập được với một số loài thuộc bộ Cypriniformes công bố trên ngân hàng GenBank.

Cá ngựa vằn được nuôi tại Viện sinh học nhiệt đới được sử dụng để tách chiết DNA tổng số. Sau khi tách chiết DNA tổng số và kiểm tra độ tinh sạch bằng đo quang phổ đảm bảo yêu cầu cho thí nghiệm nhân bản gene *cytochrome b* của cá ngựa vằn (*Danio rerio*). Sau khi tiến hành điện di sản phẩm PCR thì thu được một phân đoạn DNA có kích thước khoảng 1141 bp có tính đặc hiệu. Tiến hành xác định trình tự tự động bằng máy ABI PRIMS®3100 Avant Genetic Analyzer sau đó sử dụng công cụ BLAST của NCBI để so sánh các trình tự thu được với dữ liệu tham chiếu. Kết quả phân đoạn DNA nhân bản thu được tương ứng với trình tự của đoạn gene *cytochrome b* với độ dài phân tích được là 821 nucleotid (Hình 3.4 và Phụ lục 1.1).

3.1.2.2. Phân tích trình tự gene *cytochrome c* của cá ngựa vằn

```

Query 6654 GATTTGGAACTGACTTGTGCCACTAATGATTGGGGCCCCCGATATGGCATTTCCTCCGAA 6713
          |||
Sbjct 1    GATTTGGAACTGACTTGTGCCACTAATGATTGGGGCCCCCGATATGRMATTTCCTCCGAA 60

Query 6714 TAAATAATATAAGCTTCTGACTTCTTCCACCCTCATTCTTCTTCTATTAGCTTCTTCTG 6773
          |||
Sbjct 61   TAAATAATATAAGCTTCTGACTTCTTCCACCCTCATTCTTCTTCTATTAGCTTCTTCTG 120

Query 6774 GAGTTGAAGCAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTATCCACCTCTTGCAGGCAACCTTG 6833
          |||
Sbjct 121  GAGTTGAAGCAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTATCCACCTCTTGCAGGCAACCTTG 180

Query 6834 CCCATGCAGGAGCATCTGTTGATCTAACAATTTTTTCACTACACTTAGCAGGTGTTTCAT 6893
          |||
Sbjct 181  CCCATGCAGGAGCATCTGTTGATCTAACAATTTTTTCACTACACTTAGCAGGTGTTTCAT 240

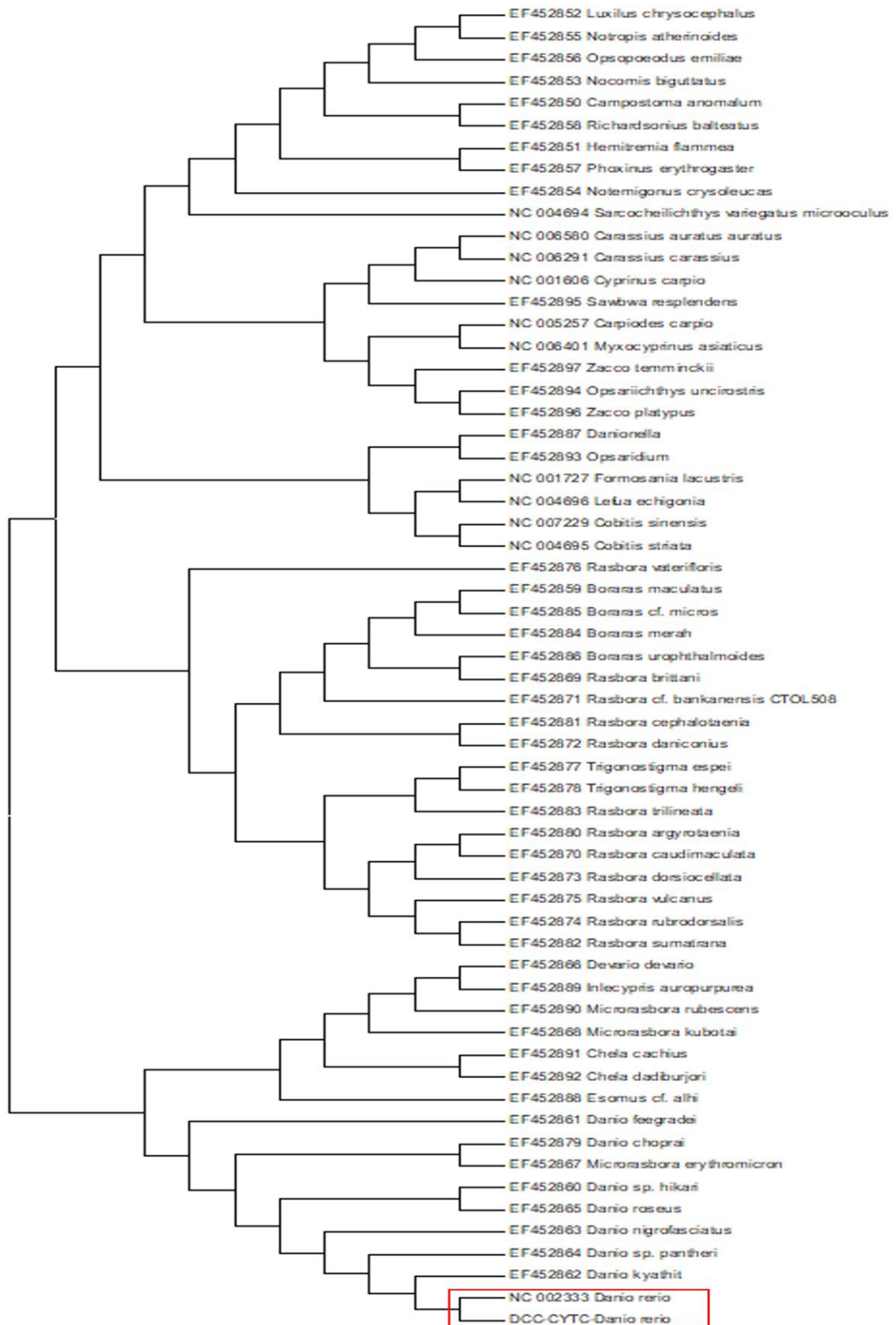
Query 6894 CTATTCTTGGAGCAATTAATTTTATTACTACTACAATTAACATGAAGCCACCAACTATCT 6953
          |||
Sbjct 241  CTATTCTTGGAGCAATTAATTTTATTACTACTACAATTAACATGAAGCCACCAACTATTT 300

Query 6954 CTCAGTATCAAACCTCATTATTTGTATGAGCTGTCTTAGTTACAGCTGTACTACTTCTTT 7013
          |||
Sbjct 301  CTCAGTATCAAACCTCATTATTTGTATGAGCTGTCTTAGTTACAGCTGTACTACTTCTTT 360

Query 7014 TATCTTTACCAGTGTTAGCT 7033
          |||
Sbjct 361  TATCTTTACCAGTGTTAGCT 380

```

Hình 3.6. Trình tự gen *cytochrome c* của mẫu cá ngựa vằn trong nghiên cứu



Hình 3.7. Sơ đồ cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự gene *cytochrome c* của cá ngựa vằn phân lập được với một số loài thuộc bộ Cypriniformes công bố trên ngân hàng GenBank.

Tương tự như phân tích trình tự gene *cytochrome b*. Mẫu cá ngựa vằn sau khi tách chiết DNA tổng số và kiểm tra độ tinh sạch bằng đo quang phổ đảm bảo yêu cầu cho thí nghiệm nhân bản gene *cytochrome c* của cá ngựa vằn. Kết quả sau khi tiến hành điện di sản phẩm PCR thu được một phân đoạn DNA có kích thước khoảng 712 bp, đặc hiệu cho gene *cytochrome c* của cá ngựa vằn. Tiếp theo, tiến hành xác định trình tự tự động bằng máy ABI PRIMS®3100 Avant Genetic Analyzer. Sau đó sử dụng công cụ BLAST của NCBI để so sánh các trình tự thu được với dữ liệu tham chiếu. Kết quả phân đoạn DNA nhân bản thu được tương ứng với trình tự của đoạn gene *cytochrome c* với độ dài phân tích được là 380 nucleotid (Hình 3.6 và Phụ lục 1.2).

Như vậy, kết quả điện di PCR cho thấy sản phẩm khuếch đại của 2 gene *cytochrome b* và *cytochrome c* có kích thước lần lượt là 1141 bp và 712 bp. Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch và giải trình tự sẽ được sử dụng cho phân tích phát sinh loài. Kết quả so sánh với trình tự *cytochrome b* của cá ngựa vằn trong thí nghiệm với trình tự *cytochrome b* của cá ngựa vằn trên ngân hàng gene (NC002333) có mức độ tương đồng lớn hơn 99%.

Kết quả phân tích cây phát sinh loài cho thấy mẫu cá ngựa vằn sử dụng trong thí nghiệm này nằm cùng nhóm với cá ngựa vằn trên ngân hàng gene *Danio rerio*.

Ngoài ra kết quả phân tích tương đồng cho thấy cá ngựa vằn trong nghiên cứu này và cá ngựa vằn trên ngân hàng gene có mức độ tương đồng đối với gene *cytochrome c* lớn hơn 99%.

Kết quả phân tích cây phát sinh loài cho thấy mẫu cá ngựa vằn sử dụng trong thí nghiệm này nằm cùng nhóm với cá ngựa vằn trên ngân hàng gene *Danio rerio*.

3.2. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

3.2.1. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

Trong thí nghiệm này, phôi cá sau một giờ thụ tinh được cho tiếp xúc với dung dịch chứa Crom (VI) ở các nồng độ lần lượt là 0,1 µg/L; 1 µg/L; 3,125 µg/L; 6,25 µg/L; 12,5 µg/L; 25 µg/L; 50 µg/L; 100 µg/L và nhóm đối chứng được nuôi trong môi trường 1x E3. Ở mỗi nồng độ, 50 phôi được nuôi trong đĩa Petri 100mm. Mỗi

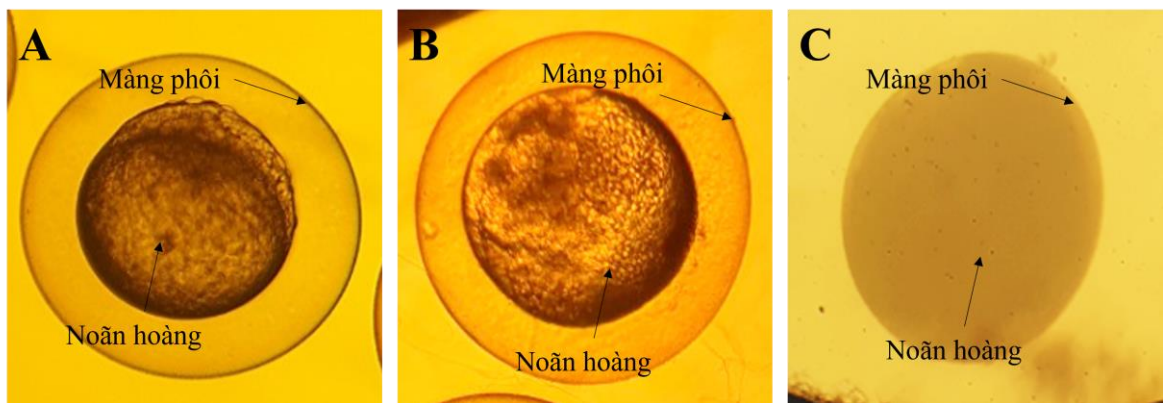
nồng độ thí nghiệm lặp lại 3 lần. Cách 24 giờ thay đổi môi trường một lần, các phôi chết được loại bỏ để không ảnh hưởng đến các phôi sống còn lại.

Kính hiển vi soi nổi được sử dụng để quan sát và xác định sự khác biệt về mặt hình thái và sự phát triển giữa nhóm đối chứng và các nhóm thí nghiệm còn lại.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong nhóm đối chứng, phôi cá ngựa vằn phát triển bình thường với cấu trúc phôi trong suốt, không có biểu hiện dị dạng. Khối noãn hoàng đều đặn và nằm ở vị trí giữa phôi, dòng sinh chất chảy đều trong phôi (Hình 3.8 A). Điều này chứng tỏ rằng, trong điều kiện thí nghiệm hiện tại, phôi cá ngựa vằn không bị ảnh hưởng xấu từ yếu tố môi trường đến sự phát triển của chúng và duy trì cấu trúc bình thường.

Ở ngày thứ 3, các phôi trong nhóm đối chứng đã nở thành ấu trùng có sức sống tốt, không có dấu hiệu bất thường và các cơ quan phát triển theo mô tả Kimmel (Hình 3.8 A) [21].

Tuy nhiên, trong các nhóm thực nghiệm được tiếp xúc với Crom (VI) ở giai đoạn đầu, bên cạnh những phôi phát triển bình thường, đã xuất hiện một số phôi phát triển bất thường về hình thái và một số phôi bị chết (Hình 3.8 B, 3.8 C). Tỷ lệ này tăng theo thời gian tiếp xúc với Crom (VI) và tăng cùng với nồng độ Crom (VI).

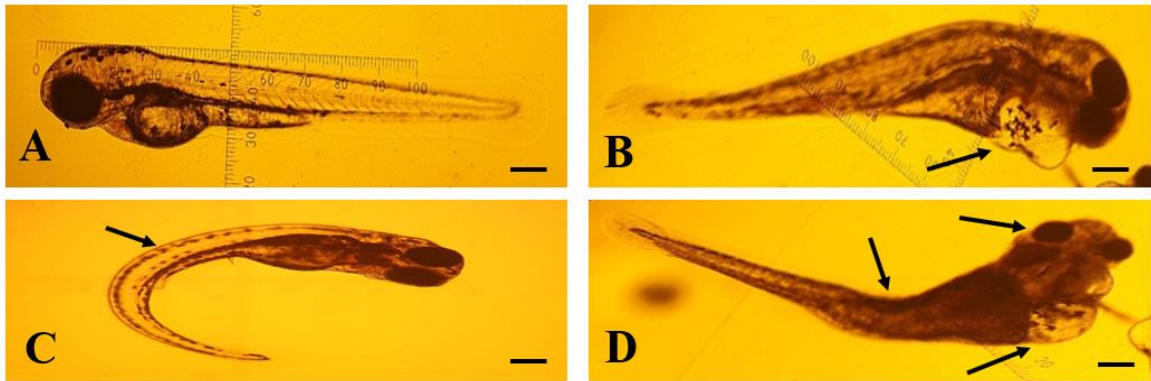


Hình 3.8. Phôi cá ngựa vằn

A - Phôi phát triển bình thường; B - Phôi phát triển bất thường; C - Phôi chết.

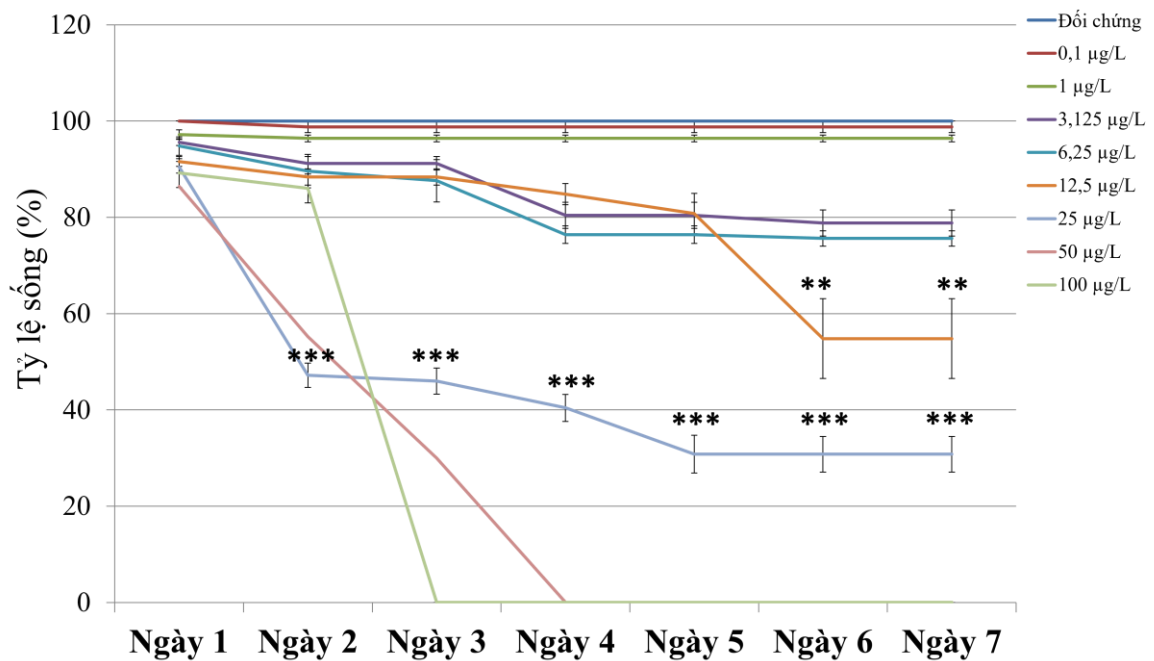
Ở giai đoạn phôi nở thành ấu trùng ở ngày thứ 3, qua quan sát, cho thấy rằng phôi cá trong các nhóm thí nghiệm phát triển chậm hơn, sức sống yếu hơn và xuất hiện nhiều dị tật hoặc thậm chí bị chết so với nhóm đối chứng. Tình trạng này trở nên rõ rệt khi số lượng biểu hiện dị tật tăng theo nồng độ Crom (VI) và theo cả thời gian tiếp xúc với Crom (VI) (Hình 3.9 B, 3.9 C, 3.9 D). Trong khi đó, ở nhóm đối chứng,

ấu trùng cá ngựa vằn phát triển bình thường bao gồm mắt, noãn hoàng, cột sống, dòng sinh chất, tim và vây (Hình 3.9 A).



Hình 3.9. Ấu trùng phát triển bất thường khi nhiễm Crom (VI)

A – Ấu trùng cá phát triển bình thường; B – Ấu trùng cá bị dị tật ở túi noãn hoàng;
C – Ấu trùng cá bị dị tật cột sống; D - Ấu trùng cá bị dị tật cột sống, mắt, phù tim
và dị tật túi noãn hoàng



Hình 3.10. Thể hiện tỷ lệ % phôi sống ở các nồng độ Crom (VI).

** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

Cơ chế tác động của Crom (VI) gây dị tật cho cá ngựa vằn hiện vẫn chưa được hiểu rõ và chưa có cơ chế tác động cụ thể nào được công bố đầy đủ gần đây. Tuy nhiên, sự tăng nồng độ Crom (VI) trong môi trường gây ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp DNA, ảnh hưởng theo chiều hướng tích cực hoặc tiêu cực gây ra các dị tật. Để xác định được nồng độ Crom (VI) dẫn tới sự phát triển bất thường, biểu hiện dị tật,

nở muộn và giảm tỷ lệ % sống đối với phôi và ấu trùng. Phôi và ấu trùng cá ngựa vằn đã được tiếp xúc với nhiều nồng độ Crom (VI) khác nhau, bao gồm nồng độ: 0,1 $\mu\text{g/L}$; 1 $\mu\text{g/L}$; 3,125 $\mu\text{g/L}$; 6,25 $\mu\text{g/L}$; 12,5 $\mu\text{g/L}$; 25 $\mu\text{g/L}$; 50 $\mu\text{g/L}$; 100 $\mu\text{g/L}$ và sử dụng môi trường 1x E3 làm nhóm đối chứng. Thí nghiệm được thực hiện tại các mốc thời gian khác nhau từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7. Kết quả được trình bày trong Hình 3.10 và dữ liệu bổ sung ở Phụ lục 2.1.

Theo kết quả nghiên cứu, hình 3.10 cho thấy việc tiếp xúc với Crom (VI) ở nồng độ Crom (VI) thấp (0,1 $\mu\text{g/L}$ và 1 $\mu\text{g/L}$), tỷ lệ sống sót không có sự khác biệt đáng kể từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7 so với đối chứng và tỷ lệ sống được xác định lần lượt là 98,8% và 96,4%. Tuy nhiên, việc tiếp xúc với Crom (VI) ở nồng độ cao hơn ($\geq 3,125 \mu\text{g/L}$) đã làm giảm tỷ lệ sống của phôi cá ngựa vằn từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7. Ở các nồng độ Crom (VI) lần lượt là 3,125 $\mu\text{g/L}$; 6,25 $\mu\text{g/L}$ và 12,5 $\mu\text{g/L}$ và giảm dần khi nồng độ Crom (VI) tăng lên. Tỷ lệ sống sót của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn ở nồng độ 25 $\mu\text{g/L}$ giảm xuống còn 47,2% vào ngày thứ 2 và tiếp tục giảm xuống 30,8% vào ngày thứ 7. Trong quá trình quan sát, quá trình nở của phôi trong nhóm này bị trì hoãn cho đến ngày thứ 5.

Ở nồng độ Crom (VI) 50 $\mu\text{g/L}$ và 100 $\mu\text{g/L}$, tỷ lệ sống giảm mạnh trong quá trình phát triển phôi và ấu trùng cá ngựa vằn. Giá trị ngưỡng gây chết (LC_{50}) vào ngày thứ 3 và ngày thứ 7 lần lượt là 32,3 $\mu\text{g/L}$ và 16,4 $\mu\text{g/L}$.

Nhóm đối chứng cho thấy sự phát triển bình thường theo mô tả của Kimmel [21]. Các kết quả này đã chứng minh rằng sự gia tăng nồng độ Crom (VI) cũng như thời gian tiếp xúc với Crom (VI) trong thời gian dài dẫn đến giảm tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn.

Kết quả nghiên cứu hiện tại cho thấy Crom (VI) 25 $\mu\text{g/L}$ là nồng độ cao nhất mà phôi cá ngựa vằn có thể phát triển đến ngày thứ 7 có ý nghĩa quan trọng trong việc hiểu được cách Crom (VI) ảnh hưởng đến sự phát triển của loài cá này. Ngoài ra, cho thấy ngưỡng nồng độ cụ thể mà Crom (VI) trở nên đặc biệt độc hại cho quá trình phát triển của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn ở giai đoạn ban đầu, sau khi thụ tinh, đặc biệt nhạy cảm với các tác nhân bên ngoài. Đây là giai đoạn mà hầu hết các rối loạn và tỷ lệ chết cao nhất có thể xảy ra. Sự trì hoãn trong quá trình nở của phôi cá ngựa vằn khi tiếp xúc với Crom (VI) ở ngưỡng nồng độ 25 $\mu\text{g/L}$ đến ngày thứ 5 cũng là một phát hiện quan trọng. Điều này cho thấy Crom (VI) không chỉ ảnh hưởng đến

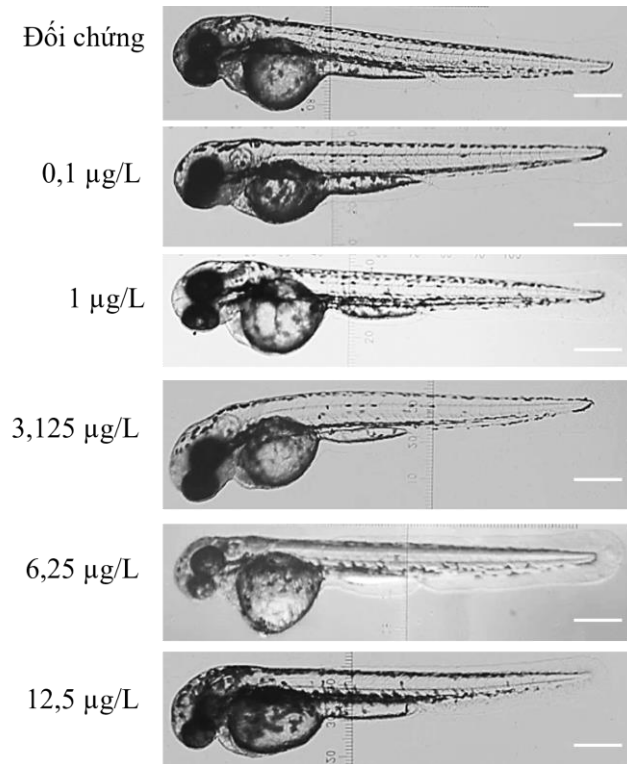
tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn mà còn tác động đến thời gian phát triển, ảnh hưởng đến sự trì hoãn trong quá trình này. Quá trình nở là sự kết hợp của nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm khả năng thẩm thấu, sự hiện diện của enzym nở được tiết ra và sự chuyển động của đuôi ấu trùng cá trong phôi [79]. Crom (VI) có trong môi trường nước gây ảnh hưởng đến sự phát triển, dẫn đến giảm số lượng và sức sống của ấu trùng và biến dạng về hình thái cá ngựa vằn. Ngoài ra, Crom (VI) cũng gây ra các biến dạng cơ thể, bao gồm tổn thương cột sống và hệ thống xương của ấu trùng cá ngựa vằn.

Các dị tật do Crom (VI) gây ra thường thấy như: tổn thương ở cột sống và hệ thống xương của ấu trùng cá ngựa vằn. Nghiên cứu của Sfakianakis và cộng sự (2006) cho rằng một số biến dạng phổ biến nhất có thể xác định ở cột sống, trong số các dị tật gây ra ở ấu trùng cá ngựa vằn do tiếp xúc với Crom (VI) bao gồm độ cong của cột sống và xương biến dạng rõ nhất [84]. Nghiên cứu của Jezierska và cộng sự (2009) đã chứng minh giai đoạn phát triển của phôi sau khi thụ tinh là giai đoạn nhạy cảm nhất của ấu trùng cá ngựa vằn khi tiếp xúc với kim loại và ảnh hưởng đến quá trình hình thành cơ quan, gây dị tật và tử vong. Đây cũng là nguyên nhân gây giảm tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn.

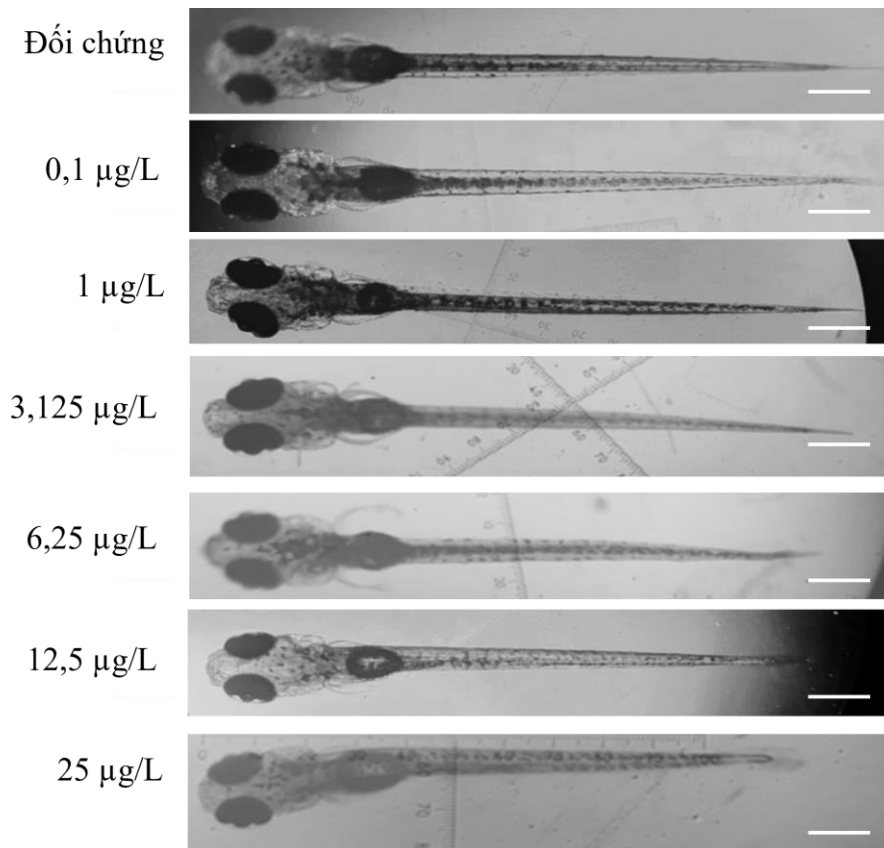
Nghiên cứu này đã chứng minh, Crom (VI) tác động tiêu cực đến sự phát triển của cá ngựa vằn. Tiếp xúc với Crom (VI) trong thời gian dài sẽ dẫn đến các hậu quả nghiêm trọng như: sự giảm tỷ lệ sống và xuất hiện các dị tật cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn và giai đoạn phôi là thời điểm nhạy cảm nhất đối với sự tác động của kim loại này. Các kết quả này cung cấp thông tin cơ bản về cách Crom (VI) có thể tác động lên sự phát triển của cá ngựa vằn ở giai đoạn phôi, ấu trùng và đây là nền tảng cho việc nghiên cứu và thực hiện các biện pháp bảo vệ môi trường và hệ sinh thái trong môi trường nước bị ô nhiễm Crom (VI).

3.2.2. Ảnh hưởng của Crom (VI) đến chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn (Danio rerio)

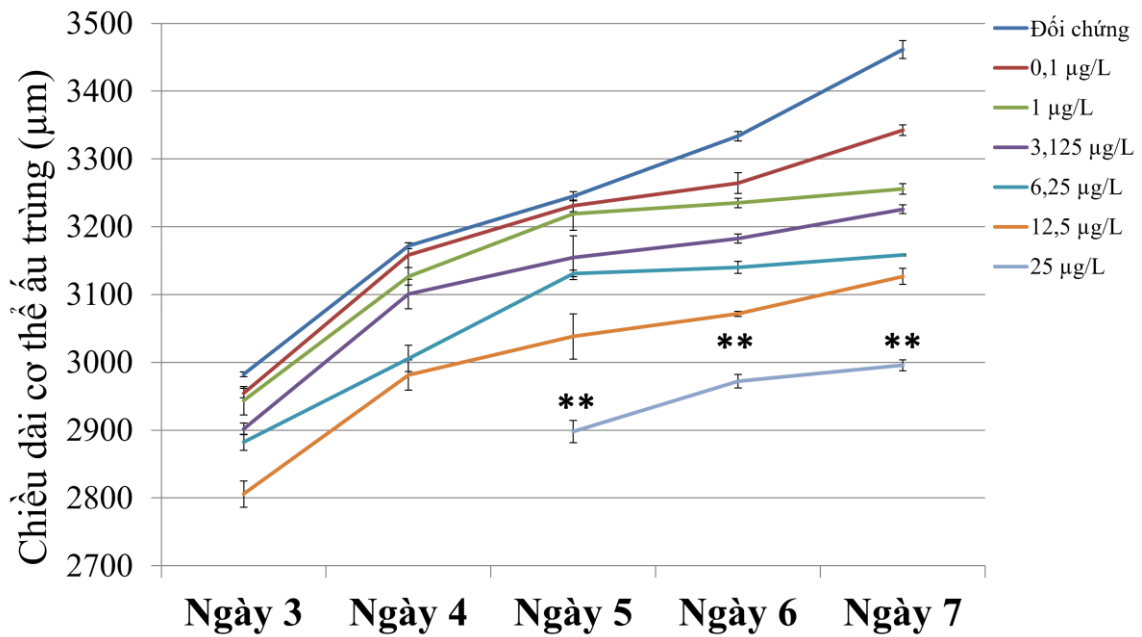
Ngoài các tác động đến tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng của cá ngựa vằn, sự phát triển về hình thái cũng bị ảnh hưởng bởi các nồng độ Crom (VI). Mức độ phát triển được đánh giá bằng cách đo chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Hình 3.11, 3.12, 3.13 và bảng số liệu bổ sung ở Phụ lục 2.2.



Hình 3.11. Chiều dài ấu trùng cá ngựa vằn ở ngày thứ 3 của các nhóm thí nghiệm (độ phóng đại 40x và thước đo 100 µm).



Hình 3.12. Chiều dài ấu trùng cá ngựa vằn ở ngày thứ 7 của các nhóm thí nghiệm (độ phóng đại 40x và thước đo 100 µm).



Hình 3.13. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn.

***: $p < 0,01$.

Kích thước cơ thể của ấu trùng cá ngựa vằn được đánh giá khi chúng tiếp xúc với các nồng độ khác nhau của Crom (VI) (0,1 µg/L; 1 µg/L; 3,125 µg/L; 6,25 µg/L; 12,5 µg/L và 25 µg/L). Kết quả thí nghiệm thể hiện ở Hình 3.13 cho thấy các nồng độ Crom (VI) cao đã gây ra sự giảm kích thước cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn.

Trong nhóm đối chứng, chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn tăng từ 2982 µm lên 3461 µm theo thời gian từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7. Trong quá trình phát triển, ấu trùng ở nồng độ Crom (VI) từ 0,1 µg/L đến 12,5 µg/L có chiều dài cơ thể ngắn hơn so với nhóm đối chứng.

Sự chậm nở của phôi ở nồng độ Crom (VI) 25 µg/L dẫn đến sự tăng trưởng thấp của ấu trùng cá ngựa vằn từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 7, với kích thước thay đổi từ 2898 µm đến 2996 µm. Những kết quả này cho thấy sự gia tăng nồng độ Crom (VI) đã gây ra mức độ ức chế đáng kể cho sự phát triển của ấu trùng cá ngựa vằn.

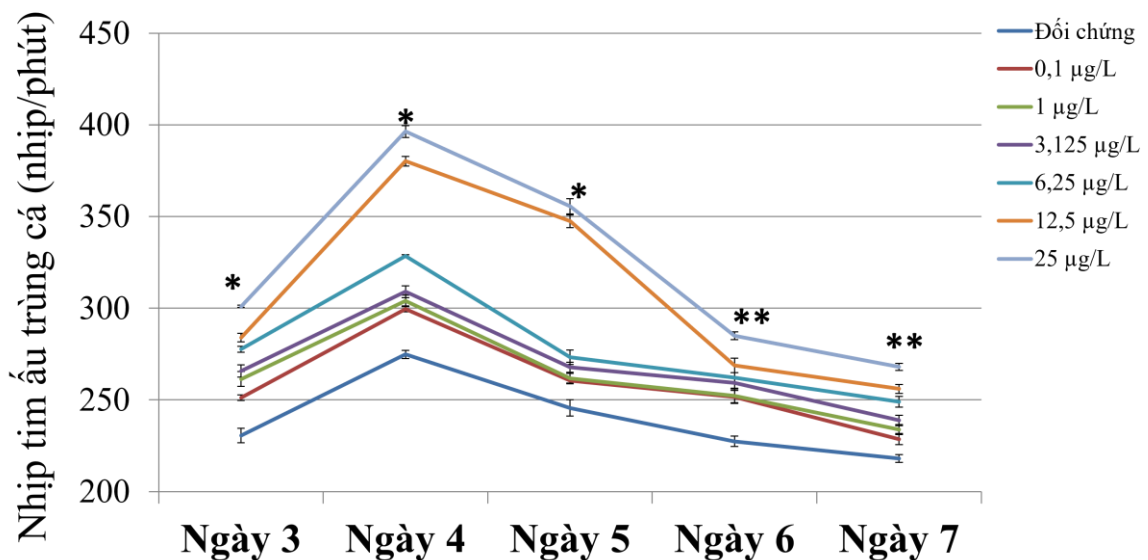
Những thay đổi về kích thước phôi dẫn đến sự bất thường trong quá trình nở [85]. Trong nghiên cứu hiện tại, việc gia tăng nồng độ Crom (VI) đã tác động đến kích thước cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn, cụ thể là làm giảm chiều dài ấu trùng cá ngựa vằn từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7.

Đặc biệt sự giảm kích thước rõ rệt nhất được quan sát thấy xảy ra ở nhóm tiếp xúc Crom (VI) 25 µg/L.

3.2.3. Ảnh hưởng của Crom (VI) đến nhịp tim ấu trùng cá ngựa vằn

Nhịp tim là một chỉ số quan trọng trong các nghiên cứu về sinh lý học và sinh học phát triển của cá [78]. Điều này là do chúng đặc biệt nhạy cảm với những thay đổi của môi trường, đặc biệt là phơi nhiễm với kim loại nặng [21]. Nhiễm độc kim loại gây ra những bất thường trong hệ thống tim mạch của phôi cá, bao gồm thay đổi nhịp tim và hoạt động của tim, tăng tỷ lệ tử vong và biến dạng cột sống [21, 85]. Trong quá trình phát triển của phôi, tim phát triển hoàn chỉnh ở ngày thứ 3 sau khi ấu trùng phôi cá thoát nang và nhịp tim được quan sát thông qua kính hiển vi soi nổi.

Trong thời gian thí nghiệm, kết quả quan sát và ghi nhận những thay đổi về hình thái của ấu trùng cá ngựa vằn ở các nồng độ gây nhiễm Crom (VI), bao gồm những biểu hiện như nhịp tim nhanh và dị tật ở tim. Hình 3.14 và Phụ lục 2.3 là kết quả nhịp tim của cá ngựa vằn sau khi tiếp xúc với crom (VI) ở các ngày khác nhau từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7.



