

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 VẼN (*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 -----

ĐẶNG ĐĂNG KHOA

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số : 9420201

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ



Vũ Đình Lãm

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Nguyễn Thị Phương Thảo

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

Lê Thành Long

Tp. Hồ Chí Minh – Năm 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi, Đặng Đăng Khoa xin cam đoan, luận án Tiến sĩ “*Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá ngựa vằn (Danio rerio)*” là công trình nghiên cứu do tôi thực hiện dưới 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 24 tháng 06 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 và con tôi Đặng Nguyễn Hoàng Long 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 24 tháng 06 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 nghiên cứu	2
2.1. Mục tiêu tổng quát	2
2.2. Mục tiêu cụ thể	2
3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu	3
4. Nội dung nghiên cứu	3
5. Ý nghĩa của đề tài	3
5.1. Ý nghĩa khoa học	3
5.2. Ý nghĩa thực tiễn	4
6. Những đóng góp mới của luận án	4
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	5
1.1. Tổng quan về Crom (VI)	5
1.1.1. Nguồn gốc của kim loại nặng	5
1.1.2. Định nghĩa về Crom	6
1.2. Tổng quan về cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)	9
1.3. Các nghiên cứu về ảnh hưởng của kim loại nặng lên cá ngựa vằn	16
1.4. Các gene liên quan đến quá trình apoptosis và kháng oxy hóa	25
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
2.1. Vật liệu	30
2.1.1. Cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)	30

2.1.2. Thiết bị và dụng cụ cần thiết	30
2.1.3. Môi trường và hóa chất sử dụng	31
2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu	33
2.2.1. Định danh cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)	34
2.2.1.1. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái.....	34
2.2.1.2. Phương pháp sinh học phân tử.....	34
2.2.2. Phương pháp nuôi, phối và thu phôi cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)	38
2.2.2.1. Chuẩn bị môi trường nuôi phôi E3 (1x).....	38
2.2.2.2. Phối cá.....	38
2.2.2.3. Thu phôi	39
2.2.3. Môi trường Crom (VI) và thiết kế thí nghiệm độc tính	40
2.2.3.1. Môi trường Crom (VI)	40
2.2.3.2. Thiết kế thí nghiệm độc tính	40
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>)	40
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>)	40
2.2.4.2. Xác định sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên nhịp tim của ấu trùng cá ngựa vằn	41
2.2.4.3. Xác định sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn	42
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).....	42
2.2.6. Đánh giá hàm lượng Crom (VI) tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)	47
2.2.7. Đánh giá sự ảnh hưởng Crom (VI) lên cấu trúc nội quan (ruột, gan và buồng trứng) cá ngựa vằn.....	49
2.2.8. Phương pháp thống kê.....	51
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	52
3.1. Định danh cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)	52
3.1.1. Định danh cá ngựa vằn bằng phương pháp sinh học phân tử	52
3.1.1.1. Phân tích trình tự gene cytochrome b của cá ngựa vằn.....	52

3.1.1.2. Phân tích trình tự gene cytochrome c của cá ngựa vằn.....	54
3.1.2. Định danh cá ngựa vằn bằng đặc điểm hình thái học	56
3.2. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)	60
3.2.1. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)	60
3.2.2. Ảnh hưởng của Crom (VI) đến chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>).....	64
3.2.3. Ảnh hưởng của Crom (VI) đến nhịp tim ấu trùng cá ngựa vằn	66
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>)	69
3.3.1. Gene gadd45a và gadd45g	69
3.3.2. Gene sod1 và sod2	71
3.3.3. Gene mt2	73
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.....	75
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.....	76
3.4. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá ngựa vằn trưởng thành.....	79
3.4.1. Sự tích tụ Crom (VI) trong cơ thể cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>)	79
3.4.2. Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên cấu trúc mô cá ngựa vằn (<i>Danio rerio</i>).....	80
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	85
Kết luận	85
Kiến nghị	86
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ	87
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	88

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 gel electrophoresis	Điện di polyacrylamide với SDS
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].	13
Hình 1.2. Sự thay đổi hình dạng quá trình hình thành các cơ quan và thoát nang [21]	14
Hình 2.1. Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu phôi và ấu trùng cá ngựa vằn.....	33
Hình 2.2. Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu cá ngựa vằn trưởng thành	34
Hình 3.1. Hình mô tả hình dáng cá ngựa vằn đực và cái	57
Hình 3.2. Phôi cá ngựa vằn	57
Hình 3.3. Hình các cơ quan ấu trùng cá ngựa vằn	59
Hình 3.4. Trình tự gene cytochrome b của mẫu cá ngựa vằn trong nghiên cứu.....	52
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.	53
Hình 3.6. Trình tự gen cytochrome c của mẫu cá ngựa vằn trong nghiên cứu.....	54
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.	55
Hình 3.8. Phôi cá ngựa vằn	60
Hình 3.9. Ấu trùng phát triển bất thường khi nhiễm Crom (VI).....	61
Hình 3.10. Thể hiện tỷ lệ % phôi sống ở các nồng độ Crom (VI).	62
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).	64
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).	65
Hình 3.13. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn. ..	65
Hình 3.14. Biểu đồ thể hiện nhịp tim của ấu trùng cá ngựa vằn tại các nồng độ Crom (VI) ở các ngày.....	67
Hình 3.15. Mức độ biểu hiện mRNA của gene gadd45a và gadd45g theo etef.....	69
Hình 3.16. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự biểu hiện phiên mã của gen sod1	71
Hình 3.17. Ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự biểu hiện phiên mã của gen mt2 trên phôi cá ngựa vằn	73

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).....	75
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.....	76
Hình 3.20. Hàm lượng Crom (VI) tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn trưởng thành ...	79
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.	81
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.	82
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.	82

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Một số thiết bị chính sử dụng trong đề tài.....	30
Bảng 2.2. Một số dụng cụ chính sử dụng trong đề tài	31
Bảng 2.3. Hóa chất sử dụng trong đề tài	31
Bảng 2.4. Thông tin các cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu	35
Bảng 2.5. Chu trình nhiệt	35
Bảng 2.6. Các loài Cypriniformes trên ngân hàng GenBank.....	36
Bảng 2.7. Chu trình nhiệt của phản ứng RT-PCR cho các gene.....	44
Bảng 2.8. Trình tự mồi các gene	44

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được thiết kế 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, môi trường E3 (1×) được sử dụng làm đối chứng. Các chỉ tiêu được sử dụng trong đánh giá tác động của Crom (VI) lên quá trình phát triển của cá ngựa vằn bao gồm: tỷ lệ sống, nhịp tim, chiều dài cơ thể ấu trùng, hàm lượng Crom (VI) tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn trưởng thành, sự thay đổi cấu trúc mô ruột, mô gan, mô buồng trứng và sự biểu hiện các gene liên quan đến chu kỳ tế bào và các gene liên quan đến quá trình kháng oxy hóa. Sự phát triển, thay đổi một số đặc điểm hình thái phôi và ấu trùng cá ngựa vằn được đánh giá dưới kính hiển vi quang học và phương pháp quay phim. Phương pháp Real time RT-PCR và Western blot đã được sử dụng để đánh giá sự thay đổi biểu hiện của các gene liên quan đến apoptosis và kháng oxy hóa. Sự thay đổi cấu trúc một số nội quan cá ngựa vằn được xác định bằng nhuộm hematoxylin và eosin. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn giảm có liên quan đến sự gia tăng 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, sự tăng nhịp tim đã được ghi nhận ở các nhóm xử lý Crom (VI) với nồng độ cao. Mặc khác, lượng Crom (VI) tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn có xu hướng tăng khi thời gian tiếp xúc tăng. Kết quả phân tích Real time RT-PCR cho thấy sự giảm biểu hiện của các gene liên quan đến chu kỳ tế bào (*cdk4*, *cdk6*) và các gene liên quan đến kháng oxy hóa (*sod1* và *sod2*) ở phôi và ấu trùng cá ngựa vằn khi tiếp xúc với Crom (VI). Phân tích western blot thể hiện 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

This study was conducted to assess the effects of hexavalent chromium on the development of zebrafish (*Danio rerio*). The zebrafish embryos, 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 1× E3 medium was used as a control. The changes of embryo development under hexavalent chromium treatment was assessed by determining survival rates, heart rate, the body length of zebrafish larvae, and hexavalent chromium accumulation in adult zebrafish. Moreover, the alterations in the expression of cell cycle-related genes, antioxidant-related genes, and apoptosis-related genes were estimated by real time RT-PCR and western blot. Hematoxylin and eosin staining was applied to evaluate the changes in liver, intestine and ovary structure. The results demonstrated that 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 amount of hexavalent chromium accumulated in zebrafish's body tends to increase with exposure time. 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 nghiên cứu

2.1. Mục tiêu tổng quát

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định được những thay đổi trong 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 dưới tác động của Crom (VI) thông qua những thay đổi về mặt hình thái học, mô học và mức độ biểu hiện gene liên quan đến chu kỳ tế bào, quá trình kháng oxy hóa và sự chết theo chương trình.

2.2. Mục tiêu cụ thể

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

- Đánh giá được tác động của các nồng độ Crom (VI) lên sự phát triển của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn thông qua tỷ lệ sống, nhịp tim và chiều dài ấu trùng cá ngựa vằn (*Danio rerio*).

- Đánh giá sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên cấu trúc mô ruột, mô gan và mô buồng trứng cá ngựa vằn trưởng thành, đồng thời xác định hàm lượng tích tụ của Crom (VI) trong cơ thể cá ngựa vằn.

- 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. Ý nghĩa của đề tài

5.1. Ý nghĩa khoa học

Kết quả đề tài cung cấp một số dữ liệu khoa học về mức độ ảnh hưởng của Crom (VI) lên quá trình phát triển của cá ngựa vằn (*Danio rerio*) có ý nghĩa quan trọng trong việc hiểu được mức độ tác động của Crom (VI) đến quá trình phát triển của động vật.

Nghiên cứu này cung cấp dữ liệu khoa học về mức độ ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá ngựa vằn và giải thích cơ chế tác động thông qua sự biểu hiện gene và tích tụ của Crom (VI) trong các cơ quan nội tạng của cá ngựa vằn.

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

5.2. Ý nghĩa thực tiễn

Nghiên cứu góp phần xây dựng mô hình thử nghiệm có hiệu quả, từ đó làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về ảnh hưởng của Crom (VI) lên động vật khác và con người. Kết quả đề tài là tiền đề cho các nghiên cứu sử dụng cá ngựa vằn làm mô hình chỉ thị các yếu tố gây ô nhiễm môi trường, đặc biệt là mô hình cá nhạy cảm đối với các thay đổi kim loại nặng trong môi trường nước.

6. 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, asen, 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 khi tiếp xúc với Crom (VI) đang đối mặt với nguy cơ nghiêm trọng đối với sức khỏe và sinh sản của chúng. Crom (VI) là một chất độc hại thường xuất hiện trong các chất thải công nghiệp và nó có khả năng gây ra nhiều tác động tiêu cực đối với môi trường nước và các loài sinh vật sống trong đó. Một trong những tác động đáng chú ý của Crom (VI) là ức chế sự phát triển của các loài động vật thủy sinh. Khi tiếp xúc với nồng độ cao của Crom (VI), động vật có thể trải qua các vấn đề về tăng trưởng, phát triển kém và thậm chí là sự suy giảm hoàn toàn về kích thước và khả năng sinh tồn. Ngoài ra, Crom (VI) cũng có thể ảnh hưởng tiêu cực đến quá trình sinh sản của động vật thủy sinh. Sự tiếp xúc liên tục với chất này có thể làm giảm khả năng sinh sản của cá và các loài khác, gây ra sự suy giảm đáng kể trong tỉ lệ sinh sản và trong quần thể của chúng. Trong các trường hợp nghiêm trọng hơn, tiếp xúc lâu dài với Crom (VI) trong môi trường nước có thể dẫn đến tình trạng tử vong hàng loạt của các loài động vật thủy sinh. Sự tích tụ của chất này trong cơ thể động vật có thể gây ra các vấn đề về sức khỏe nghiêm trọng, bao gồm sự suy giảm chức năng nội tạng, thiếu hụt dinh dưỡng và cuối cùng là tử vong. Không chỉ ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe của các cá thể, mà việc tiêu thụ Crom (VI) qua chuỗi thức ăn cũng có thể lan rộng tác động tiêu cực này đến các loài khác trong hệ sinh thái. Do đó, mất cân bằng hệ sinh thái có thể xảy ra khi Crom (VI) tích tụ và lan truyền qua các mức dinh dưỡng khác nhau trong chuỗi thức ăn. Điều này có thể gây ra các biến đổi không mong muốn trong cấu trúc và

hoạt động của hệ sinh thái nước, ảnh hưởng đến sự đa dạng sinh học và sức khỏe của toàn bộ môi trường nước [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. Các phản ứng này thường diễn ra trong môi trường axit và kháng thể của các cơ thể sống. Khi Crom (IV) được tạo ra, chúng có khả năng lan truyền đến các cấu trúc tế bào quan trọng như ty thể và nhân. Tại đây, Crom (IV) có thể gây ra các sự gián đoạn DNA, tạo ra tổn thương và rủi ro đáng kể cho sự phát triển của tế bào [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 gene lưỡng bội chứa 25 cặp nhiễm sắc thể và điều này tạo ra sự tương đồng với bộ gene của động vật có vú bậc cao (chuột, thỏ...) đặc biệt là con người. Các nhà nghiên cứu đã chứng minh rằng 70% gene mã hóa protein ở con người có liên quan đến các gene được tìm thấy ở cá ngựa vằn, trong số đó 84% gene liên quan đến bệnh tật ở người có bản sao của cá ngựa vằn. Điều này cho thấy tầm quan trọng của cá ngựa vằn như một sinh vật mẫu cho nghiên cứu bệnh tật ở người. Các công cụ để nghiên 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.

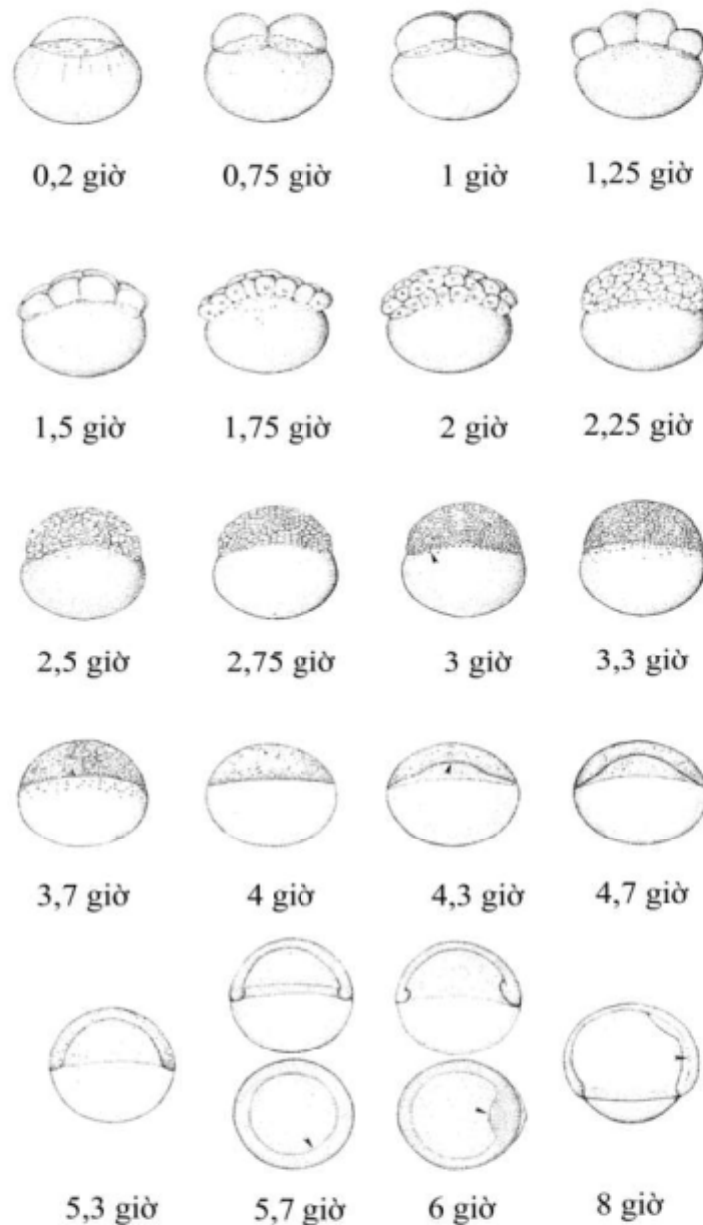
Theo Bradley và cộng sự (2007), mặc dù chỉ mới có 523 gene và EST cá ngựa vằn được đưa lên bản đồ đã xác nhận được 80% tương đồng với bộ gene người [25]. So với đánh giá trước đây với 124 gene chiếm 64%, điều này cho thấy rằng càng nhiều trình tự của cá ngựa vằn được so sánh, phần trăm tương đồng với 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.