Hình 3.14. Biểu đồ thể hiện nhịp tim của ấu trùng cá ngựa vằn tại các nồng độ Crom (VI) ở các ngày.

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Kết quả từ Hình 3.14 cho thấy, nhịp tim của ấu trùng cá ngựa vằn bị tác động bởi nồng độ Crom (VI) trong các nhóm thí nghiệm ở các ngày khác nhau.

Ở ngày thứ 3, đã quan sát thấy sự tăng nhịp tim khi ấu trùng cá ngựa vằn tiếp xúc với Crom (VI) ở các nồng độ khác nhau so với nhóm đối chứng. Nhịp tim tăng

từ 2 đến 89 nhịp/phút ở các nồng độ Crom (VI) từ 0,1 µg/L đến 25 µg/L so với nhóm đối chứng, sự khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$).

Từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7, nhịp tim trung bình của ấu trùng cá ngựa vằn tiếp tục tăng theo nồng độ Crom (VI) tương tự như ngày thứ 3. Nhịp tim của ấu trùng cá ngựa vằn tăng từ 33 nhịp/phút đến 193,6 nhịp/phút, ở các nồng độ Crom (VI) từ 0,1 µg/L đến 25 µg/L so với nhóm đối chứng, sự khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$).

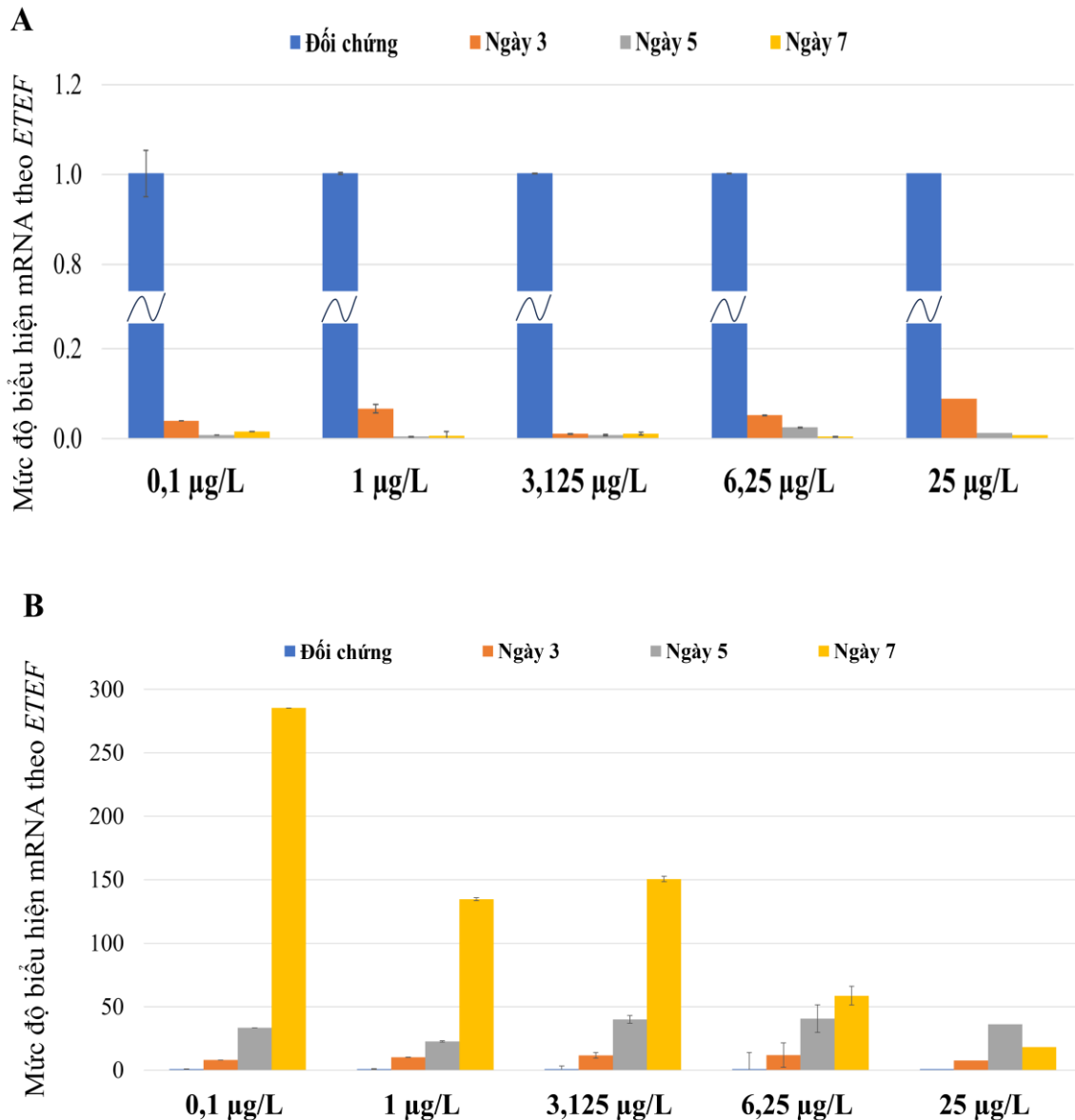
Crom (VI) đã ảnh hưởng đến nhịp tim của ấu trùng cá ngựa vằn theo một cách đặc biệt. Sự tăng nhịp tim có thể là một phản ứng tạm thời đầu tiên của cơ thể để thích nghi với tác động của Crom (VI) [21, 86, 87]. Tuy nhiên, khi tiếp tục tiếp xúc với Crom (VI) trong thời gian dài, cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn đã phản ứng chống lại sự tác động Crom (VI) xâm nhập bằng cách tăng tỷ lệ trao đổi chất và tăng cường hoạt động của tim. Điều này giúp cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn thích nghi với tác động của Crom (VI) trong môi trường nước.

Mặt khác, ấu trùng cá ngựa vằn trong giai đoạn sau khi nở không còn sự bao bọc của lớp màng của phôi nên ấu trùng tiếp xúc trực tiếp với môi trường bên ngoài, bên cạnh chuyển hóa chất dinh dưỡng từ noãn hoàn còn phải tìm nguồn thức ăn nên dẫn đến tăng quá trình trao đổi chất kéo theo sự tăng nhịp tim. Ấu trùng cá ngựa vằn tiếp xúc Crom (VI) trong thời gian dài làm tăng sự căng thẳng cho cá dẫn đến sự gia tăng cường độ trao đổi chất và tăng cường hoạt động của tim cá. Để thích nghi với môi trường, cơ thể ấu trùng có những phản ứng như gia tăng tỷ lệ trao đổi chất dẫn đến sự gia tăng nhịp tim [88]. Cơ chế gây độc chủ yếu của Crom (VI) là làm gián đoạn các quá trình ion hoá, điển hình là sự ức chế Na, K-ATPase (protein màng không thể thiếu trong việc vận chuyển Na^+ và K^+ qua màng sinh chất để thẩm thấu và khuếch tán qua màng) [89-91].

Từ kết quả cho thấy, ấu trùng cá ngựa vằn tiếp xúc Crom (VI) ngay từ giai đoạn phôi, Crom (VI) đã xâm nhập vào các cấu trúc bên trong phôi và tích lũy trong các nội quan của ấu trùng cá ngựa vằn. Crom (VI) được vận chuyển đến các cơ quan, tích lũy và gây rối loạn hoạt động các cơ quan, trong đó có tim. Sau khi thoát nang, ấu trùng cá ngựa vằn hấp thụ Crom (VI) trực tiếp qua mang, qua da, qua miệng dẫn tới hàm lượng Crom (VI) xâm nhập vào cơ thể ấu trùng cá ngày càng tăng gây căng thẳng cho sự phát triển của ấu trùng và làm tăng nhịp tim của chúng.

3.3. Crom (VI) ảnh hưởng đến sự thay đổi biểu hiện các gene đáp ứng và các gene kiểm soát tổn thương lên sự phát triển của cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

3.3.1. Gene *gadd45a* và *gadd45g*



Hình 3.15. Mức độ biểu hiện mRNA của gene *gadd45a* và *gadd45g* theo etef (A- gene *gadd45a*, B- gene *gadd45g*)

Kết quả phân tích Real time RT-PCR (Hình 3.15 A) cho thấy sự biểu hiện mRNA của gene *gadd45a* không có sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng. Điều này chứng tỏ rằng trước khi tiếp xúc với Crom (VI), mức biểu hiện của gene *gadd45a* là ổn định và không bị ảnh hưởng bởi Crom (VI) ở thời điểm này.

Ở ngày thứ 3, sự biểu hiện của gene *gadd45a* giảm mạnh ở tất cả các nhóm thí nghiệm khi tiếp xúc với Crom (VI). Sự biểu hiện của gene này tiếp tục duy trì ở mức

thấp ở ngày thứ 5 và ngày thứ 7 và không có sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm. Điều này chứng tỏ rằng Crom (VI) đã gây ảnh hưởng đến biểu hiện của gene *gadd45a* trong thời gian thử nghiệm.

Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ Crom (VI) càng cao đã ảnh hưởng xấu đến biểu hiện gene *gadd45a* gây ra sự giảm biểu hiện của gene này. Sự giảm biểu hiện này do sự ảnh hưởng của Crom (VI) đến quá trình điều tiết gene của tế bào, dẫn đến giảm đi sự phản ứng của tế bào trước sự tổn thương gene và khả năng sửa chữa tổn thương do Crom (VI) gây ra.

Kết quả phân tích Real time RT-PCR (Hình 3.15 B) cho thấy sự biểu hiện mRNA của gene *gadd45g* không có sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng. Điều này chứng tỏ rằng trước khi tiếp xúc với Crom (VI), mức biểu hiện của gene *gadd45g* là ổn định và không bị ảnh hưởng bởi Crom (VI) ở thời điểm này.

Ở ngày thứ 3, sự biểu hiện mRNA của gene *gadd45g* đã tăng ở tất cả các nhóm thí nghiệm trong quá trình tiếp xúc với Crom (VI). Sự tăng biểu hiện này là một phản ứng của tế bào trước tác động của Crom (VI) và liên quan đến việc tế bào phản ứng với sự tổn thương do Crom (VI) gây ra.

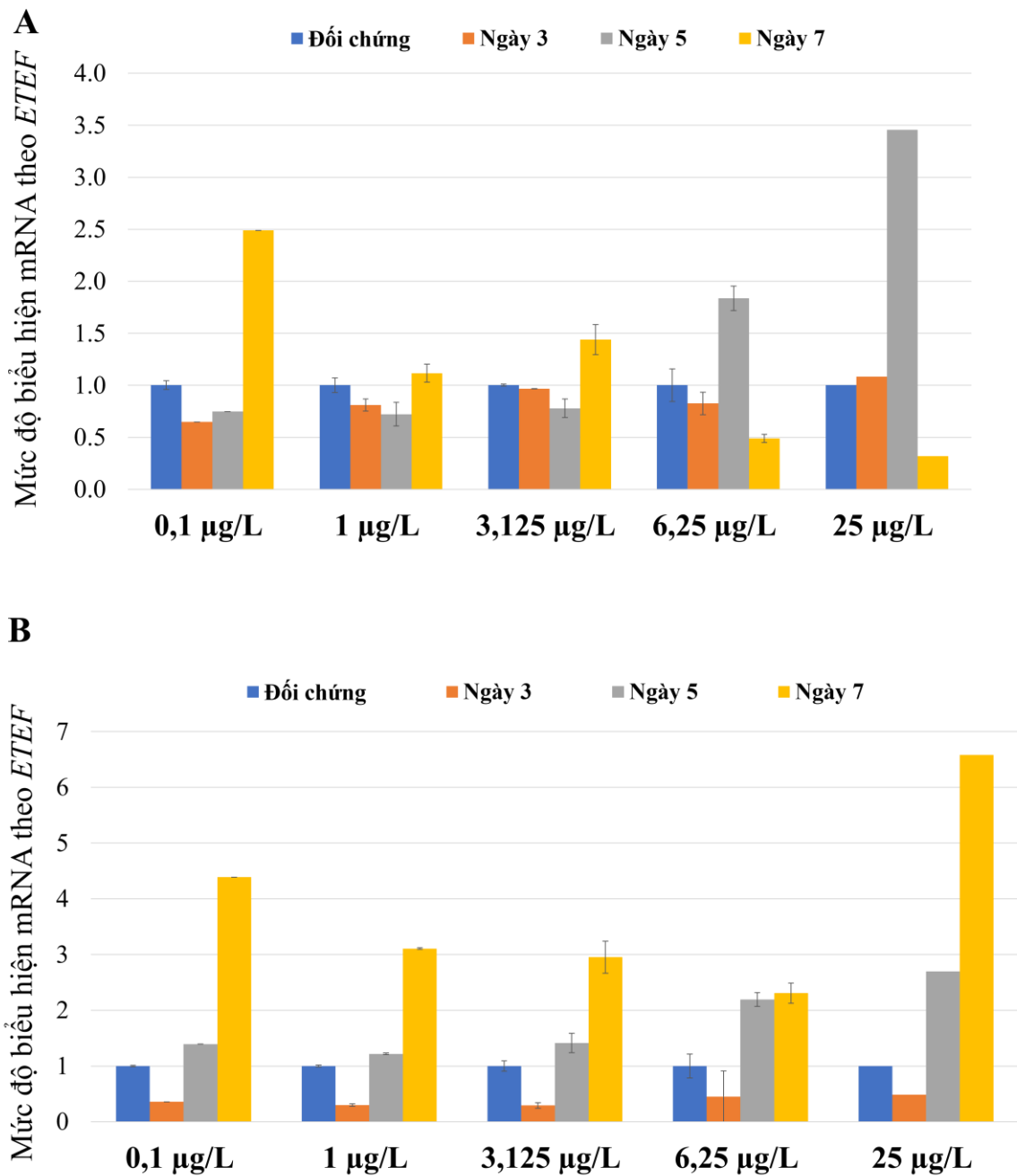
Ở ngày thứ 5, sự biểu hiện của gene *gadd45g* tiếp tục tăng so với ngày thứ 3 và nhóm đối chứng ở tất cả các nhóm thí nghiệm, nhưng không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm thí nghiệm. Điều này chứng tỏ rằng tác động của Crom (VI) vẫn tiếp tục gây tổn thương và gene *gadd45g* vẫn được kích hoạt để chống lại tổn thương do Crom (VI) gây ra.

Ở ngày thứ 7, sự biểu hiện của gene *gadd45g* tiếp tục tăng mạnh so với ngày 5 từ nồng độ Crom (VI) 0,1 $\mu\text{g/L}$ đến 6,25 $\mu\text{g/L}$. Tuy nhiên, ở nồng độ 25 $\mu\text{g/L}$ sự biểu hiện mRNA của gene này giảm so với ngày 5 ở các nhóm thí nghiệm, trong khi đó các nhóm thí nghiệm xử lý Crom (VI) nhận thấy sự tăng mạnh trong biểu hiện của gene này.

Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng nồng độ Crom (VI) cao làm tăng sự biểu hiện gene *gadd45g*, đặc biệt vào ngày thứ 7. Có thể thấy gene *gadd45g* thường liên quan đến phản ứng của tế bào để chống lại sự tổn thương và stress trong tế bào.

Sự tăng mạnh trong biểu hiện gene này là một phản ứng bảo vệ của tế bào trước tác động của Crom (VI) để cố gắng chống lại và khắc phục tổn thương gây ra bởi Crom (VI).

3.3.2. Gene *sod1* và *sod2*



Hình 3.16. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự biểu hiện phiên mã của gen *sod1* (A) và *sod2* (B) trên phôi cá ngựa vằn

Kết quả phân tích Real time RT-PCR (Hình 3.16 A) cho thấy sự biểu hiện mRNA của gene *sod1* không có sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng. Điều này chứng tỏ rằng trước khi tiếp xúc với Crom (VI), mức độ biểu hiện của gene *sod1* là ổn định và không bị ảnh hưởng bởi Crom (VI) ở thời điểm này.

Ở ngày thứ 3, sự biểu hiện mRNA của gene *sod1* giảm ở nồng độ Crom (VI) 0,1 µg/L so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, ở các nồng độ Crom (VI) cao hơn (1 µg/L; 3,125 µg/L; 6,25 µg/L và 25 µg/L) không có sự khác biệt đáng kể trong biểu hiện mRNA của gene này.

Ở Ngày thứ 5, sự biểu hiện mRNA của gene *sod1* tăng mạnh ở nồng độ Crom (VI) 6,25 µg/L và 25 µg/L, trong khi các nhóm còn lại không có sự khác biệt đáng kể trong biểu hiện mRNA của gene này.

Mặc dù vậy, sự biểu hiện mRNA của gene *sod1* tăng mạnh ở nồng độ Crom (VI) 6,25 µg/L và 25 µg/L ở ngày thứ 5 lại giảm mạnh ở ngày thứ 7, trong khi đó các nhóm còn lại đều nhận thấy sự tăng biểu hiện của gene này ở ngày thứ 7.

Kết quả này cho thấy rằng Crom (VI) có tác động biểu hiện của gene *sod1* ở một số nồng độ và thời điểm khác nhau. Sự biểu hiện của gene *sod1* có thể được tăng lên hoặc giảm xuống tùy thuộc vào nồng độ Crom (VI) và thời gian tiếp xúc.

Kết quả phân tích Real time RT-PCR (Hình 3.16 B) cũng cho thấy ở nhóm đối chứng sự biểu hiện của gene *sod2* này không có sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm. Điều này chứng tỏ rằng trước khi tiếp xúc với Crom (VI), mức độ biểu hiện của gene *sod2* là ổn định và không bị ảnh hưởng bởi Crom (VI) ở thời điểm này.

Ở ngày thứ 3, sự biểu hiện mRNA của gene *sod2* đều giảm ở tất cả các nhóm thí nghiệm so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, không có sự khác biệt trong biểu hiện của gene này giữa các nhóm thí nghiệm.

Ở ngày thứ 5, cho thấy sự biểu hiện của gene này tăng so với ngày thứ 3. Trong đó, sự biểu hiện mRNA của gene *sod2* của nồng độ Crom (VI) 6,25 µg/L và 25 µg/L cao hơn 3 nhóm thí nghiệm còn lại.

Sự khác biệt trong biểu hiện mRNA của gene *sod2* giữa các nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng thể hiện rõ ở ngày thứ 7. Ở ngày thứ 7, sự biểu hiện mRNA của gene *sod2* tăng so với các nhóm thí nghiệm ở ngày thứ 5.