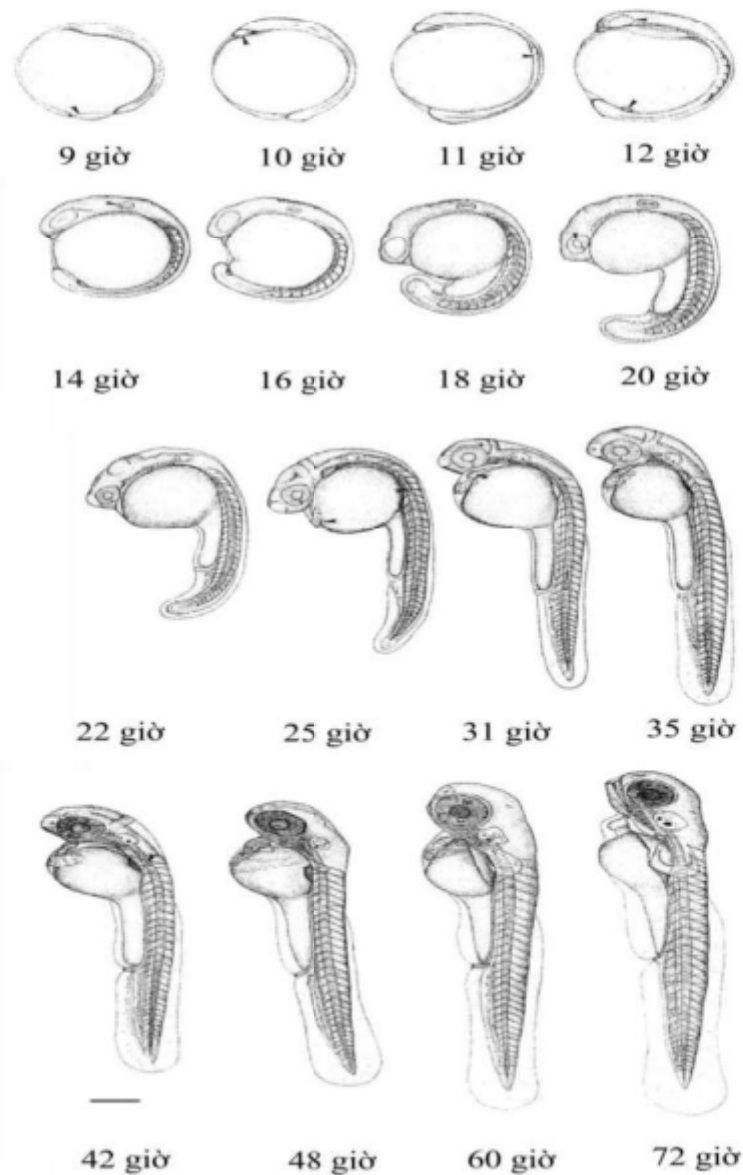
Sau giai đoạn thụ tinh, phôi của cá ngựa vằn không ngừng trải qua một chuỗi các giai đoạn phát triển phức tạp. Giai đoạn đầu tiên trong quá trình này là giai đoạn blastula, một giai đoạn quyết định trong sự phát triển ban đầu của phôi. Trong giai đoạn blastula, các gene của phôi được kích hoạt để bắt 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 bị 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]

Phôi cá ngựa vằn sau 8 giờ thụ tinh, 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 hầu 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 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 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. 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 [31].

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. 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 [32].

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 *coll1a1*, *col2a1* 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 [38].

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 đầu 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 quấy 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 µg/L; 1 µg/L; 5 µg/L; 10 µg/L; 20 µg/L; 50 µg/L và 100µg/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 quấy 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 (LD₅₀) 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 chỉ khảo sát, nhịp tim tăng tuyến tính theo thứ tự các nồng độ khảo sát, trong khi nhịp quấy 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, phân 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 quấy 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*). Dựa trên nghiên cứu của Moura và cộng sự vào năm 2019, tác giả tiến hành nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sinh lý và ảnh hưởng bệnh lý của cá ngựa vằn. 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 oxy 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* (Bắt 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 chảy rận. Trong số các con đường liên quan của nó là tín hiệu Interferon gamma và tín hiệu Cytokine trong hệ

thống miễn dịch. Một paralog quan trọng của gene này là *M/IG*. 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*)

Nguồn cá: Cá ngựa vằn (*Danio rerio*) sử dụng trong các thí nghiệm được lấy từ phòng Công nghệ sinh học động vật, Viện Sinh học nhiệt đới. Tại đây, cá được nuôi trong bể thủy tinh có đường kính 30 cm, đáy bể được trải bi thủy tinh làm giá đỡ cho trứng bám và nước trong bể duy trì ở mức 2/3 bể. Ánh sáng 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.

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

STT	Tên thiết bị	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
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 dụng cụ	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

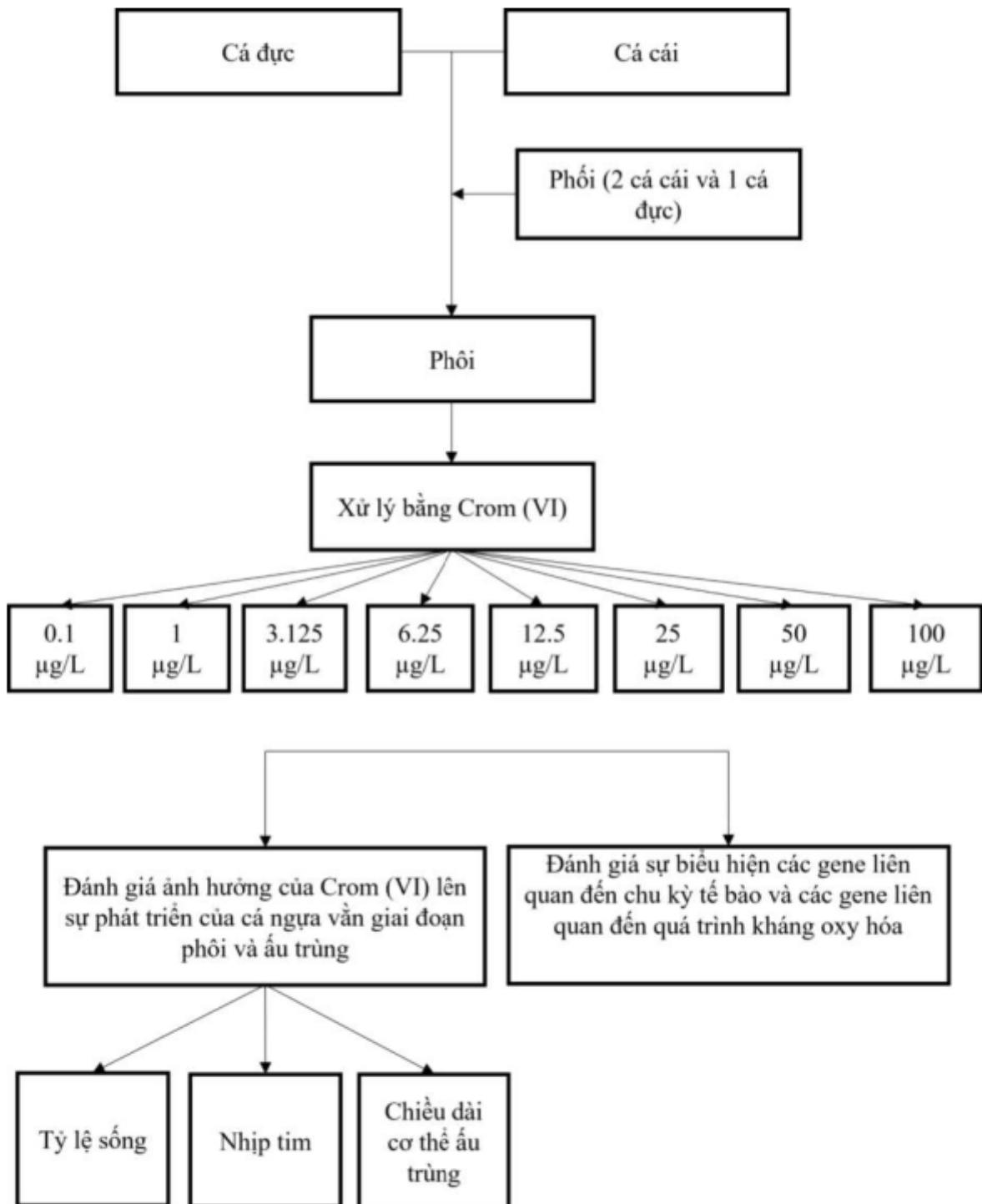
Bảng 2.3. Hóa chất sử dụng trong đề tài

STT	Tên hóa chất	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
1	Cồn	Merck	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

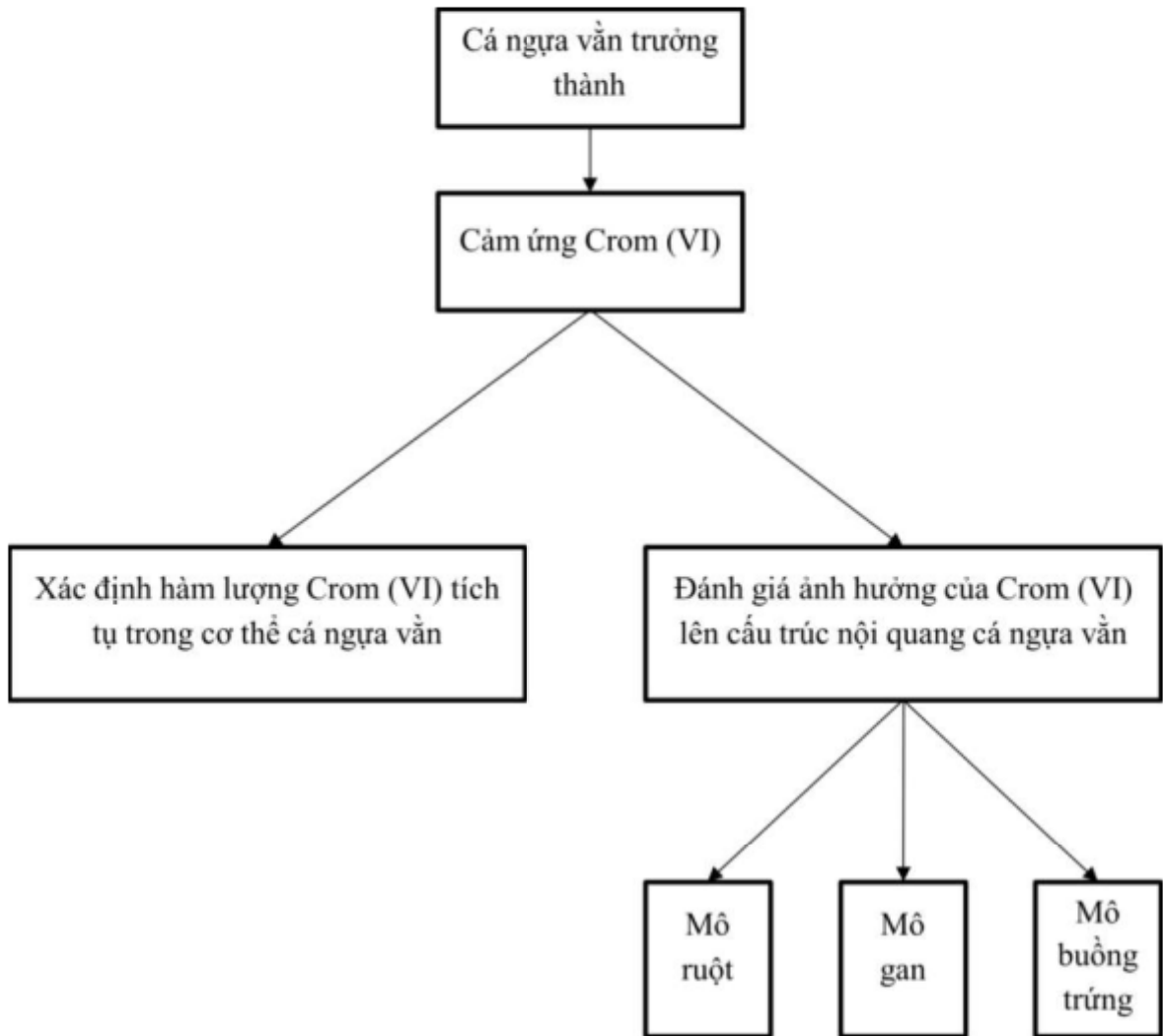
STT	Tên hóa chất	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
5	ECL Western Blotting Substrate Kit	Abcam	Mỹ
6	Màng PVDF	Abcam	Mỹ
7	AUTOMATIC X-RAY kit	Fujifilm	Nhật Bản
8	Giấy lọc Extra Thick Blot Paper	Bio-Rad	Mỹ
9	Blocking Buffer	Abcam	Mỹ
10	Kháng thể Western Blot	Abcam	Mỹ
11	Optiblot LDS Sample Buffer	Abcam	Mỹ
12	Optiblot SDS Run Buffer	Abcam	Mỹ
13	Potassium Dichromate	Merck	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 và Hình 2.2.



Hình 2.1. Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu phôi và ấu trùng cá nưạ vừn



Hình 2.2. 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 (10 cm).

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 μ L dung dịch đệm Worm Lysis Buffer và 0,45% Tween 20. Tách chiết DNA tổng số, sử dụng 1 μ L 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 10000 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 μ L gồm 2,5 μ L Master MIX, 1 μ L mẫu DNA, 1 μ L Primer, 20,5 μ L 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 mỗi 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 mỗi được sử dụng trong nghiên cứu

	Primer	Trình tự mỗi (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	Crossostoma lacustre	NC001727	NC001727
2	Lefua echigonia	NC004696	NC004696
3	Carpoides carpio	NC005257	NC005257
4	Myxocyprinus asiaticus	NC006401	NC006401
5	Cobitis sinensis	NC007229	NC007229
6	Cobitis striata	NC004695	NC004695
7	Carassius auratus	NC006580	NC006580
8	Carassius carassius	NC006291	NC006291
9	Cyprinus carpio	NC001606	NC001606
10	Sawbwa resplendens	EF452895	N/A
11	Sarcocheilichthys variegatus	NC004694	NC004694
12	Campostoma anomalum	EF452850	AF452079
13	Hemitremia flammea	EF452851	AY281054
14	Luxilus chrysocephalus	EF452852	AF117167
15	Nocomis biguttatus	EF452853	AY486057
16	Notemigonus crysoleucas	EF452854	U01318
17	Notropis atherinoides	EF452855	AY281062
18	Opsopoeodus emiliae	EF452856	U17270
19	Phoxinus erythrogaster	EF452857	AY281055
20	Richardsonius balteatus	EF452858	AY096011
21	Boraras maculatus	EF452859	N/A
22	Boraras merah	EF452884	N/A
23	Boraras sp. cf. micros	EF452885	N/A
24	Boraras urophthalmoides	EF452886	N/A
25	Chela cachius	EF452891	EF452745
26	Chela dadiburjori	EF452892	EF452746