Kết quả này cho thấy rằng Crom (VI) có tác động biểu hiện mRNA của gene *sod2* ở các nồng độ và thời điểm khác nhau. Sự biểu hiện mRNA của gene *sod2* có thể tăng lên ở một số nồng độ Crom (VI) và giảm xuống ở các nồng độ khác và điều này có thể liên quan đến cách Crom (VI) tác động đến quá trình điều tiết của gene này trong tế bào.

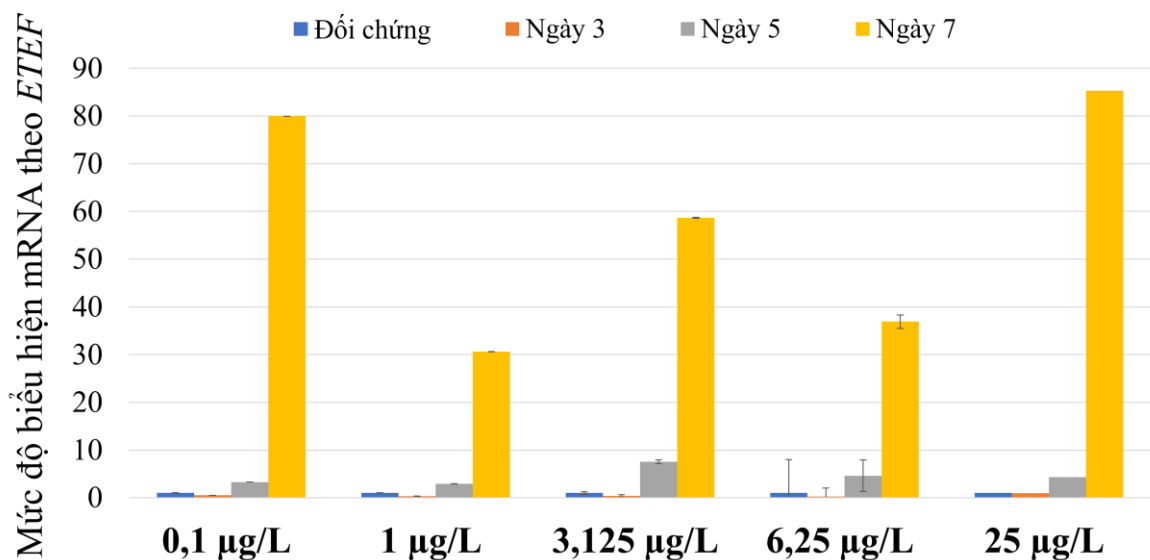
Kết quả nghiên cứu này cho thấy sự ảnh hưởng của Crom (VI) đối với sự phát triển của ấu trùng cá ngựa vằn có tác động trực tiếp đến biểu hiện gene *sod1* và *sod2*, hai gene này quan trọng tham gia vào quá trình kháng oxy hóa trong cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn.

Ở ngày thứ 3, cho thấy mức độ biểu hiện mRNA của gene *sod1* và *sod2* đều giảm trong cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn khi tiếp xúc với Crom (VI) trong các nhóm thí nghiệm. Điều này chứng tỏ Crom (VI) đã gây ra sự giảm biểu hiện của hai gene này, ảnh hưởng đến khả năng loại bỏ các gốc tự do và kháng oxy hóa trong cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn.

Tuy nhiên, chỉ có biểu hiện phiên mã của gene *sod2* được duy trì ở mức thấp là dấu hiệu của sự ảnh hưởng Crom (VI) gây kéo dài hoặc khó khăn trong việc phục hồi hệ thống kháng oxy hóa. Ngược lại gene *sod1* đã phục hồi và tăng biểu hiện vào ngày thứ 7. Sự tăng biểu hiện của gene *sod1* chỉ ra một phản ứng phục hồi của cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn sau khi tiếp xúc với Crom (VI) trong thời gian 7 ngày.

Điều này cho thấy, Crom (VI) đã ảnh hưởng đến quá trình kháng oxy hóa của ấu trùng cá ngựa vằn, làm thay đổi biểu hiện của gene *sod1* và *sod2*, ảnh hưởng này gây ra sự suy yếu của khả năng kháng oxy hóa trong cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn.

3.3.3. Gene *mt2*



Hình 3.17. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự biểu hiện phiên mã của gen *mt2* trên phôi cá ngựa vằn

Kết quả phân tích RT-PCR (Hình 3.17) cho thấy sự biểu hiện mRNA của gene *mt2*. Sự biểu hiện mRNA của gene *mt2* không có sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng.

Sự biểu hiện mRNA của gene này duy trì không đổi ở các nhóm thí nghiệm. Điều này chứng tỏ rằng trước khi tiếp xúc với Crom (VI), mức độ biểu hiện của gene *mt2* là ổn định và không bị ảnh hưởng bởi Crom (VI) ở thời điểm này.

Ở ngày thứ 3, sau khi tiếp xúc với Crom (VI), sự biểu hiện mRNA của gene *mt2* duy trì không đổi ở các nhóm thí nghiệm. Tuy nhiên, không có sự khác biệt trong biểu hiện của gene này trong các nhóm. Điều này chứng tỏ Crom (VI) chưa có ảnh hưởng đáng kể đến biểu hiện mRNA của gene *mt2* tại thời điểm này.

Ở ngày thứ 5, sự biểu hiện mRNA của gene *mt2* đều tăng ở các nhóm thí nghiệm, nhưng không có sự khác biệt trong biểu hiện mRNA của gene *mt2* trong các nhóm thí nghiệm.

Sự tăng biểu hiện này có thể liên quan đến một phản ứng tự bảo vệ của cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn để chống lại sự tác động của Crom (VI) đã xâm nhập vào cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn từ ngày thứ 3. Gene *mt2* được kích hoạt để tham gia vào quá trình loại bỏ hoặc kiểm soát độc tính của Crom (VI) trong cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn.

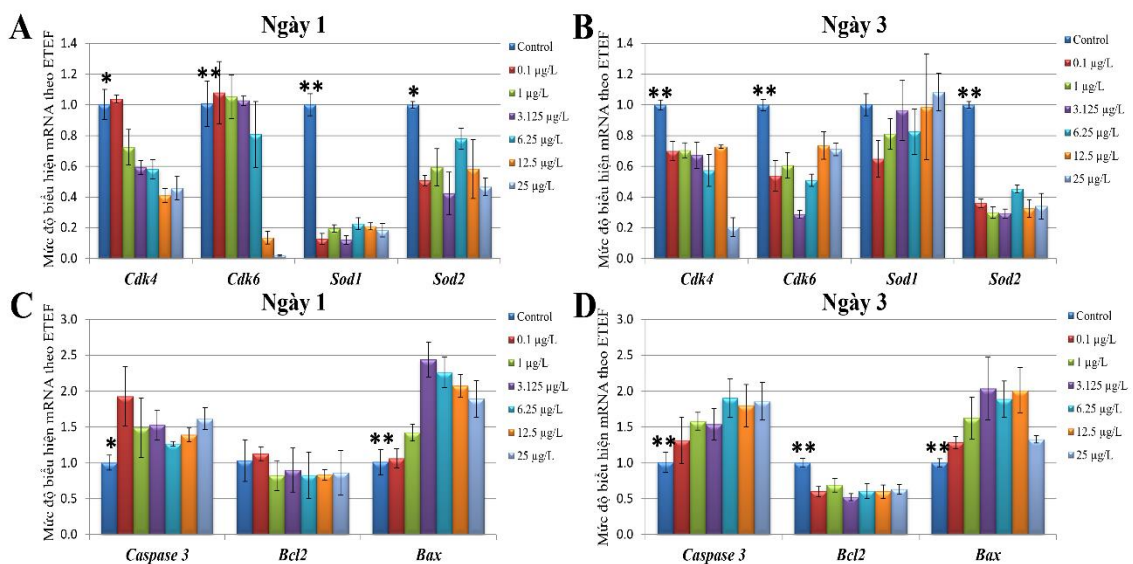
Ở ngày thứ 7, sự biểu hiện mRNA của gene *mt2* tăng so với ngày thứ 5 và có sự khác biệt trong biểu hiện mRNA của gene *mt2* giữa các nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng. Điều này chứng tỏ rằng Crom (VI) có ảnh hưởng đến biểu hiện mRNA của gene *mt2* sau một thời gian tiếp xúc và sự tăng biểu hiện này có thể đóng vai trò quan trọng trong cơ chế tự bảo vệ của cơ thể để chống lại độc tính của Crom (VI).

Kết quả nghiên cứu này đưa ra những thông tin quan trọng về vai trò của gene *mt2* trong cơ chế bảo vệ của cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn chống lại độc tính của Crom (VI), một chất gây hại phổ biến trong môi trường ô nhiễm ngày nay. Sự gia tăng biểu hiện của gene này theo thời gian và dưới sự ảnh hưởng của nồng độ Crom (VI) là một điểm đáng chú ý, đặc biệt là cơ chế tự vệ của sinh vật trong môi trường ô nhiễm. Gene *mt2* được tìm thấy đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ ấu trùng cá ngựa vằn khỏi tác động độc hại của Crom (VI). Sự tăng biểu hiện của gene này theo thời gian cho thấy một cơ chế điều chỉnh đáng kể trong phản ứng của cơ thể ấu trùng đối với môi trường ô nhiễm. Sự gia tăng này có thể được hiểu là một cơ chế phản ứng tự

nhiên của cơ thể sinh vật để đối phó với tác động tiềm ẩn của Crom (VI), một chất độc hại mà chúng có thể gặp phải trong môi trường sống của mình.

Điều này cung cấp thêm thông tin rộng hơn về cơ chế tự vệ của sinh vật đối với các tác nhân ô nhiễm trong môi trường, đặc biệt là trong bối cảnh của sự tăng cường ô nhiễm môi trường hiện nay. Hiểu biết về cơ chế này có thể đóng vai trò quan trọng trong việc phát triển các biện pháp bảo vệ môi trường hiệu quả và bền vững, cũng như trong việc nghiên cứu và phát triển các phương pháp mới để đối phó với ô nhiễm kim loại nặng trong môi trường tự nhiên.

3.3.4. Biểu hiện phiên mã của các gene liên quan đến chu kỳ tế bào, ức chế oxy hóa và quá trình apoptosis



Hình 3.18. Sự biểu hiện phiên mã các gene liên quan đến chu trình tế bào (*cdk4* và *cdk6*), kháng oxy hóa (*sod1* và *sod2*) và apoptosis (*caspase 3*, *bcl2*, *bax*).

Để kiểm tra các nguyên nhân tiềm ẩn gây ra tác động có hại của Crom (VI), kỹ thuật Real time RT-PCR được sử dụng để đánh giá biểu hiện phiên mã của các gene liên quan đến chu trình tế bào, gen liên quan đến stress oxy hóa và gen liên quan đến quá trình apoptosis ở cá ngừ vằn giai đoạn phôi và ấu trùng ở ngày thứ 1 và ngày thứ 3.

Kết quả đã chứng minh rằng, sau khi tiếp xúc với Crom (VI) ở nồng độ bằng hoặc cao hơn 1 µg/L (Hình 3.18), sự biểu hiện của các bản phiên mã *cdk4* giảm khi so sánh với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, tất cả các nhóm thí nghiệm tiếp xúc với Crom (VI) đều cho thấy biểu hiện *cdk4* thấp hơn so với nhóm đối chứng ở ngày 3.

Tương tự, biểu hiện của *cdk6* cũng giảm rõ rệt ở những nhóm thí nghiệm tiếp xúc với Crom (VI) ở các nồng độ 12,5 $\mu\text{g/L}$ crom và 25 $\mu\text{g/L}$ ở ngày thứ 1. Tuy nhiên, ở ngày thứ 3, đã có sự phục hồi trong biểu hiện *cdk6* trong các nhóm này.

Các nhóm thí nghiệm tiếp xúc với Crom (VI) cũng cho thấy biểu hiện của *cdk4* thấp hơn so với nhóm đối chứng ở ngày thứ 3.

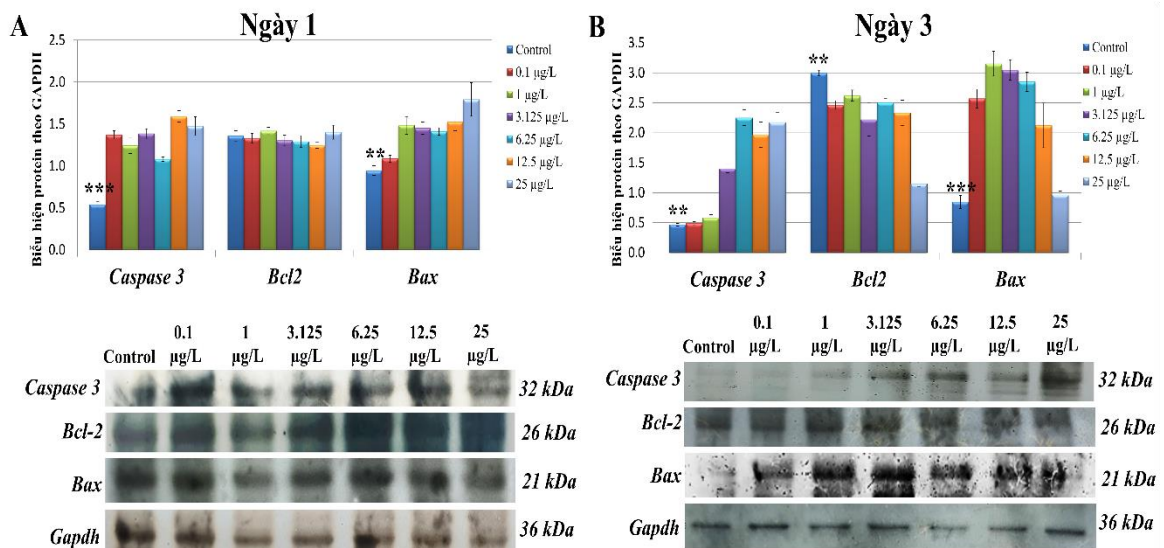
Các nhóm thí nghiệm tiếp xúc với Crom (VI) có mức độ biểu hiện của *sod1* đã tăng lên ở ngày thứ 3 sau khi biểu hiện giảm vào ngày thứ 1.

Biểu hiện phiên mã *sod2* ở các nhóm thí nghiệm tiếp xúc với Crom (VI) lại thấp hơn so với nhóm chứng ở ngày thứ 1 và ngày thứ 3.

Kỹ thuật Real-time RT-PCR cũng đã cho thấy rằng biểu hiện phiên mã của *caspase 3* và *bax* tăng lên ở phôi cá ngựa vằn tiếp xúc với Crom (VI) vào ngày thứ 1 (Hình 3.18 C). Tuy nhiên, không có sự khác biệt đáng kể về biểu hiện phiên mã của *bcl2* giữa nhóm đối chứng và các nhóm tiếp xúc với Crom (VI).

Sự tăng biểu hiện của *caspase 3* và *bax* ở phôi cá ngựa vằn đã tiếp xúc với Crom (VI) trong 3 ngày và sự điều chỉnh giảm biểu hiện của *bcl2* cũng được xác định trong các phôi này (Hình 3.18 D).

3.3.5. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự biểu hiện một số gene liên quan đến apoptosis và kháng oxy hóa trên cá ngựa vằn



Hình 3.19. Sự biểu hiện của các protein liên quan đến quá trình apoptosis theo Gapdh ở ngày thứ 1 và ngày thứ 3. A: ngày thứ 1; B: ngày thứ 3.

Phương pháp Western blot được áp dụng để phân tích sự biểu hiện của protein Bax giữa các nhóm thí nghiệm. Kết quả phân tích cho thấy phôi cá ngựa vằn ở ngày

thứ 1 (Hình 3.19) ở nhóm nồng độ Crom (VI) 0,1 μ g/L biểu hiện tăng Bax so với nhóm đối chứng, biểu hiện tăng này tiếp tục nhận thấy ở nồng độ Crom (VI) 1 μ g/L, nồng độ Crom (VI) 3,125 μ g/L và nồng độ Crom (VI) 6,25 μ g/L.

Sự biểu hiện của protein này không có sự khác biệt về mặt thống kê đối chứng và nồng độ Crom (VI) 0,1 μ g/L. Hơn nữa trong ngày thứ 1, sự biểu hiện trong một số protein liên quan đến quá trình apoptosis cũng được đánh giá bằng phương pháp Western blot.

Phương pháp Western blot được áp dụng để phân tích sự biểu hiện của protein Bcl2 giữa các nhóm thí nghiệm. Kết quả phân tích cho thấy phôi cá ở ngày thứ 1 (hình 3.19 A) ở nồng độ Crom (VI) 0,1 μ g/L biểu hiện tăng Bcl2 so với nhóm đối chứng, biểu hiện tăng này tiếp tục nhận thấy ở nồng độ Crom (VI) 1 μ g/L, nồng độ Crom (VI) 3,125 μ g/L và nồng độ Crom (VI) 6,25 μ g/L.

Sự biểu hiện của protein này không có sự khác biệt về mặt thống kê nồng độ Crom (VI) 1 μ g/L và 3,125 μ g/L. Sự biểu hiện của protein Bcl2 trong phôi cá ở nồng độ 6,25 μ g/L có xu hướng giảm so với các nhóm thí nghiệm, tuy nhiên vẫn cao hơn so với nhóm đối chứng. Hơn nữa trong ngày thứ 1, sự biểu hiện trong một số protein liên quan đến quá trình apoptosis cũng được đánh giá bằng phương pháp Western blot.

Phương pháp Western blot được áp dụng để phân tích sự biểu hiện của protein Caspase 3 giữa các nhóm thí nghiệm. Kết quả phân tích cho thấy phôi cá ở ngày thứ 1 (hình 3.19 A) cho thấy ở nồng độ Crom (VI) 0,1 μ g/L biểu hiện tăng Caspase 3 so với nhóm đối chứng, biểu hiện tăng này tiếp tục nhận thấy ở nồng độ Crom (VI) 1 μ g/L và 3,125 μ g/L. Sự biểu hiện của protein này không có sự khác biệt về mặt thống kê nồng độ Crom (VI) lần lượt là 0,1 μ g/L, 1 μ g/L và 3,125 μ g/L.

Sự biểu hiện của protein Caspase 3 trong phôi cá ở nồng độ 6,25 μ g/L có xu hướng giảm so với các nhóm thí nghiệm, tuy nhiên vẫn cao hơn so với nhóm đối chứng. Hơn nữa trong Ngày thứ 1, sự biểu hiện trong một số protein liên quan đến sự chết theo chương trình cũng được đánh giá bằng phương pháp Western blot.

Phương pháp western blot được áp dụng để phân tích sự biểu hiện của protein Bax giữa các nhóm thí nghiệm. Kết quả phân tích cho thấy phôi cá ở ngày thứ 3 (hình 3.19 B) ở nhóm nồng độ Crom (VI) 0,1 μ g/L biểu hiện tăng Bax so với nhóm đối chứng, biểu hiện tăng này tiếp tục nhận thấy ở nhóm nồng độ Crom (VI) 1 μ g/L,

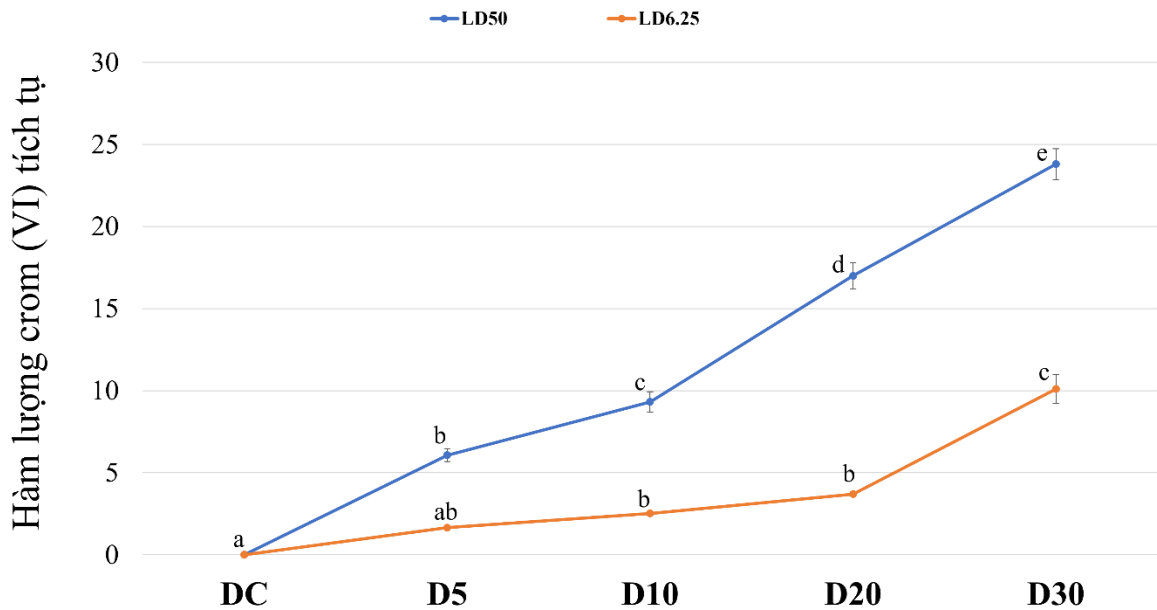
nhóm nồng độ Crom (VI) 3,125 $\mu\text{g/L}$ và nhóm nồng độ Crom (VI) 6,25 $\mu\text{g/L}$. Sự biểu hiện của protein này không có sự khác biệt về mặt thống kê nhóm nồng độ Crom (VI) 1 $\mu\text{g/L}$ và nhóm nồng độ Crom (VI) 6,25 $\mu\text{g/L}$. Hơn nữa trong ngày thứ 3, sự biểu hiện trong một số protein liên quan đến sự chết theo chương trình cũng được đánh giá bằng phương pháp Western blot.

Phương pháp Western blot được áp dụng để phân tích sự biểu hiện của protein Bcl2 giữa các nhóm thí nghiệm. Kết quả phân tích cho thấy phôi cá ở ngày 3 (Hình 3.19 B) cho thấy ở nhóm nồng độ Crom (VI) 0.1 $\mu\text{g/L}$ và nhóm đối chứng sự biểu hiện của protein này không có sự khác biệt về mặt thống kê, biểu hiện tăng nhận thấy ở nhóm nồng độ Crom (VI) 1 $\mu\text{g/L}$, nhóm nồng độ Crom (VI) 3.125 $\mu\text{g/L}$ và nhóm nồng độ Crom (VI) 6.25 $\mu\text{g/L}$ so với đối chứng. Hơn nữa trong ngày thứ 3, sự biểu hiện trong một số protein liên quan đến sự chết theo chương trình cũng được đánh giá bằng phương pháp Western blot.

Phương pháp western blot được áp dụng để phân tích sự biểu hiện của protein caspase 3 giữa các nhóm thí nghiệm. Kết quả phân tích cho thấy phôi cá ở ngày 3 (hình 3.19 B) cho thấy nhóm nồng độ Crom (VI) 0,1 $\mu\text{g/L}$ và nhóm đối chứng sự biểu hiện của protein này không có sự khác biệt về mặt thống kê, nhóm nồng độ Crom (VI) 1 $\mu\text{g/L}$ biểu hiện tăng Caspase 3 so với nhóm đối chứng, biểu hiện tăng này tiếp tục nhận thấy nhóm nồng độ Crom (VI) 3,125 $\mu\text{g/L}$ và nhóm nồng độ Crom (VI) 6,25 $\mu\text{g/L}$. Sự biểu hiện của protein Caspase 3 trong phôi cá ở nhóm nồng độ Crom (VI) 6,25 $\mu\text{g/L}$ có xu hướng tăng mạnh so với các nhóm thí nghiệm. Hơn nữa trong ngày thứ 3, sự biểu hiện trong một số protein liên quan đến sự chết theo chương trình cũng được đánh giá bằng phương pháp western blot.

3.4. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá ngựa vằn trưởng thành

3.4.1. Sự tích tụ Crom (VI) trong cơ thể cá ngựa vằn (*Danio rerio*)



Hình 3.20. Hàm lượng Crom (VI) tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn trưởng thành

Hàm lượng Crom (VI) tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn trong hai nhóm thí nghiệm được tính toán và thể hiện ở Hình 3.20. Kết quả chứng minh rằng cá ngựa vằn tiếp xúc càng lâu trong môi trường nước có chứa Crom (VI) thì hàm lượng Crom (VI) tích tụ trong toàn bộ cơ thể cá ngựa vằn ngày càng tăng.

Nhóm thí nghiệm thứ nhất: Ở cùng nồng độ LC_{50} , kết quả phân tích cho thấy hàm lượng tích tụ Crom (VI) tăng theo thời gian, với mức cao nhất đo được ở ngày 30 ($23,9 \pm 1,0$ mg/kg), hàm lượng Crom (VI) này cao gấp 4 lần so với ngày 5 ($6,1 \pm 0,4$ mg/kg), cao gấp 2,5 lần so với ngày 10 ($9,3 \pm 0,6$ mg/kg) và cao gấp 1,5 lần so với ngày 20 ($17 \pm 0,8$ mg/kg). Trong nhóm đối chứng tỷ lệ Crom (VI) tích lũy trong cơ thể cá là 0%, chứng tỏ lượng Crom (VI) không tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn.

Nhóm thí nghiệm thứ hai: Ở cùng nồng độ $LC_{6.25}$, lượng Crom (VI) tích tụ ở ngày 5, ngày 10 và ngày 20 lần lượt là $1,7 \pm 0,1$ mg/kg; $2,5 \pm 0,1$ mg/kg; $3,7 \pm 0,0$ mg/kg. Tuy nhiên không có sự khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức trên. Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng tích tụ Crom (VI) tăng theo thời gian tiếp xúc cao nhất ở ngày 30 ($10,1 \pm 0,9$ mg/kg) và cao gấp 5,9 lần so với ngày 5 ($1,7 \pm 0,1$ mg/kg), cao gấp 4,1 lần so với ngày 10 ($2,5 \pm 0,1$ mg/kg) và cao gấp 2,7 lần so với ngày 20 ($3,7 \pm 0,0$

mg/kg). Đối với lô đối chứng tỷ lệ là 0%, chúng tỏ lượng Crom (VI) không tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn.

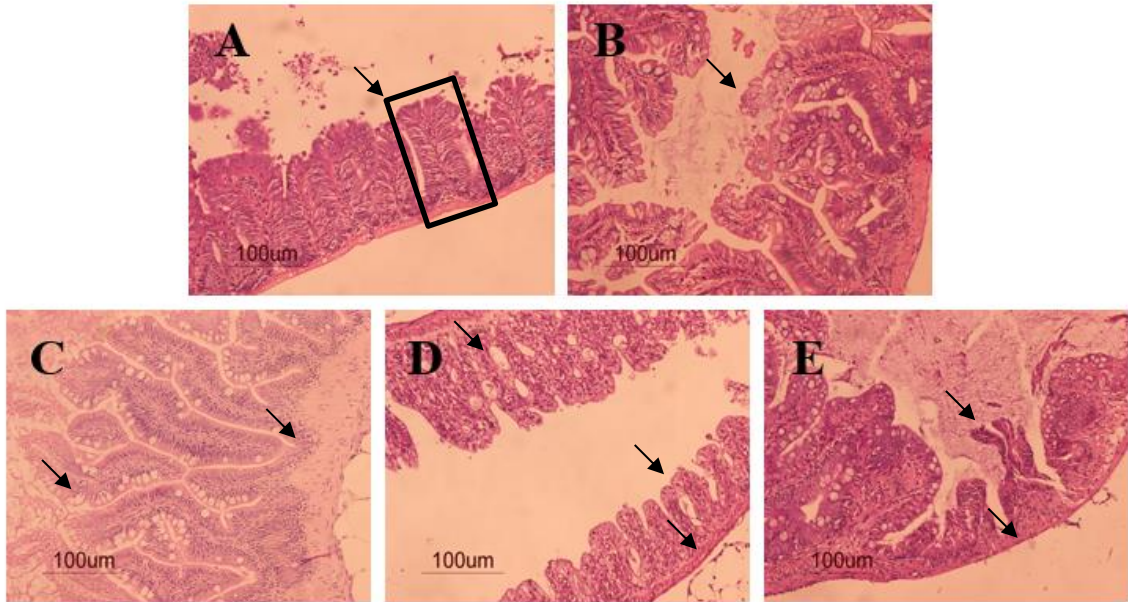
Bên cạnh nghiên cứu về sự tích tụ Crom (VI) trong cơ thể cá ngựa vằn, có nhiều nghiên cứu khác đã đánh giá sự tích tụ kim loại nặng khác nhau trong cơ thể cá sống trong vùng nước bị ô nhiễm kim loại nặng cho thấy một lượng các kim loại nặng khác nhau có thể tích tụ trong các bộ phận khác nhau của cá mà không gây tử vong [92]. Sinh vật thủy sinh tích lũy Crom (VI) trong cơ thể thông qua chuỗi thức ăn cũng như bị ảnh hưởng bởi môi trường nước sinh sống bị ô nhiễm [93]. Theo khảo sát khả năng tích tụ Cadmium trên cá ngựa vằn - *Danio rerio* (Hamilton, 1822) được trình bày bởi Nguyễn Thị Thương Huyền giải thích rằng, nội quan là nơi hấp thu nhanh và mạnh kim loại Cd^{2+} nhất; Sự cạnh tranh giữa Cd^{2+} và Ca^{2+} có trong xương là 2 đại lượng tỷ lệ nghịch với nhau làm cho hàm lượng Cd^{2+} tích tụ trong xương ngày càng tăng dần dẫn đến sự tổn thương xương đốt sống như loãng xương, cong xương sống; Sự tích tụ Cd^{2+} trong cơ là thấp nhất so với nội quan và xương [94]. Theo kết quả nghiên cứu của M.N.R Rosli (2018) về Phân tích tích lũy kim loại nặng trong cá từ vùng biển ven bờ Terengganu, Malaysia, sự tích lũy kim loại cao xảy ra ở gan và mô mang so với mô cơ của cá, nghiên cứu này đã cho thấy rằng mức độ tích lũy kim loại không độc hại hoặc thiết yếu (Cu, Mn và Zn) trong cá cao hơn so với kim loại độc hại hoặc không thiết yếu (Cd) [95]. Theo Tulasi et al., 1992, Sự phơi nhiễm của một số loài cá nước ngọt với một số nồng độ chì tích lũy đáng kể trong máu, thận, gan và não, tích lũy tương đối ít trong các mô cơ và buồng trứng [96].

3.4.2. Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên cấu trúc mô cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

Sự tích tụ của Crom (VI) trong cơ thể cá ngựa vằn không chỉ gây ra các tổn thương đối với các mô tế bào mà còn gây ra sự thay đổi đáng kể trong cấu trúc của chúng. Nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc tiếp xúc với Crom (VI) có thể dẫn đến sự biến đổi của các mô quan trọng như mô ruột, mô gan và mô buồng trứng. Điều này có thể có những hậu quả đáng lo ngại về sức khỏe của cá ngựa vằn và có thể ảnh hưởng đến cả cấu trúc và chức năng của các cơ quan và mô trong cơ thể chúng.

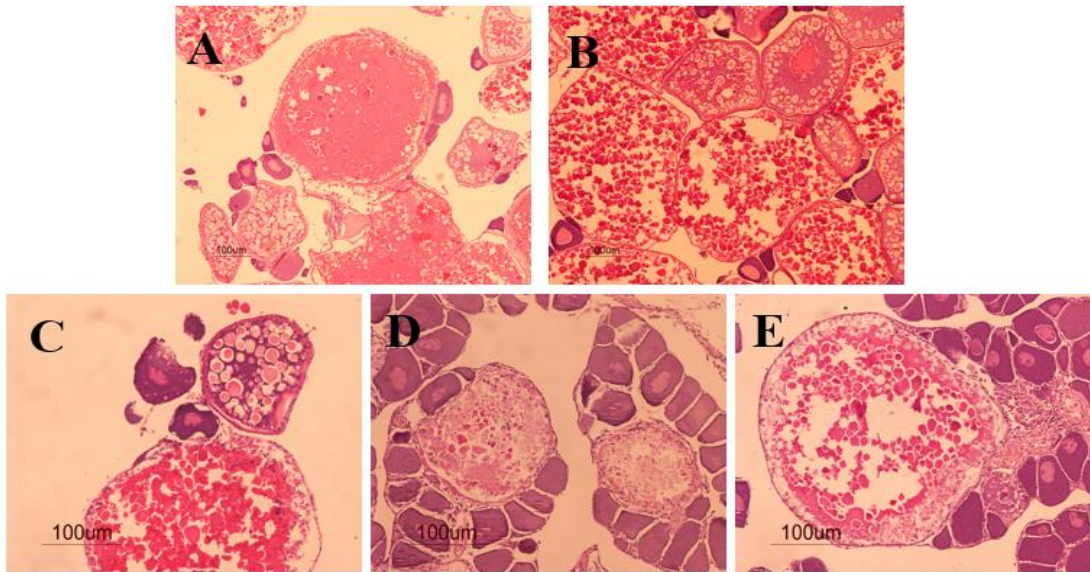
Sự thay đổi cấu trúc của mô ruột có thể ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng và quá trình trao đổi chất của cá ngựa vằn, có thể dẫn đến sự suy giảm về sức khỏe tổng thể. Sự tổn thương mô gan có thể gây ra các vấn đề về chức năng gan

và quá trình loại bỏ chất độc hại khỏi cơ thể. Ngoài ra, sự biến đổi của mô buồng trứng có thể gây ra các vấn đề về sinh sản và sinh sản, ảnh hưởng đến sự phát triển và tồn tại của các thế hệ tương lai của loài.



Hình 3.21. Hình cắt lớp mô ruột cá ngừ vằn sau khi tiếp xúc với nồng độ Crom (VI), độ phóng đại 200, thước đo 100µm. A: Hình cắt lớp mô nhóm đối chứng; B, C, D, E: Hình cắt lớp mô ruột cá ngừ vằn lần lượt của các ngày 5, 10, 20 và 30.

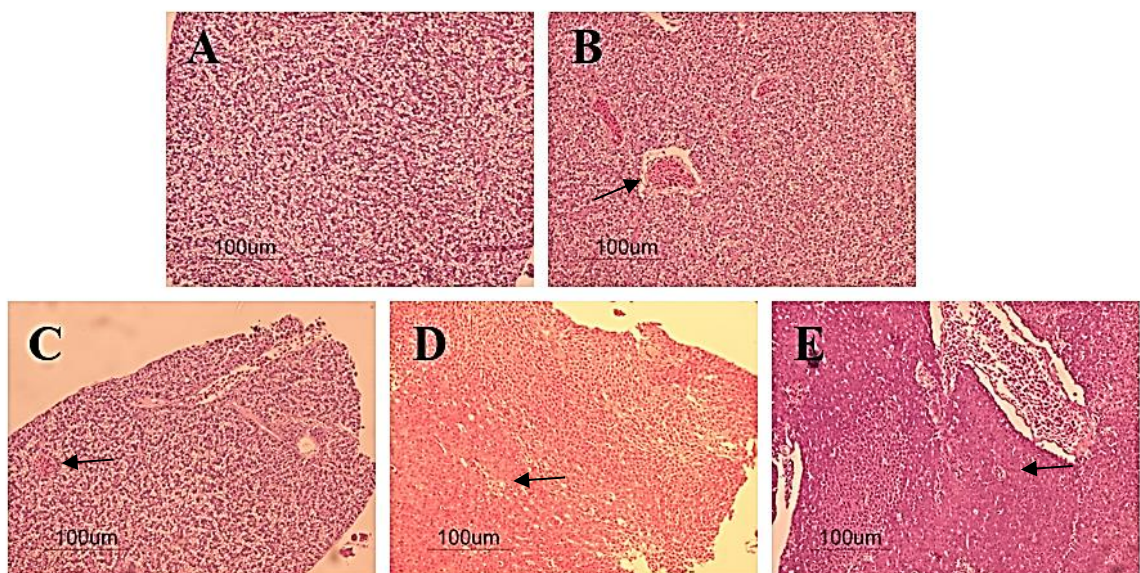
Kết quả cắt lát mô ruột Hình 3.21 được quan sát dưới kính hiển vi cho thấy cấu trúc mô ruột của cá ngừ vằn có sự thay đổi hình dạng và cấu trúc của vi lông nhung tăng theo thời gian tiếp xúc với Crom (VI) ở nồng độ LC_{50} . Ở ngày 5 đến ngày 20 (Hình 3.21 B, 3.21 C, 3.21 D) lông nhung tăng so với nhóm đối chứng và dày đặc nhất ở ngày 30 (Hình 3.21 E). Ngoài ra, các mô mỡ trong mô ruột giảm theo thời gian tiếp xúc với Crom (VI).