Stt	Phân loại	COI	Cyt b
27	<i>Danio choprai</i>	EF452879	EF452740
28	<i>Danio erythromicron</i>	EF452867	EF452737
29	<i>Danio feegradei</i>	EF452861	EF452732
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>Inlecypis 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>Sundanio axelrodi</i>	N/A	EF452739

Stt	Phân loại	COI	Cyt b
57	Trigonostigma espei	EF452877	N/A
58	Trigonostigma hengeli	EF452878	N/A
59	Zacco platypus	EF452896	EF452749
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 E3 (1x)

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

Để pha dung dịch gốc E3 (60x), cần hòa tan 34,8 g NaCl; 1,6 g KCl; 5,8 g CaCl₂.2H₂O; 9,78 g MgCl₂.6H₂O trong 1950 mL H₂O. Điều chỉnh pH đến 7,2 bằng NaOH và HCl. Sau đó thêm H₂O để thể tích dung dịch bằng 2000 mL. 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 E3 (1x), pha loãng 16,5 mL dung dịch E3 (60x) trong 1000 mL H₂O. Thêm 100 µL Methylen 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 1000 mL nước được trải bi thủy tinh làm giá đỡ cho phôi lắng xuống đáy bể ngăn chặn cá ăn phôi sau khi phối. Đồ 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 suốt để tách cá đực và cá cái. Loại bỏ vách ngăn này vào buổi sáng lúc 7 giờ để cá đực và cá cái có thời gian tiếp xúc với nhau thụ tinh và đẻ trứng. Sau 5 đến 10 phút loại bỏ vách ngăn, kiểm tra sơ bộ bằng cách quan sát dưới đáy bể để chắc chắn có phôi. Khi đã chắc chắn có phôi, tiến hành tách cá đực, cái ra riêng và tiến hành thu phôi.

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 được trải 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 rưới 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 5 đến 10 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.

2.2.2.3. Thu phôi

Sau khi cá đực và cá cái được cách ly khỏi bể phối 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 500 mL 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 100 mm (100-150 phôi/đĩa). Loại bỏ

nước còn lại trong đĩa petri và đồng thời thêm môi trường E3 (1x) để rửa phôi, đồng thời loại bỏ các phôi bị hư, cận và phân cá. Cuối cùng là thêm lại môi trường E3 (1x) để nuôi phôi.

2.2.3. Môi trường Crom (VI) và thiết kế thí nghiệm độc tính

2.2.3.1. Môi trường Crom (VI)

Gây ô nhiễm nước đối với kim loại Crom (VI) ở dạng muối Potassium Dichromate ($K_2Cr_2O_7$, độ tinh khiết N 99%) được mua từ hãng Merck 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 E3 (1x) 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.

2.2.3.2. Thiết kế thí nghiệm độc tính

Môi trường đối chứng: môi trường E3 (1x)

Môi trường khảo nghiệm: nước bị nhiễm Crom (VI) ở 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 $\mu\text{g/L}$.

Môi trường nước đối chứng và các nồng độ Crom (VI) luôn được duy trì ở pH= 6.5 – 7.5, nhiệt độ $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Mỗi thí nghiệm được lập lại 3 lần (n=3).

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 ở giai đoạn 1-2 tế bào 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 E3 (1x) làm đối chứng. Ở mỗi nồng độ, nuôi 50 phôi trong đĩa Petri 100 mm. Mỗi nồng độ được lập lại ba lần (n=3) 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.

Đếm số phôi nở sống trong tổng số phôi đồng thời quan sát và ghi nhận một số bất thường của phôi và ấu trùng. Sử dụng kính hiển vi để quan sát hình thái, sức sống và theo dõi tỷ lệ sống chết của phôi qua các mốc thời gian từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7. 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 phôi sống ở các nhóm thí nghiệm xử lý với Crom (VI) so với nhóm đối chứng. Phôi sống là phôi có hình thái bình thường, khỏe mạnh, không dị tật và có khả năng phát triển ở các giai đoạn tiếp theo.

2.2.4.2. Xác định sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên nhịp tim của 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, 79]. 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.

Xác định nhịp tim ở các nồng độ khác nhau, mỗi nồng độ thí nghiệm, dùng pipet pasteur với đường kính 2 mm để hút 10 ấu trùng ngẫu nhiên cho vào đĩa petri đường kính 60 mm có chứa môi trường tương ứng để ấu trùng sống được. Quan sát dưới kính hiển vi soi nổi, đặt dưới vật kính X10 đồng thời sử dụng phương pháp quay phim để ghi nhận lại nhịp tim của ấu trùng cá trong 1 phút, mỗi thí nghiệm được lập lại ít nhất 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. Gõ 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 12000 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 10000 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 lần 2 với tốc độ 10000 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 μL dung dịch RNA Was II. Tiếp tục ly tâm lần 3 với tốc độ 10000 vòng/phút trong 1 phút. Dịch thải ra ống thu được loại bỏ. Cột được chuyển sang ống thu mới, được bổ sung 500 μL RNA Wash II vào cột. Tiếp tục ly tâm lần 4 với tốc độ 10000 vòng/phút trong 1 phút. Cột được chuyển sang ống eppendorf mới sau đó bổ sung 100 μL nước cất Nuclease-Free Water, tiếp tục ly tâm lần 5 với tốc độ 10000 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 μL bao gồm 1 μL RNA mẫu, 2 μL hỗn hợp mỗi xuôi và mỗi ngược, 10 μL 2X Mix Hi-ROX, 1 μL RTase và 6 μL dung dịch H₂O. Đặt chu trình nhiệt cho phản ứng như trong Bảng 2.7. Các cặp mồi 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:

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

Chi 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 mỗi các gene

STT	Gene	Trình tự mỗi (5' – 3')	Nguồn
1	<i>cdk4</i>	f-GTATGAGCCAGTAGCAGAGATCG r-AGTTGTGGTGGGAAAGAGTGAC	[80]
2	<i>cdk6</i>	f-GTACAAGGCTCGGGATTTG r-CTCTGGGGCTCGATAACCATA	[80]
3	<i>sod1</i>	f-TGAGACACGTCGGAGACC r-TGCCGATCACTCCACAGG	[81]
4	<i>sod2</i>	f-TTCAGGGCTCAGGCTGG r-ATGGCTTTAACATAGTCCGGT	[81]
5	<i>mt2</i>	f-CCTGCAAGTGC ACTAATTGCCAGT r-TCTGTTTCAAGAAGCCGAAAGCCC	[82]

STT	Gene	Trình tự mồi (5' - 3')	Nguồn
6	<i>gadd45a</i>	f-AACGTGGTCTTGTGTCTGCT r-AGGTCCATCGACTCTCCTCC	[83]
7	<i>gadd45g</i>	f-CGCCTTGGATACGTCCGATT r-CTCTTGACACGCGACCAGTA	[83]
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-TCCAGCAAGGAAAACCTCCAAC	[69]
11	<i>etef</i>	f-GTACTACTCTTCTTGATGCCC r-GTACAGTTCCAATACCTCCA	[82]

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 bởi một lớp giấy lọc Extra Thick Blot Paper (1703966, Bio-Rad, Mỹ) và một lớp bọt 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 [84].