Hình 3.22. Hình cắt lát mô buồng trứng cá ngựa vằn khi tiếp xúc với nồng độ Crom (VI), độ phóng đại 200, thước đo 100µm.

A: Hình cắt lát mô buồng trứng của nhóm đối chứng; B, C, D, E: Hình cắt lát mô buồng trứng lần lượt của các ngày 5, 10, 20 và 30

Kết quả cắt lát mô buồng trứng (Hình 3.22) được quan sát bằng kính hiển vi cho thấy cấu trúc mô buồng trứng cá ngựa vằn có sự thay đổi khi tiếp xúc với Crom (VI) ở nồng độ LD₅₀. Thời gian tiếp xúc càng lâu thì tỷ lệ các hạt lipid càng giảm. Ở ngày 5 đến ngày 30 tỷ lệ các hạt lipid giảm đều so với nhóm đối chứng.



Hình 3.23. Hình cắt lát mô gan cá ngựa vằn khi tiếp xúc với crom (VI) độ phóng đại 100, thước đo 100µm.

A: Hình cắt lớp mô gan của nhóm đối chứng; B, C, D, E: Hình cắt lớp mô gan lần lượt của các ngày 5, 10, 20 và 30

Kết quả cắt lát mô gan (Hình 3.23) được quan sát bằng kính hiển vi cho thấy cấu trúc mô gan cá ngựa vằn có sự thay đổi khi tiếp xúc với Crom (VI) ở nồng độ LD₅₀. Ở ngày 5 đến ngày 30 xuất hiện các ổ viêm và ổ viêm càng nặng theo thời gian tiếp xúc với Crom (VI).

Nghiên cứu này cho thấy Crom (VI) tác động lên các cấu trúc nội quan, bao gồm những thay đổi mô ruột, gan và mô buồng trứng của cá ngựa vằn khi cá bị phơi nhiễm với Crom (VI).

Kết quả quan sát cho thấy rõ sự tác động của Crom (VI) lên cấu trúc mô cá ngựa vằn, bao gồm sự thay đổi trong cấu trúc lông nhung ruột, sự hình thành các ổ viêm trong gan và sự biến đổi của lipid trong buồng trứng. Theo Tulasi. Al, 1992, sự phơi nhiễm cá nước ngọt *Anabas testudineus* đến mức giảm (5 ppm) nồng độ Pb(NO₃)₂ 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 và 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 [96]. 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 nhiễm kim loại [97]. 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 [87]. 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.

Theo kết quả nghiên cứu, lông nhung trong ruột tăng lên và mô mỡ giảm dần theo thời gian tiếp xúc crom (VI). Trong nghiên cứu của Chhaya Bhatnagar và cộng sự (2007), tác động thoái hóa là rõ ràng trong niêm mạc và nhung mao của ruột [98]. 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 [99]. Theo El-Sayed Mohamed Younis và cộng sự (2013), những thay đổi mô bệnh học quan sát thấy trong ruột của cả hai loài cá: *Oreochromis niloticus* và *Lates niloticus* cho thấy những thay đổi nghiêm trọng về thoái hóa và hoại tử ở niêm mạc ruột [100]. Phù giữa niêm mạc và niêm mạc có thể là kết quả của sự hấp thụ kim loại độc hại [101].

Sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên sức khỏe con người và sinh vật không thể đoán trước được. Crom (VI) đi vào cơ thể qua nhiều con đường khác nhau, khả năng hấp thụ của tiêu hóa đã phát tán các chất độc hại đến toàn bộ phận trong cơ thể, ảnh hưởng đến sức khỏe của con người và sinh vật. Nghiên cứu này đã xác định sự hiện diện của kim loại nặng và tác động tiêu cực của chúng đối với cơ thể cá ngựa vằn, chứng tỏ mối đe dọa đáng kể đối với cả sinh vật và sức khỏe của con người. Kết quả thu được từ nghiên cứu này sẽ là cơ sở để đóng góp cho các nghiên cứu tiếp theo theo hướng cải thiện môi trường nhằm bảo vệ sức khỏe con người và động vật.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá ngựa vằn bao gồm tỷ lệ sống của phôi, nhịp tim, hàm lượng Crom (VI) tích tụ trong cơ thể cá, sự tác động của Crom (VI) lên cấu trúc nội quan, cũng như sự thay đổi biểu hiện các gene liên quan đến quá trình stress oxy hóa và apoptosis được thể hiện cụ thể như sau:

Theo kết quả nghiên cứu, đối với việc tiếp xúc với Crom (VI) ở nồng độ thấp (0,1 µg/L và 1 µg/L), không có tác động đáng kể nào ảnh hưởng đến sự sống sót của phôi trong suốt quá trình phát triển phôi. Tuy nhiên, việc tiếp xúc với Crom (VI) ở nồng độ cao hơn ($\geq 3,125$ µg/L) đã làm giảm tỷ lệ sống của phôi cá ngựa vằn từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7. Những phát hiện này góp phần hiểu biết của chúng ta về cách Crom (VI) ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn. Tại nồng độ Crom (VI) 25 µg/L là nồng độ cao nhất mà phôi cá ngựa vằn có thể phát triển (đến ngày thứ 7). Tiếp xúc Crom (VI) ở nồng độ thấp hơn, quá trình nở của phôi diễn ra vào ngày thứ 3, trong khi quá trình nở của phôi ở nồng độ 25 µg/L vào ngày thứ 5. Sự gia tăng nồng độ Crom (VI) có liên quan đến việc giảm chiều dài cơ thể của ấu trùng cá ngựa vằn từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7; điều này đặc biệt xảy ra ở nồng độ Crom (VI) 25 µg/L. Kết quả này cho thấy nồng độ Crom (VI) cao gây ra sự trì hoãn trong quá trình nở phôi của cá ngựa vằn. Ngoài ra, nhịp tim tăng rõ rệt đã được quan sát thấy khi phơi nhiễm với Crom (VI), đặc biệt là ở nồng độ cao.

Việc tiếp xúc với Crom (VI) trong thời ngắn hoặc dài làm thay đổi biểu hiện của một số gene liên quan đến quá trình apoptosis và các gene đáp ứng kháng oxy hóa. Những kết quả cho thấy rằng việc tiếp xúc với Crom (VI) làm thay đổi các biểu hiện phiên mã, điều này phá vỡ hệ thống chống oxy hóa trong ấu trùng cá ngựa vằn. Crom (VI) làm suy yếu các biểu hiện phiên mã, do đó dẫn đến sự chậm phát triển của phôi cá ngựa vằn. Các phân tích Realtime RT-PCR và Western blot đã chứng minh rằng việc tiếp xúc với Crom (VI) gây ra sự điều chỉnh tăng của Caspase 3 và Bax, và sự điều chỉnh giảm Bcl2. Ngoài ra, phôi tiếp xúc với Crom (VI) cho thấy quá trình điều hòa tăng Bax và điều hòa giảm Bcl2. Những kết quả này chỉ ra rằng sự gia tăng quá trình apoptosis xảy ra ở phôi và ấu trùng khi tiếp xúc với Crom (VI), chính điều này đã làm giảm sự phát triển của chúng.

Cá ngựa vằn tiếp xúc với Crom (VI) có khả năng tích tụ Crom (VI) trong cơ thể và tăng theo thời gian tiếp xúc. Sự tích tụ Crom (VI) trong cơ thể cá ngựa vằn gây ảnh hưởng đến cấu trúc nội quan dẫn đến viêm gan, tăng lông nhung trong ruột làm cho lông nhung trở nên dày đặc hơn và giảm các hạt lipid trong mô buồng trứng.

Kiến nghị

Phân tích sự biểu hiện các gene liên quan đến quá trình apoptosis và kháng oxy hóa trên cá ngựa vằn (*Danio rerio*) trưởng thành.

Đánh giá Crom (VI) lên cấu trúc và chức năng mô khác như thận, tinh hoàn.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

Dang, K. D., Ho, C. N. Q., Van, H. D., Dinh, S. T., Nguyen, Q. T. T., Nguyen, T. T. T., ... & Le, L. T. (2023). Hexavalent Chromium Inhibited Zebrafish Embryo Development by Altering Apoptosis-and Antioxidant-Related Genes. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(8), 6916-6926. (SCI, Q2)

Dang Dang Khoa, Nguyen Thi Phuong Thao, Le Thanh Long. Effects of hexavalent chromium on structure of liver, intestine and ovary of Zebra fish. *International Journal of Biosciences*. 2023, 23 (3): pp 164-169.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sánchez-Olivares, M.A., J.C. Gaytán-Oyarzun, A.J. Gordillo-Martínez, F. Prieto-García, R.B.E. Cabrera-Cruz, *Toxicity and teratogenicity in zebrafish *Danio rerio* embryos exposed to chromium*. Latin american journal of aquatic research, 2021. 49(2): p. 289-298.
2. Grevatt, P., *US Environmental Protection Agency, Toxicological review of hexavalent chromium*. National Center for Environmental Assessments, Office of Research and Development, Washington, DC, 1998.
3. Dhal, B., H. Thatoi, N. Das, B. Pandey, *Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review*. Journal of hazardous materials, 2013. 250: p. 272-291.
4. Chiu, A., X. Shi, W. Lee, R. Hill, T. Wakeman, A. Katz, B. Xu, N. Dalal, J. Robertson, C. Chen, *Review of chromium (VI) apoptosis, cell-cycle-arrest, and carcinogenesis*. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 2010. 28(3): p. 188-230.
5. Sivakumar, K.K., J.A. Stanley, J.A. Arosh, M.E. Pepling, R.C. Burghardt, S.K. Banu, *Prenatal exposure to chromium induces early reproductive senescence by increasing germ cell apoptosis and advancing germ cell cyst breakdown in the F1 offspring*. Developmental biology, 2014. 388(1): p. 22-34.
6. Das, J., M.-H. Kang, E. Kim, D.-N. Kwon, Y.-J. Choi, J.-H. Kim, *Hexavalent chromium induces apoptosis in male somatic and spermatogonial stem cells via redox imbalance*. Scientific reports, 2015. 5(1): p. 13921.
7. Wuri, L., R.C. Burghardt, J.A. Arosh, C.R. Long, S.K. Banu, *Hexavalent Chromium Disrupts Oocyte Development in Rats by Elevating Oxidative Stress, DNA Double-Strand Breaks, Microtubule Disruption, and Aberrant Segregation of Chromosomes*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. 24(12): p. 10003.
8. Banu, S.K., J.A. Stanley, K.K. Sivakumar, J.A. Arosh, R.J. Taylor, R.C. Burghardt, *Chromium VI– Induced developmental toxicity of placenta is mediated through spatiotemporal dysregulation of cell survival and apoptotic proteins*. Reproductive Toxicology, 2017. 68: p. 171-190.
9. Bambino, K. J. Chu, *Zebrafish in Toxicology and Environmental Health*. Curr Top Dev Biol, 2017. 124: p. 331-367.
10. Duruibe, Ogwuegbu, Ekwurugwu, *Heavy metal pollution and human biotoxic effects*. International Journal of physical sciences, 2007. 2(5): p. 112-118.
11. Ziemacki, G., G. Viviano, F. Merli, *Heavy metals: sources and environmental presence*. Annali dell'Istituto superiore di sanita, 1989. 25(3): p. 531-535.
12. Chai, L., S. Huang, Z. Yang, B. Peng, Y. Huang, Y. Chen, *Cr (VI) remediation by indigenous bacteria in soils contaminated by chromium-containing slag*. J Hazard Mater, 2009. 167(1-3): p. 516-22.
13. Jones, I., P. Kille, G. Sweeney, *Cadmium delays growth hormone expression during rainbow trout development*. Journal of Fish Biology, 2001. 59(4): p. 1015-1022.
14. Ma, W., L. Wang, Y. He, Y. Yan, *Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanense* during*

- acute exposure to waterborne cadmium*. Environmental Toxicology: An International Journal, 2008. 23(3): p. 393-400.
15. Kim, B.-M., B. Kim, S.-E. Nam, H.-J. Eom, S. Lee, K. Kim, J.-S. Rhee, *Reductive transformation of hexavalent chromium in ice decreases chromium toxicity in aquatic animals*. Environmental Science & Technology, 2022. 56(6): p. 3503-3513.
 16. Costa, M., *Toxicity and carcinogenicity of Cr (VI) in animal models and humans*. Critical reviews in toxicology, 1997. 27(5): p. 431-442.
 17. Matz, C.J., R.G. Treble, P.H. Krone, *Accumulation and elimination of cadmium in larval stage zebrafish following acute exposure*. Ecotoxicology and environmental safety, 2007. 66(1): p. 44-48.
 18. Tian, Y., Q. Zhu, J. Yuan, R. Kneepkens, Y. Yue, C. Zhang, *Direct embryotoxicity of chromium (III) exposure during preimplantation development*. Journal of Reproduction and Development, 2021. 67(4): p. 283-290.
 19. Kimmel, C.B., R.M. Warga, T.F. Schilling, *Origin and organization of the zebrafish fate map*. Development, 1990. 108(4): p. 581-594.
 20. Domingues, I., R. Oliveira, J. Lourenço, C.K. Grisolia, S. Mendo, A. Soares, *Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2010. 152(3): p. 338-345.
 21. Kimmel, C.B., W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, T.F. Schilling, *Stages of embryonic development of the zebrafish*. Developmental dynamics, 1995. 203(3): p. 253-310.
 22. Driessen, M., A.S. Kienhuis, J.L. Pennings, T.E. Pronk, E.-J. van de Brandhof, M. Roodbergen, H.P. Spaink, B. van de Water, L.T. van der Ven, *Exploring the zebrafish embryo as an alternative model for the evaluation of liver toxicity by histopathology and expression profiling*. Archives of toxicology, 2013. 87: p. 807-823.
 23. Howe, K., M.D. Clark, C.F. Torroja, J. Turrance, C. Berthelot, M. Muffato, J.E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J.C. Barrett, R. Koch, G.J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L.T. Quintais, J.A. Guerra-Assuncao, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J.H. Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langlely, S.F. Maguire, G.K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J. Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Elliot, G. Threadgold, G. Harden, D. Ware, S. Begum, B. Mortimore, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Lloyd, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K. Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D. Manthravadi, S. Nichol, G. Barker, S. Whitehead, M. Kay, J. Brown, C. Murnane, E. Gray, M. Humphries, N. Sycamore, D. Barker, D. Saunders, J.

- Wallis, A. Babbage, S. Hammond, M. Mashreghi-Mohammadi, L. Barr, S. Martin, P. Wray, A. Ellington, N. Matthews, M. Ellwood, R. Woodmansey, G. Clark, J. Cooper, A. Tromans, D. Grafham, C. Skuce, R. Pandian, R. Andrews, E. Harrison, A. Kimberley, J. Garnett, N. Fosker, R. Hall, P. Garner, D. Kelly, C. Bird, S. Palmer, I. Gehring, A. Berger, C.M. Dooley, Z. Ersan-Urun, C. Eser, H. Geiger, M. Geisler, L. Karotki, A. Kirn, J. Konantz, M. Konantz, M. Oberlander, S. Rudolph-Geiger, M. Teucke, C. Lanz, G. Raddatz, K. Osoegawa, B. Zhu, A. Rapp, S. Widaa, C. Langford, F. Yang, S.C. Schuster, N.P. Carter, J. Harrow, Z. Ning, J. Herrero, S.M. Searle, A. Enright, R. Geisler, R.H. Plasterk, C. Lee, M. Westerfield, P.J. de Jong, L.I. Zon, J.H. Postlethwait, C. Nusslein-Volhard, T.J. Hubbard, H. Roest Crollius, J. Rogers D.L. Stemple, *The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome*. *Nature*, 2013. 496(7446): p. 498-503.
24. Hubbard, T.J., B.L. Aken, S. Ayling, B. Ballester, K. Beal, E. Bragin, S. Brent, Y. Chen, P. Clapham, L. Clarke, *Ensembl 2009*. *Nucleic acids research*, 2009. 37(suppl_1): p. D690-D697.
 25. Bradley, K.M., J.B. Elmore, J.P. Breyer, B.L. Yaspan, J.R. Jessen, E.W. Knapik, J.R. Smith, *A major zebrafish polymorphism resource for genetic mapping*. *Genome biology*, 2007. 8(4): p. 1-10.
 26. Murphey, R.D., H.M. Stern, C.T. Straub, L.I.J.C.b. Zon, d. design, *A chemical genetic screen for cell cycle inhibitors in zebrafish embryos*. 2006. 68(4): p. 213-219.
 27. Kimmel, *Stages of embryonic development of the zebrafish*. 1995. 203(3): p. 253-310.
 28. Modarresi Chahardehi, A., H. Arsad, V. Lim, *Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants*. *Plants*, 2020. 9(10): p. 1345.
 29. Avanesov, A. J. Malicki, *Analysis of the retina in the zebrafish model*, in *Methods in cell biology*. 2010, Elsevier. p. 153-204.
 30. Scholz, S., S. Fischer, U. Gündel, E. Küster, T. Luckenbach, D. Voelker, *The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing*. *Environmental science and pollution research*, 2008. 15: p. 394-404.
 31. Riggio, M., S. Filosa, E. Parisi, R. Scudiero, *Changes in zinc, copper and metallothionein contents during oocyte growth and early development of the teleost Danio rerio (zebrafish)*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2003. 135(2): p. 191-196.
 32. Zhao, X., S. Wang, Y. Wu, H. You, L. Lv, *Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryonal larval zebrafish*. *Aquatic toxicology*, 2013. 136: p. 49-59.
 33. Kienle, C., H.-R. Köhler, A. Gerhardt, *Behavioural and developmental toxicity of chlorpyrifos and nickel chloride to zebrafish (Danio rerio) embryos and larvae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009. 72(6): p. 1740-1747.
 34. Anandhan, R., S. Hemalatha, V. Kavitha, G. Bhuyan, *Effect of aluminium on development of Zebrafish, Brachydanio rerio (Ham.)*. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 2013. 4(4).