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 LC₅₀ 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 HNO₃ 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 (sr^c 0,11; RSDR^c: 20; r^e 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 đẩy 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 LC_{50} tại các thời điểm ngày thứ 5, ngày thứ 10, ngày thứ 20, ngày thứ 30 và nhóm đối chứng được thu nhận, gây tê cá bằng Licocain 2%, mổ cá để lấy các mẫu ruột, mẫu gan và mẫu buồng trứng sau đó cố định trong paraformaldehyde để bảo quản mẫu. Mỗi thí nghiệm lập lại 3 lần (n=3). 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 3 lần ($n=3$) 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

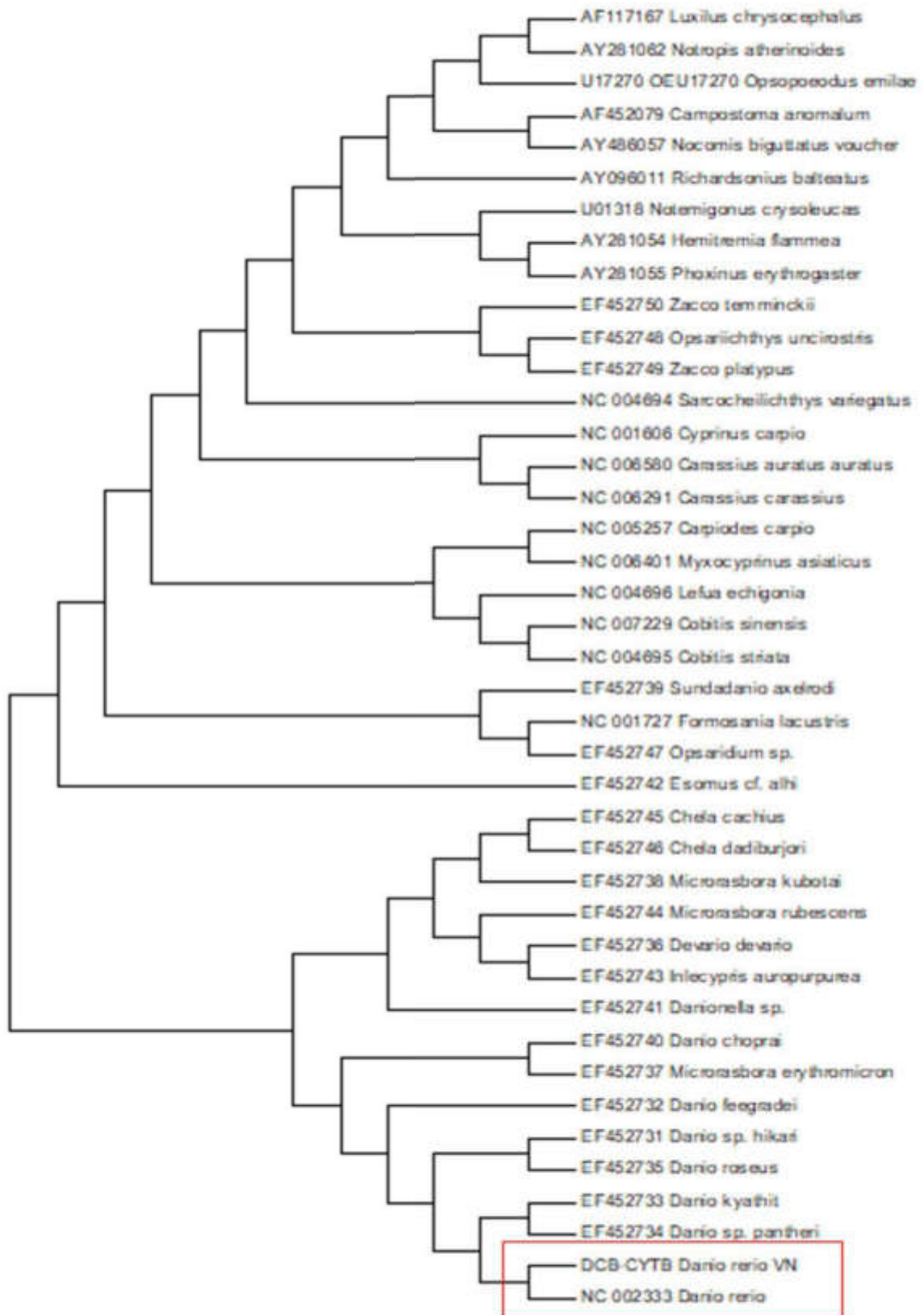
3.1. Định danh cá ngựa vằn (*Danio rerio*)

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

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

Query	15446	ACAGGACTATTTT TAGCAATACACTACACCTCAGACATCTCAACAGCATTTTCATCTGTT	15505
Sbjct	1	ACAGGACTATTTT TAGCAATACACTACACCTCAGACATCTCAACAGCATTTTCATCTGTT	60
Query	15506	GTGCATATTTGCCGAGATGTAATTTTCGGCTGACTTATTCGGAGCATCCATGCCAATGGG	15565
Sbjct	61	GTGCATATTTGCCGAGATGTAATTTTCGGCTGACTTATTCGGAGCATCCATGCCAATGGG	120
Query	15566	GCTTCCTTCTTCTTCATCTGCCTGTATATTCACATCGCCCAGGACTATATTACGGATCT	15625
Sbjct	121	GCTTCCTTCTTCTTCATCTGCCTGTATATTCACATCGCCCAGGACTATATTACGGATCT	180
Query	15626	TATCTTTATAATGAAACTTGAAACATCGGAGTAGTCTCTGTTCTTACTTGTAATAATAACA	15685
Sbjct	181	TATCTTTATAATGAAACTTGAAACATCGGAGTAGTCTCTGTTCTTACTTGTAATAATAACA	240
Query	15686	GCTTTTGTGGGCTACGTCCTTCCATGGGGCCAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTAATT	15745
Sbjct	241	GCTTTTGTGGGCTACGTCCTTCCATGGGGCCAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTAATT	300
Query	15746	ACTAACCTATTATCGGCCGTTCCCTACGTGGGAGATACCCTAGTGCAATGAATCTGAGGG	15805
Sbjct	301	ACTAACCTATTATCGGCCGTTCCCTACGTGGGAGATACCCTAGTGCAATGAATCTGAGGG	360
Query	15806	GGATTCTCAGTAGACAATGCAACCCCTTACACGATTCTTCGCATTCCACTTTTATTACCA	15865
Sbjct	361	GGATTCTCAGTAGACAATGCAACCCCTTACACGATTCTTCGCATTCCACTTTTATTACCA	420
Query	15866	TTTATTATCATCGCCATAGTTATTCTACACTTGCTATTTCTCCACGAAACCGGATCAAAT	15925
Sbjct	421	TTTATTATCATCGCCATAGTTATTCTACACTTGCTATTTCTCCACGAAACCGGATCAAAT	480
Query	15926	AACCCCTTGGCCTAAACCCCAACATGGATAAAATCCCTTTTCATCCTTATTTTCAAAT	15985
Sbjct	481	AACCCCTTGGCCTAAACCCCAACATGGATAAAATCCCTTTTCATCCTTATTTTCAAAT	540
Query	15986	AAAGACCTCCTTGGTTTTGTAATTATATATTTTCCCTCTCACTATTAGCACTATTCTCA	16045
Sbjct	541	AAAGACCTCCTTGGTTTTGTAATTATATATTTTCCCTCTCACTATTAGCACTATTCTCA	600
Query	16046	CCAAACCTCTTAGGAGATCCAGAAAATTCACCCCTGCTAACCCCTCTAGTAACACCTCCT	16105
Sbjct	601	CCAAACCTCTTAGGAGATCCAGAAAATTCACCCCTGCTAACCCCTCTAGTAACACCTCCT	660
Query	16106	CACATTAACCCAGAATGATATTTCCCTATTGTCATACGCCATTCTACGATCTATCCCAAAC	16165
Sbjct	661	CACATTAACCCAGAATGATATTTCCCTATTGTCATACGCCATTCTACGATCTATCCCAAAC	720
Query	16166	AAACTAGGAGGTGACTAGCTCTCTTATTTCCATTTTAGTATTAATAGTAGTACCAATT	16225
Sbjct	721	AAACTAGGAGGTGACTAGCTCTCTTATTTCCATTTTAGTATTAATAGTAGTACCAATT	780
Query	16226	TTACACACTTCTAAACAGCGAGGAATAGCATTCCGCCAGT 16266	
Sbjct	781	TTACACACTTCTAAACAGCGAGGAATAGCATTCCGCCAGT 821	

Hình 3.1. Trình tự gene cytochrome b của mẫu cá ngựa vằn trong nghiên cứu



Hình 3.2. Sơ đồ cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự gene *cytochrome b* của cá ngừ vằn trong nghiên cứu này với một số nhóm khác trên Genbank. Kết quả cho thấy cá ngừ vằn trong nghiên cứu này nằm trong nhóm *Danio rerio* (Vùng khoanh đỏ)

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 3.1 và Phụ lục 1.1).