35. Pandey, G. S. Madhuri, *Heavy metals causing toxicity in animals and fishes*. Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences, 2014. 2(2): p. 17-23.
36. Ansari, S., B. Ansari, B. Ansari, *Effects of heavy metals on the embryo and larvae of Zebrafish, Danio rerio (Cyprinidae)*. Scholars Academic Journal of Biosciences, 2015. 3(1b): p. 52-56.
37. Zheng, J.-L., S.-S. Yuan, C.-W. Wu, W.-Y. Li, *Chronic waterborne zinc and cadmium exposures induced different responses towards oxidative stress in the liver of zebrafish*. Aquatic Toxicology, 2016. 177: p. 261-268.
38. Chen, Y., J. Li, Q. Zhou, Z. Liu, Q. Li, *Hexavalent chromium amplifies the developmental toxicity of graphene oxide during zebrafish embryogenesis*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021. 208: p. 111487.
39. McKim, J.M., *Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity*. Journal of the Fisheries Board of Canada, 1977. 34(8): p. 1148-1154.
40. Strähle, U., S. Scholz, R. Geisler, P. Greiner, H. Hollert, S. Rastegar, A. Schumacher, I. Selderslaghs, C. Weiss, H. Witters, *Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations*. Reproductive Toxicology, 2012. 33(2): p. 128-132.
41. Berger, J. P.D. Currie, *Zebrafish models flex their muscles to shed light on muscular dystrophies*. Disease models & mechanisms, 2012. 5(6): p. 726-732.
42. Zhang, C., J.M. Frazier, H. Chen, Y. Liu, J.-A. Lee, G.J. Cole, *Molecular and morphological changes in zebrafish following transient ethanol exposure during defined developmental stages*. Neurotoxicology and teratology, 2014. 44: p. 70-80.
43. Lammer, E., G. Carr, K. Wendler, J. Rawlings, S. Belanger, T. Braunbeck, *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, 2009. 149(2): p. 196-209.
44. Rottbauer, W., K. Baker, Z.G. Wo, M.-A.P. Mohideen, H.F. Cantiello, M.C. Fishman, *Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-type calcium channel $\alpha 1$ subunit*. Developmental cell, 2001. 1(2): p. 265-275.
45. Armstrong, F. L. Que Jr, *Current opinion in chemical biology*. 2012. p. 1-2.
46. Hwang, W.Y., Y. Fu, D. Reyon, M.L. Maeder, S.Q. Tsai, J.D. Sander, R.T. Peterson, J.J. Yeh, J.K. Joung, *Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system*. Nature biotechnology, 2013. 31(3): p. 227-229.
47. Nguyễn Thị Thương Huyền, Phan Thanh Huy, Trần Anh Huy, Nguyễn Thị Thu Giang, Lê Thành Long, Nguyễn Tường Anh, *Đánh giá tác động của cadmium (Cd) lên quá trình phát triển của phôi cá ngựa vằn - Danio rerio (Hamilton, 1822)*. Tạp chí Khoa học Đại học Sư phạm TPHCM, 2012. 40: p. 123-131.
48. Trần Thị Phương Dung, Nguyễn Hiếu, Nguyễn Thị Thương Huyền, *Đánh giá sự tác động của chì lên quá trình phát triển phôi cá ngựa vằn - Danio rerio (Hamilton, 1822)*. Tạp chí Khoa học Đại học Sư phạm TPHCM, 2014. 61: p. 122-131.

49. 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, 2016. 6(84): p. 103-116.
50. Nguyễn Thị Thương Huyền, Trần Thị Trúc Đào, Hoàng Nghĩa Sơn, *Đánh giá ảnh hưởng của asen lên sự phát triển phôi cá ngựa vằn (Danio rerio)*. Tạp chí sinh học, 2018. 40(1): p. 51-61.
51. Ngô Văn Tuấn, *Nghiên cứu sự ảnh hưởng của Chì (Pb) đối với quá trình phát triển của cá ngựa vằn (Danio rerio)*. Luận án tiến sỹ Sinh thái học. 2023, Học viện Khoa học và Công nghệ.
52. 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)*. VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences, 2016. 32(1).
53. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics*. British journal of cancer, 1972. 26(4): p. 239-257.
54. Norbury, C.J. I.D. Hickson, *Cellular responses to DNA damage*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2001. 41(1): p. 367-401.
55. Schäfer, A., *Gadd45 proteins: key players of repair-mediated DNA demethylation*. Gadd45 Stress Sensor Genes, 2013: p. 35-50.
56. Walmsley, R.M. M. Tate, *The GADD45a-GFP GreenScreen HC assay*. Genetic Toxicology: Principles and Methods, 2012: p. 231-250.
57. Hollander, M., I. Alamo, J. Jackman, M. Wang, O. McBride, A. Fornace Jr, *Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage*. Journal of Biological Chemistry, 1993. 268(32): p. 24385-24393.
58. Ishida, K., Y. Yuge, M. Hanaoka, M. Yasukawa, Y. Minami, M. Ogawa, K.h. Masumoto, Y. Shigeyoshi, M. Saito, T. Tsuji, *Gadd45g regulates dental epithelial cell proliferation through p38 MAPK-mediated p21 expression*. Genes to Cells, 2013. 18(8): p. 660-671.
59. Gierten, J., C. Pylatiuk, O.T. Hammouda, C. Schock, J. Stegmaier, J. Wittbrodt, J. Gehrig, F. Loosli, *Automated high-throughput heartbeat quantification in medaka and zebrafish embryos under physiological conditions*. Scientific Reports, 2020. 10(1): p. 2046.
60. Taslima, K., M. Al-Emran, M.S. Rahman, J. Hasan, Z. Ferdous, M.F. Rohani, M. Shahjahan, *Impacts of heavy metals on early development, growth and reproduction of fish—A review*. Toxicology Reports, 2022. 9: p. 858-868.
61. Johnson, A., E. Carew, K. Sloman, *The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos*. Aquatic Toxicology, 2007. 84(4): p. 431-438.
62. Shefner, J., A. Reaume, D. Flood, R. Scott, N. Kowall, R. Ferrante, D. Siwek, M. Upton–Rice, R. Brown, *Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy*. Neurology, 1999. 53(6): p. 1239-1239.
63. Wang, J. H. Cao, *Zebrafish and medaka: Important animal models for human neurodegenerative diseases*. International journal of molecular sciences, 2021. 22(19): p. 10766.
64. Ramesh, T., A.N. Lyon, R.H. Pineda, C. Wang, P.M. Janssen, B.D. Canan, A.H. Burghes, C.E. Beattie, *A genetic model of amyotrophic lateral sclerosis*

- in zebrafish displays phenotypic hallmarks of motoneuron disease. Disease models & mechanisms*, 2010. 3(9-10): p. 652-662.
65. Liu, X., L. Zhang, P. Wang, X. Li, D. Qiu, L. Li, J. Zhang, X. Hou, L. Han, J. Ge, *Sirt3-dependent deacetylation of SOD2 plays a protective role against oxidative stress in oocytes from diabetic mice. Cell cycle*, 2017. 16(13): p. 1302-1308.
 66. Sharma, S., S. Bhattarai, H. Ara, G. Sun, D.K. St Clair, M.S. Bhuiyan, C. Kevil, M.N. Watts, P. Dominic, T. Shimizu, *SOD2 deficiency in cardiomyocytes defines defective mitochondrial bioenergetics as a cause of lethal dilated cardiomyopathy. Redox biology*, 2020. 37: p. 101740.
 67. Rice, J.M., A. Zweifach, M.A. Lynes, *Metallothionein regulates intracellular zinc signaling during CD4+ T cell activation. BMC immunology*, 2016. 17: p. 1-14.
 68. Liu, X., J. Quan, Z. Shen, Z. Zhang, Z. Chen, L. Li, X. Li, G. Hu, X. Deng, *Metallothionein 2A (MT2A) controls cell proliferation and liver metastasis by controlling the MST1/LATS2/YAP1 signaling pathway in colorectal cancer. Cancer Cell International*, 2022. 22(1): p. 1-13.
 69. Wang, R.-F., L.-M. Zhu, J. Zhang, X.-P. An, Y.-P. Yang, M. Song, L. Zhang, *Developmental toxicity of copper in marine medaka (Oryzias melastigma) embryos and larvae. Chemosphere*, 2020. 247: p. 125923.
 70. Wang, Y., R. Branicky, A. Noë, S. Hekimi, *Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. Journal of Cell Biology*, 2018. 217(6): p. 1915-1928.
 71. Maurya, R. M. Namdeo, *Superoxide dismutase: a key enzyme for the survival of intracellular pathogens in host. Reactive Oxygen Species*, 2021.
 72. Di Paola, D., F. Capparucci, G. Lanteri, M. Cordaro, R. Crupi, R. Siracusa, R. D'Amico, R. Fusco, D. Impellizzeri, S. Cuzzocrea, *Combined toxicity of xenobiotics Bisphenol A and heavy metals on zebrafish embryos (Danio rerio). Toxics*, 2021. 9(12): p. 344.
 73. Malumbres, M., *Cyclin-dependent kinases. Genome biology*, 2014. 15(6): p. 1-10.
 74. Zhang, L., Y. Li, C. Hu, Y. Chen, Z. Chen, Z.-S. Chen, J.-Y. Zhang, S. Fang, *CDK6-PI3K signaling axis is an efficient target for attenuating ABCB1/P-gp mediated multi-drug resistance (MDR) in cancer cells. Molecular Cancer*, 2022. 21(1): p. 1-26.
 75. Topacio, B.R., E. Zatulovskiy, S. Cristea, S. Xie, C.S. Tambo, S.M. Rubin, J. Sage, M. Kõivomägi, J.M. Skotheim, *Cyclin D-Cdk4, 6 drives cell-cycle progression via the retinoblastoma protein's C-terminal helix. Molecular cell*, 2019. 74(4): p. 758-770. e4.
 76. Mayden, R.L., K.L. Tang, K.W. Conway, J. Freyhof, S. Chamberlain, M. Haskins, L. Schneider, M. Sudkamp, R.M. Wood, M. Agnew, *Phylogenetic relationships of Danio within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2007. 308(5): p. 642-654.

77. Williams, S.Y. B.J. Renquist, *High throughput Danio rerio energy expenditure assay*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2016(107): p. e53297.
78. Livak, K.J. T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method*. methods, 2001. 25(4): p. 402-408.
79. Webster, K.A., K. Henke, D.M. Ingalls, A. Nahrin, M.P. Harris, K.R. Siegfried, *Cyclin-dependent kinase 21 is a novel regulator of proliferation and meiosis in the male germline of zebrafish*. Reproduction, 2019. 157(4): p. 383-398.
80. Sakthivel, S., A.R. Dhanapal, V.S. Munisamy, M.P. Nasirudeen, V. Selvaraj, V. Velu, A. Gurusamy, *Molecular characterization and expression profiling of arsenic mediated stress-responsive genes in Dawkinsia tambraparniei (Silas, 1954)*. Journal of Applied Biology and Biotechnology, 2023. 11(3): p. 193-199.
81. NEGRAO, D., M.Z. NIEGOWSKA, C.L. GOMEZ, T. LETTIERI, *Testing comparability of existing and innovative bioassays for water quality assessment*.
82. Huang, W., S. Zheng, X. Wang, Z. Cai, J. Xiao, C. Liu, K. Wu, *A transcriptomics-based analysis of toxicity mechanisms of zebrafish embryos and larvae following parental Bisphenol A exposure*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020. 205: p. 111165.
83. Schneider, C.A., W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nature methods, 2012. 9(7): p. 671-675.
84. Sfakianakis, D., E. Georgakopoulou, I. Papadakis, P. Divanach, M. Kentouri, G. Koumoundouros, *Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758)*. Aquaculture, 2006. 254(1-4): p. 54-64.
85. Papasani, M.R., B.D. Robison, R.W. Hardy, R.A. Hill, *Early developmental expression of two insulins in zebrafish (Danio rerio)*. Physiological genomics, 2006. 27(1): p. 79-85.
86. Yamagami, K., W. Hoar, D. Randall, *Mechanisms of hatching in fish, fish physiology (Vol. XI, pp. 447-499)*. 1988, San Diego, CA: Academic Press.
87. Jezierska, B., K. Ługowska, M. Witeska, *The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review)*. Fish physiology and biochemistry, 2009. 35: p. 625-640.
88. Barton, B., *Stress in Finfish: Past, Present and Future-a Historical Perspective*, in G. Fish stress and health in aquaculture, 1997: p. 1-33.
89. Chang, L.W., L. Magos, T. Suzuki, *Toxicology of metals*. 1996: CRC Boca Raton, FL.
90. Skou, J.C. M. Esmann, *The na, k-atpase*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 1992. 24: p. 249-261.
91. Lyon, G.R., J.M. Fletcher, S.E. Shaywitz, B.A. Shaywitz, J.K. Torgesen, F.B. Wood, A. Schulte, R. Olson, *Rethinking learning disabilities. Rethinking special education for a new century*, 2001: p. 259-287.

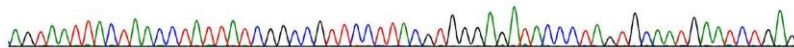
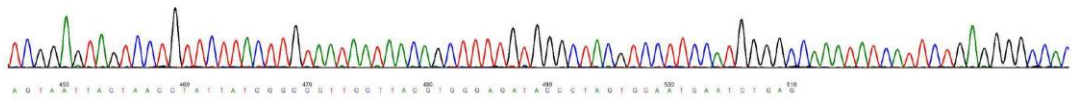
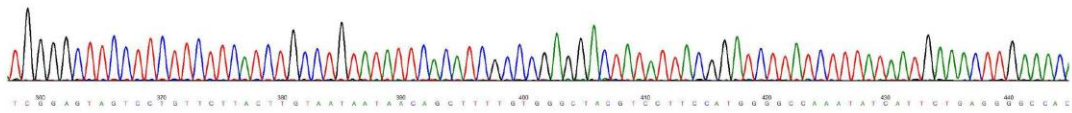
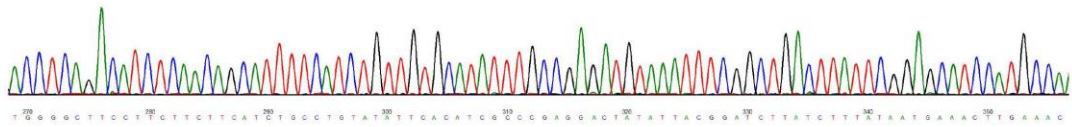
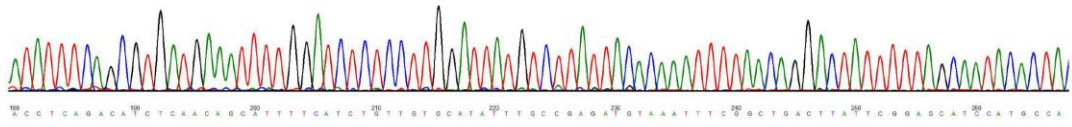
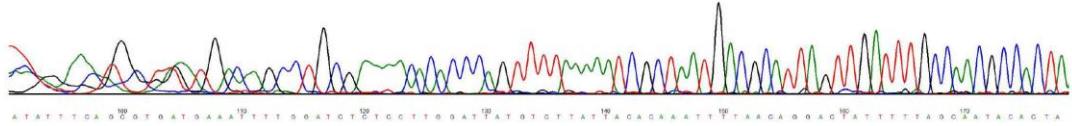
92. Jezierska, B. M. Witeska. *The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters.* in *Soil and water pollution monitoring, protection and remediation.* 2006. Springer.
93. Cretì, P., F. Trinchella, R. Scudiero, *Heavy metal bioaccumulation and metallothionein content in tissues of the sea bream Sparus aurata from three different fish farming systems.* Environmental monitoring and assessment, 2010. 165: p. 321-329.
94. Nguyễn Thị Thương Huyền, Trần Anh Huy, Nguyễn Thị Thu Giang, Trần Thị Phương Dung, *Khảo sát khả năng tích tụ Cadmium trên cơ thể cá Ngựa vằn-Danio rerio (Hamilton, 1822).* 2013.
95. Rosli, M., S. Samat, M. Yasir, M. Yusof, *Analysis of heavy metal accumulation in fish at Terengganu coastal area, Malaysia.* Sains Malaysiana, 2018. 47(6): p. 1277-1283.
96. Tulasi, S., P. Reddy, J.R. Rao, *Accumulation of lead and effects on total lipids and lipid derivatives in the freshwater fish Anabas testudineus (Bloch).* Ecotoxicology and environmental safety, 1992. 23(1): p. 33-38.
97. Cao, J., G. Wang, T. Wang, J. Chen, G. Wenjing, P. Wu, X. He, L. Xie, *Copper caused reproductive endocrine disruption in zebrafish (Danio rerio).* Aquatic Toxicology, 2019. 211: p. 124-136.
98. Bhatnagar, C., M. Bhatnagar, B.C. Regar, *Fluoride-induced histopathological changes in gill, kidney, and intestine of fresh water teleost, Labeo rohita.* Fluoride, 2007. 40(1): p. 55-61.
99. Abdelhamed, H., I. Ibrahim, W. Baumgartner, M.L. Lawrence, A. Karsi, *Characterization of histopathological and ultrastructural changes in channel catfish experimentally infected with virulent Aeromonas hydrophila.* Frontiers in microbiology, 2017. 8: p. 1519.
100. Younis, M.S., A.M.S.-E. Elhamshary, A.I. Abd-Elmaboud, N.M. El-Sayed, S.M. Kishik, *Diagnosis of Acanthamoeba keratitis in clinically suspected cases and its correlation with some risk factors.* Egypt J Med Sci, 2013. 34(2): p. 527-540.
101. Hanna, M., I. Shaheed, N. Elias, *A contribution on chromium and lead toxicity in cultured Oreochromis niloticus.* Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 2005. 9: p. 177-209.

PHỤ LỤC

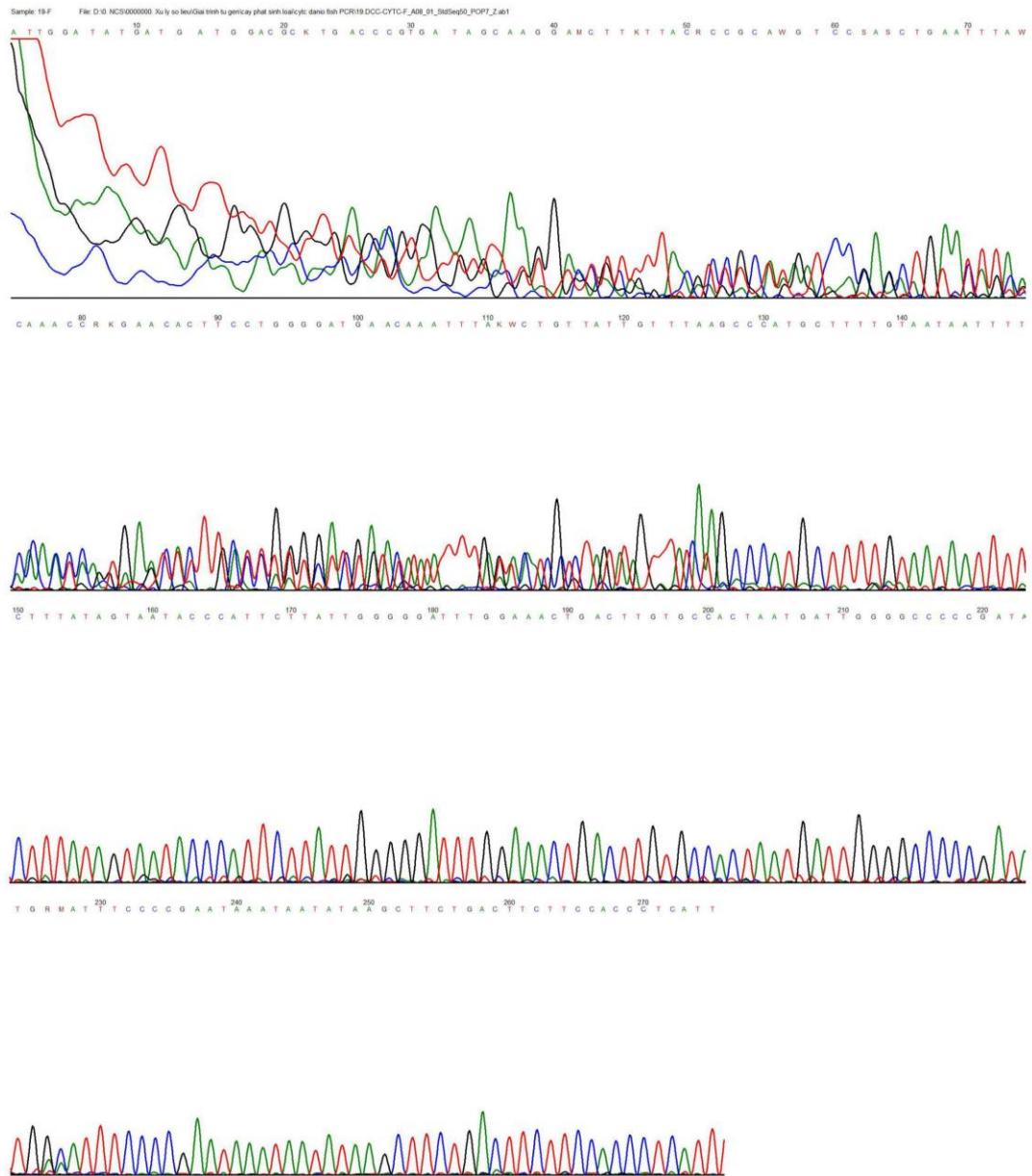
1. Định danh cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

1.1. Gene cytochrome b

Sample: 18.F File: D:\01\BCS\0000000_NuTron\BanGai\TrinhTu\particay\phat\sinh\kac\cyto\danio\kon\PCR\18\DCB\CYTB.F_087.SP_S884603_P00FF_Z.akt
T MA KD R AM W C CK K W AA T C A AA D C CT G C D A A A C A C A C C A G T T T T A A A A T C G C T A A T A C G C A T T A D T T G A T T T C C A C C G D A C T A



1.2. Gene *cytochrome c*



2. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn

2.1. Tỷ lệ sống

Tỷ lệ sống ngày thứ 1

| Stt | Các nồng độ Crom (VI) ($\mu\text{g/L}$) | | | | | | | | |
|-----|---|-----|-----|-------|------|------|----|----|-----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 |
| 1 | 100 | 100 | 100 | 94 | 94 | 92 | 92 | 88 | 84 |
| 2 | 100 | 100 | 98 | 96 | 88 | 92 | 92 | 90 | 88 |
| 3 | 100 | 100 | 96 | 94 | 96 | 92 | 92 | 80 | 94 |
| 4 | 100 | 100 | 94 | 96 | 98 | 88 | 90 | 80 | 82 |
| 5 | 100 | 100 | 98 | 98 | 98 | 94 | 86 | 94 | 98 |

Tỷ lệ sống ngày thứ 2

| Stt | Các nồng độ Crom (VI) ($\mu\text{g/L}$) | | | | | | | | |
|-----|---|------|----|-------|------|------|----|----|-----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 |
| 1 | 100 | 94.0 | 98 | 88 | 90 | 88 | 42 | 68 | 84 |
| 2 | 100 | 100 | 98 | 90 | 76 | 90 | 52 | 84 | 88 |
| 3 | 100 | 100 | 96 | 90 | 94 | 86 | 54 | 22 | 84 |
| 4 | 100 | 100 | 94 | 92 | 96 | 84 | 42 | 36 | 78 |
| 5 | 100 | 100 | 96 | 96 | 92 | 94 | 46 | 66 | 96 |

Tỷ lệ sống ngày thứ 3

| Stt | Các nồng độ Crom (VI) ($\mu\text{g/L}$) | | | | | | | | |
|-----|---|-----|----|-------|------|------|----|----|-----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 |
| 1 | 100 | 94 | 98 | 88 | 84 | 88 | 40 | 58 | 0 |
| 2 | 100 | 100 | 98 | 90 | 72 | 90 | 52 | 60 | 0 |
| 3 | 100 | 100 | 96 | 90 | 94 | 86 | 52 | 12 | 0 |
| 4 | 100 | 100 | 94 | 92 | 96 | 84 | 40 | 16 | 0 |
| 5 | 100 | 100 | 96 | 96 | 92 | 94 | 46 | 4 | 0 |

Tỷ lệ sống ngày thứ 4

| Stt | Các nồng độ Crom (VI) ($\mu\text{g/L}$) | | | | | | | | |
|-----|---|-----|----|-------|------|------|----|----|-----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 |
| 1 | 100 | 94 | 98 | 88 | 80 | 86 | 36 | 0 | 0 |
| 2 | 100 | 100 | 98 | 84 | 72 | 88 | 46 | 0 | 0 |
| 3 | 100 | 100 | 96 | 80 | 80 | 82 | 48 | 0 | 0 |
| 4 | 100 | 100 | 94 | 72 | 72 | 78 | 34 | 0 | 0 |
| 5 | 100 | 100 | 96 | 78 | 78 | 90 | 38 | 0 | 0 |

Tỷ lệ sống ngày thứ 5

| Stt | Các nồng độ Crom (VI) ($\mu\text{g/L}$) | | | | | | | | |
|-----|---|-----|----|-------|------|------|----|----|-----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 |
| 1 | 100 | 94 | 98 | 88 | 80 | 86 | 28 | 0 | 0 |
| 2 | 100 | 100 | 98 | 84 | 72 | 84 | 38 | 0 | 0 |
| 3 | 100 | 100 | 96 | 80 | 80 | 78 | 40 | 0 | 0 |
| 4 | 100 | 100 | 94 | 72 | 72 | 66 | 30 | 0 | 0 |
| 5 | 100 | 100 | 96 | 78 | 78 | 90 | 18 | 0 | 0 |

Tỷ lệ sống ngày thứ 6

| Stt | Các nồng độ Crom (VI) ($\mu\text{g/L}$) | | | | | | | | |
|-----|---|-----|----|-------|------|------|----|----|-----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 |
| 1 | 100 | 94 | 98 | 88 | 78 | 76 | 28 | 0 | 0 |
| 2 | 100 | 100 | 98 | 76 | 72 | 72 | 38 | 0 | 0 |
| 3 | 100 | 100 | 96 | 80 | 80 | 48 | 38 | 0 | 0 |
| 4 | 100 | 100 | 94 | 72 | 72 | 32 | 30 | 0 | 0 |
| 5 | 100 | 100 | 96 | 78 | 76 | 46 | 18 | 0 | 0 |

Tỷ lệ sống ngày thứ 7

| Stt | Các nồng độ Crom (VI) ($\mu\text{g/L}$) | | | | | | | | |
|-----|---|-----|----|-------|------|------|----|----|-----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 |
| 1 | 100 | 94 | 98 | 88 | 78 | 76 | 28 | 0 | 0 |
| 2 | 100 | 100 | 98 | 76 | 72 | 72 | 38 | 0 | 0 |
| 3 | 100 | 100 | 96 | 80 | 80 | 48 | 38 | 0 | 0 |
| 4 | 100 | 100 | 94 | 72 | 72 | 32 | 30 | 0 | 0 |
| 5 | 100 | 100 | 96 | 78 | 76 | 46 | 18 | 0 | 0 |

2.2. Chiều dài ấu trùng cá ngựa vằn

Chiều dài ấu trùng cá ngựa vằn ngày thứ 3

| Stt | Crom (VI) ($\mu\text{g/L}$) | | | | | | |
|-----|-------------------------------|------|------|-------|------|------|----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 |
| 1 | 2974 | 2933 | 3039 | 2921 | 2918 | 2731 | |
| 2 | 2969 | 2922 | 2842 | 2927 | 2915 | 2737 | |
| 3 | 2987 | 2988 | 2994 | 2857 | 2842 | 2844 | |
| 4 | 2978 | 2973 | 2874 | 2872 | 2915 | 2914 | |
| 5 | 3005 | 2956 | 2969 | 2932 | 2821 | 2803 | |

Chiều dài ấu trùng cá ngựa vằn ngày thứ 4

| Stt | Crom (VI) ($\mu\text{g/L}$) | | | | | | |
|-----|-------------------------------|------|------|-------|------|------|----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 |
| 1 | 3185 | 3134 | 3092 | 3215 | 2964 | 2955 | |
| 2 | 3176 | 3081 | 3172 | 3161 | 3122 | 2847 | |
| 3 | 3188 | 3275 | 3147 | 2998 | 3000 | 3009 | |
| 4 | 3164 | 3163 | 3056 | 3064 | 2920 | 3013 | |
| 5 | 3146 | 3139 | 3167 | 3066 | 3022 | 3083 | |

Chiều dài ấu trùng cá ngựa vằn ngày thứ 5

| Stt | Crom (VI) ($\mu\text{g/L}$) | | | | | | |
|-----|-------------------------------|------|------|-------|------|------|------|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 |
| 1 | 3283 | 3229 | 3111 | 3077 | 3135 | 2906 | 2987 |
| 2 | 3246 | 3200 | 3323 | 3007 | 3105 | 3013 | 2923 |
| 3 | 3223 | 3196 | 3231 | 3311 | 3122 | 3207 | 2906 |
| 4 | 3253 | 3273 | 3301 | 3222 | 3158 | 3139 | 2859 |
| 5 | 3218 | 3257 | 3129 | 3247 | 3135 | 2925 | 2816 |

Chiều dài ấu trùng cá ngựa vằn ngày thứ 6

| Stt | Crom (VI) ($\mu\text{g/L}$) | | | | | | |
|-----|-------------------------------|------|------|-------|------|------|------|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 |
| 1 | 3371 | 3270 | 3212 | 3191 | 3156 | 3081 | 2964 |
| 2 | 3336 | 3339 | 3246 | 3203 | 3157 | 3092 | 2920 |
| 3 | 3328 | 3188 | 3239 | 3203 | 3152 | 3056 | 2955 |
| 4 | 3340 | 3302 | 3203 | 3179 | 3158 | 3064 | 3009 |
| 5 | 3292 | 3223 | 3275 | 3138 | 3077 | 3066 | 3013 |

Chiều dài ấu trùng cá ngựa vằn ngày thứ 7

| Stt | Crom (VI) ($\mu\text{g/L}$) | | | | | | |
|-----|-------------------------------|------|------|-------|------|------|------|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 |
| 1 | 3490 | 3336 | 3294 | 3215 | 3167 | 3077 | 3049 |
| 2 | 3500 | 3328 | 3264 | 3269 | 3156 | 3148 | 2973 |
| 3 | 3470 | 3340 | 3239 | 3207 | 3157 | 3077 | 2989 |
| 4 | 3475 | 3393 | 3269 | 3224 | 3152 | 3148 | 2973 |
| 5 | 3371 | 3314 | 3212 | 3214 | 3158 | 3184 | 2994 |

2.3. Nhịp tim ấu trùng cá ngựa vằn
Nhịp tim ấu trùng cá ngựa vằn ngày thứ 3

| Stt | Nhịp tim (Nhịp/phút) | | | | | | |
|-----|----------------------|-----|-----|-------|------|------|-----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 |
| 1 | 233 | 255 | 266 | 270 | 278 | 280 | 300 |

| Stt | Nhịp tim (Nhịp/phút) | | | | | | |
|-----|----------------------|-----|-----|-------|------|------|-----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 |
| 2 | 226 | 253 | 263 | 266 | 284 | 290 | 303 |
| 3 | 220 | 250 | 270 | 275 | 275 | 290 | 302 |
| 4 | 230 | 246 | 246 | 256 | 276 | 280 | 300 |
| 5 | 244 | 252 | 262 | 262 | 275 | 280 | 300 |

Nhịp tim ầu trùng cá ngựa vằn ngày thứ 4

| Stt | Nhịp tim (Nhịp/phút) | | | | | | |
|-----|----------------------|-----|-----|-------|------|------|-----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 |
| 1 | 280 | 297 | 297 | 300 | 330 | 370 | 389 |
| 2 | 278 | 300 | 298 | 305 | 330 | 380 | 390 |
| 3 | 268 | 302 | 306 | 310 | 328 | 384 | 405 |
| 4 | 272 | 304 | 314 | 320 | 326 | 382 | 403 |
| 5 | 276 | 295 | 305 | 310 | 328 | 385 | 395 |

Nhịp tim ầu trùng cá ngựa vằn ngày thứ 5

| Stt | Nhịp tim (Nhịp/phút) | | | | | | |
|-----|----------------------|-----|-----|-------|------|------|-----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 |
| 1 | 255 | 260 | 270 | 276 | 278 | 360 | 370 |
| 2 | 240 | 262 | 266 | 270 | 286 | 340 | 360 |
| 3 | 244 | 266 | 259 | 265 | 266 | 345 | 350 |
| 4 | 256 | 256 | 256 | 260 | 265 | 344 | 348 |
| 5 | 233 | 258 | 258 | 268 | 271 | 348 | 350 |

Nhịp tim ầu trùng cá ngựa vằn ngày thứ 6

| Stt | Nhịp tim (Nhịp/phút) | | | | | | |
|-----|----------------------|-----|-----|-------|------|------|-----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 |
| 1 | 226 | 242 | 264 | 270 | 270 | 279 | 290 |
| 2 | 220 | 256 | 258 | 260 | 267 | 270 | 280 |
| 3 | 237 | 263 | 248 | 255 | 257 | 260 | 280 |

| | | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 4 | 230 | 250 | 244 | 254 | 257 | 260 | 285 |
| 5 | 224 | 247 | 247 | 257 | 260 | 275 | 290 |

Nhịp tim ấu trùng cá ngựa vằn ngày thứ 7

| Stt | Nhịp tim (Nhịp/phút) | | | | | | |
|-----|----------------------|-----|-----|-------|------|------|-----|
| | ĐC | 0.1 | 1 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 |
| 1 | 211 | 232 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 |
| 2 | 216 | 222 | 234 | 244 | 255 | 260 | 270 |
| 3 | 219 | 238 | 244 | 245 | 255 | 260 | 270 |
| 4 | 224 | 228 | 228 | 230 | 240 | 250 | 270 |
| 5 | 220 | 223 | 233 | 235 | 245 | 250 | 260 |

3. Ảnh hưởng của Crom (VI) đến sự thay đổi biểu hiện các gene *Gene gadd45a*

| Nồng độ | Đối chứng | Ngày 3 | Ngày 5 | Ngày 7 |
|------------|-----------|----------|----------|----------|
| 0,1 µg/L | 1.002605 | 0.040565 | 0.00746 | 0.015598 |
| 1 µg/L | 1.002605 | 0.066663 | 0.004564 | 0.006963 |
| 3,125 µg/L | 1.002605 | 0.011348 | 0.008169 | 0.011255 |
| 6,25 µg/L | 1.002605 | 0.05286 | 0.024995 | 0.004982 |
| 25 µg/L | 1.002605 | 0.089572 | 0.012848 | 0.008142 |

Gene gadd45g

| Nồng độ | Đối chứng | Ngày 3 | Ngày 5 | Ngày 7 |
|------------|-------------|----------|----------|----------|
| 0,1 µg/L | 1.004716327 | 8.010802 | 33.38024 | 285.2882 |
| 1 µg/L | 1.004716327 | 10.22241 | 22.71755 | 134.7154 |
| 3,125 µg/L | 1.004716327 | 11.7606 | 40.00242 | 150.5993 |
| 6,25 µg/L | 1.004716327 | 11.88743 | 40.61662 | 58.69348 |
| 25 µg/L | 1.004716327 | 7.662773 | 36.24395 | 18.30792 |

Gene sod 1

| Nồng độ | Đối chứng | Ngày 3 | Ngày 5 | Ngày 7 |
|----------|-------------|---------|-------------|----------|
| 0,1 µg/L | 1.001773173 | 0.64882 | 0.747532359 | 2.488918 |
| 1 µg/L | 1.001773173 | 0.81066 | 0.721968455 | 1.117127 |

| | | | | |
|------------|-------------|----------|-------------|----------|
| 3,125 µg/L | 1.001773173 | 0.966494 | 0.778857841 | 1.439805 |
| 6,25 µg/L | 1.001773173 | 0.825691 | 1.835595329 | 0.489499 |
| 25 µg/L | 1.001773173 | 1.083585 | 3.456573893 | 0.319461 |

Gene *sod 2*

| Nồng độ | Đôi chứng | Ngày 3 | Ngày 5 | Ngày 7 |
|----------------|------------------|---------------|---------------|---------------|
| 0,1 µg/L | 1.000165 | 0.360914 | 1.394339 | 4.387415 |
| 1 µg/L | 1.000165 | 0.300324 | 1.219075 | 3.107049 |
| 3,125 µg/L | 1.000165 | 0.293483 | 1.414412 | 2.953898 |
| 6,25 µg/L | 1.000165 | 0.452143 | 2.194908 | 2.307129 |
| 25 µg/L | 1.000165 | 0.484389 | 2.696559 | 6.578682 |

Gene *mt2*

| Nồng độ | Đôi chứng | Ngày 3 | Ngày 5 | Ngày 7 |
|----------------|------------------|---------------|---------------|---------------|
| 0,1 µg/L | 1.00337 | 0.51566 | 3.279179 | 79.9397 |
| 1 µg/L | 1.00337 | 0.331348 | 2.934664 | 30.59284 |
| 3,125 µg/L | 1.00337 | 0.36598 | 7.553858 | 58.66968 |
| 6,25 µg/L | 1.00337 | 0.242802 | 4.628304 | 36.89436 |
| 25 µg/L | 1.00337 | 0.964471 | 4.328095 | 85.31603 |