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

```

Query 6654 GATTTGGAAACTGACTTGTGCCACTAATGATTGGGGCCCCCGATATGGCATTTCCTCCGAA 6713
          |||
Sbjct 1    GATTTGGAAACTGACTTGTGCCACTAATGATTGGGGCCCCCGATATGRMATTTTCCTCCGAA 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
          |||

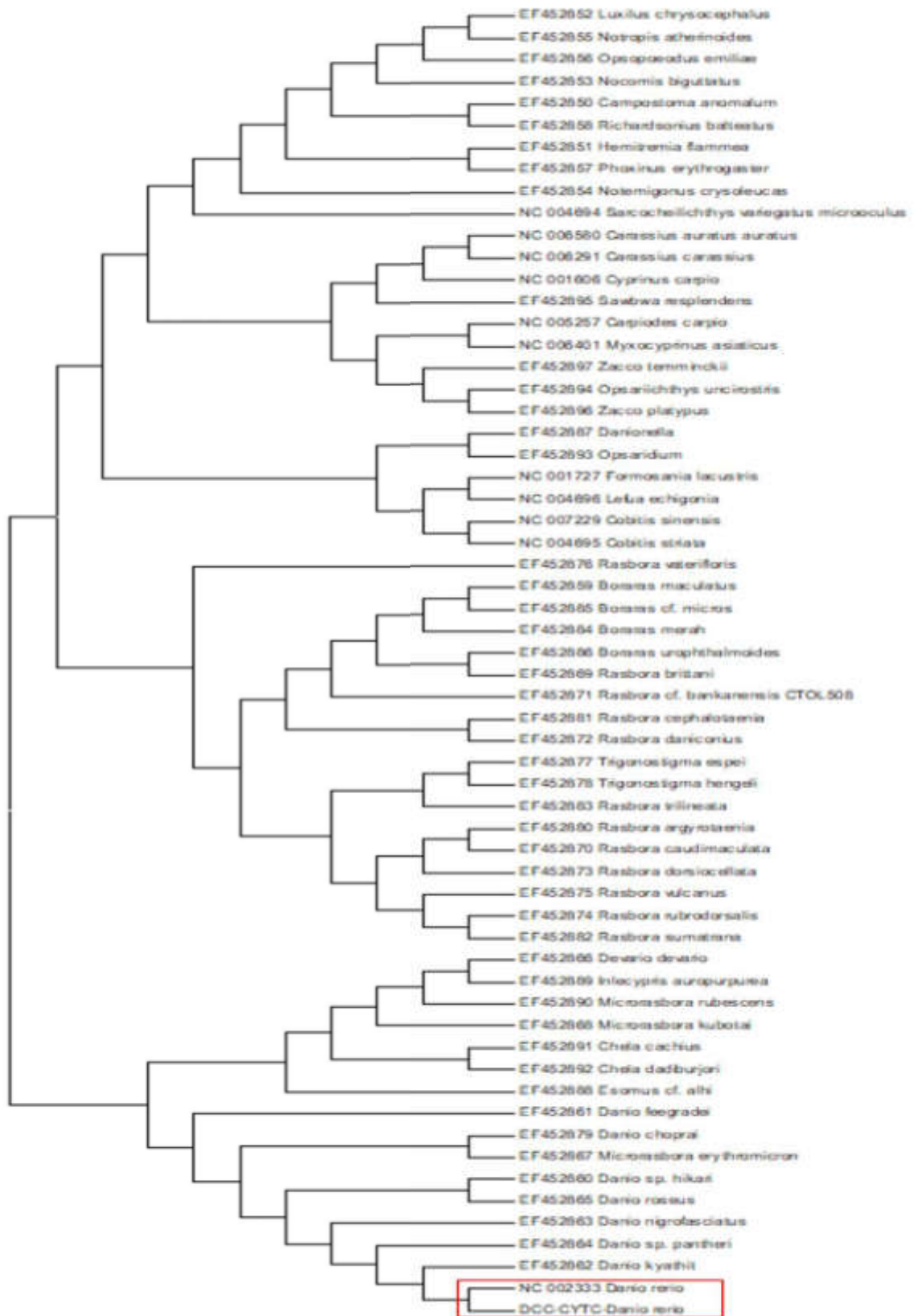
Query 6894 CTATTCTTGGAGCAATTAATTTTATTACTACTACAATTAACATGAAGCCACCAACTATCT 6953
          |||
Sbjct 241  CTATTCTTGGAGCAATTAATTTTATTACTACTACAATTAACATGAAGCCACCAACTATTT 300
          |||

Query 6954 CTCAGTATCAAACCTCATTATTTGTATGAGCTGTCTTAGTTACAGCTGTACTACTTCTTT 7013
          |||
Sbjct 301  CTCAGTATCAAACCTCATTATTTGTATGAGCTGTCTTAGTTACAGCTGTACTACTTCTTT 360
          |||

Query 7014 TATCTTTACCAGTGTTAGCT 7033
          |||
Sbjct 361  TATCTTTACCAGTGTTAGCT 380
          |||

```

Hình 3.3. Trình tự gene *cytochrome c* của mẫu cá ngựa vằn trong nghiên cứu



Hình 3.4. Sơ đồ cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự gene *cytochrome c* của cá ngựa vằn trong nghiên cứu này với một số nhóm khác trên Genbank. Kết quả cho thấy cá ngựa vằn trong nghiên cứu này nằm trong nhóm *Danio rerio* (Vùng khoanh đỏ)

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 3.3 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*.

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

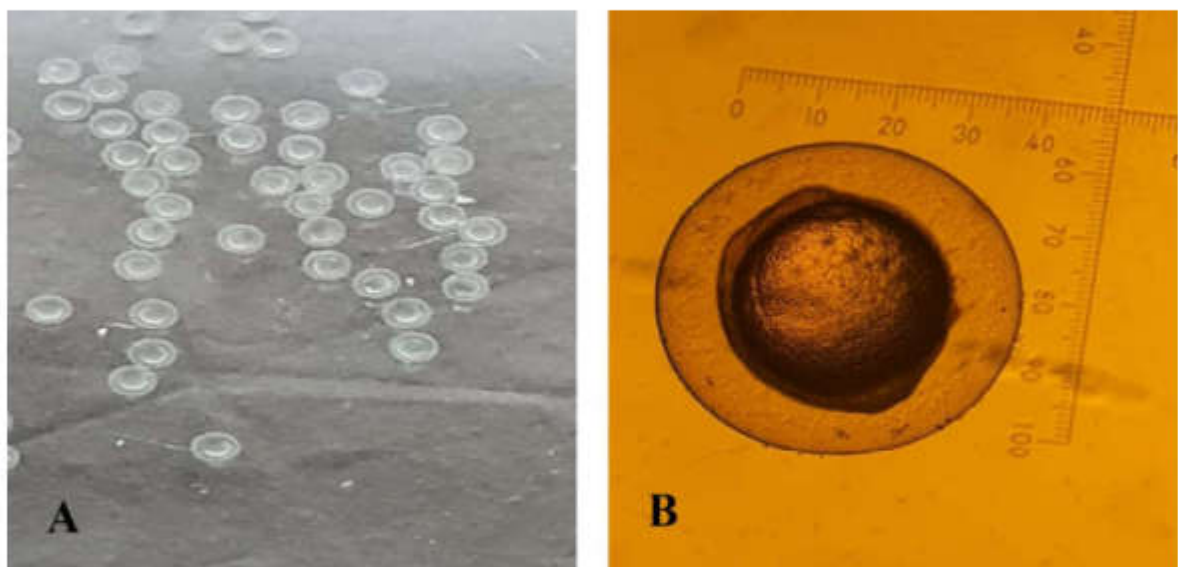
Cá ngựa vằn sử dụng trong nghiên cứu này được nuôi tại Viện sinh học nhiệt đới. Các cá đực và cá cái được lựa chọn dựa trên hình dạng cơ thể cá để đảm bảo khỏe mạnh và sẵn sàng cho việc sinh sản.

Kết quả Hình 3.5 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 hình dáng bụng cá cái 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 3.5. Hình mô tả hình dáng cá ngựa vằn đực và cái
(A: Cá ngựa vằn đực, B: Cá ngựa vằn cái)



Hình 3.6. Kết quả thu phôi cá ngựa vằn
(A – Phôi cá đực quan sát ở điều kiện bình thường, B – Phôi cá đực quan sát bằng kính hiển vi soi nổi độ phóng đại 40X thước 100 μ m)

Phôi cá ngựa vằn (Hình 3.6) 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).

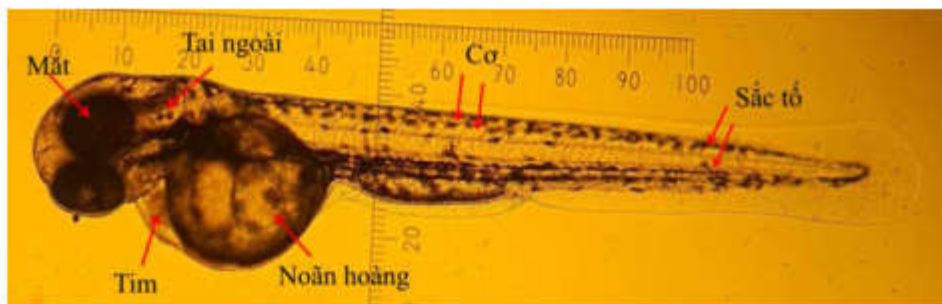
Vùng não có thể bắt đầu được xác định là các vùng sưng phồng phân biệt gọi là đốt thần kinh (neuromere). Khi đạt 18 giờ, có thể xác định được 10 đốt thần kinh, bao gồm 3 đốt đầu tiên tương ứng với bộ não cùng, bộ não trung gian, bộ não giữa và 7 đốt cuối cùng tương ứng với bộ não sau. Sau 24 giờ, phôi 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 quấy 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, ăn trôn 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.



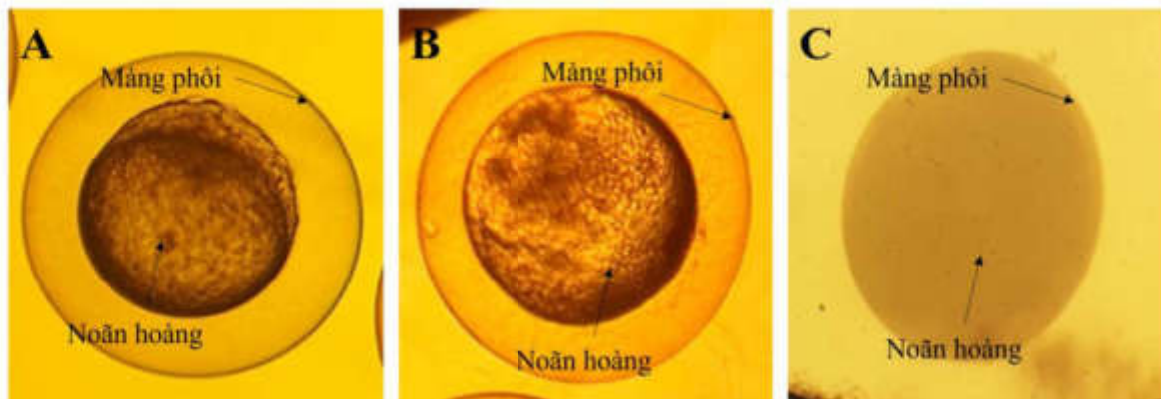
Hình 3.7. Hình các cơ quan ấu trùng cá ngựa vằn

Kết quả hình 3.7 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 vằn tăng theo thời gian (từ ngày 3 đến ngày thứ 7) và kích thước đo được tăng từ 2982 μm lên 3461 μm .

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*)

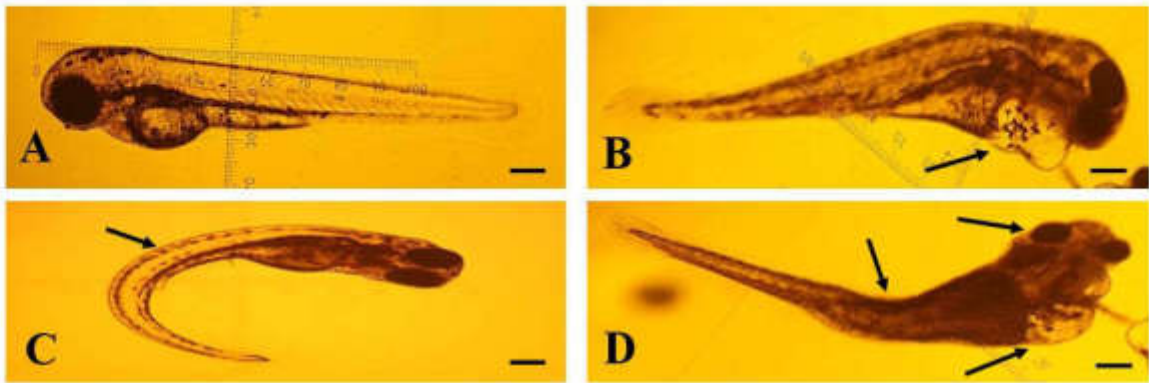
Kính hiển vi soi nổi được sử dụng để quan sát và xác định sự khác biệt về mặt hình thái và sự phát triển giữa nhóm đối chứng và các nhóm thí nghiệm được xử lý bằng Crom (VI).



Hình 3.8. Phôi cá ngựa vằn

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

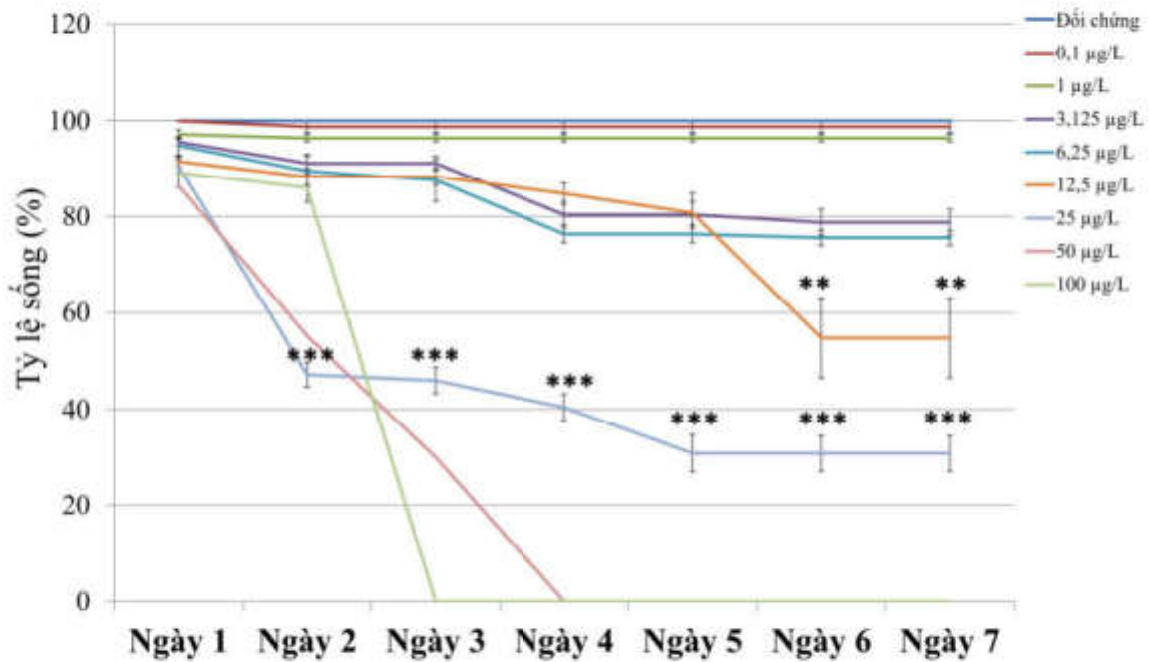
Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở giai đoạn phôi ngày thứ 1 và ngày thứ 2 trong nhóm đối chứng, phôi cá ngựa vằn phát triển bình thường có cấu trúc phôi trong suốt, không có biểu hiện bị dị dạng. Khối noãn hoàng đều đặn và nằm ở vị trí giữa phôi, dòng sinh chất chảy đều trong phôi (Hình 3.8 A). Điều này 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. Tuy nhiên, trong các nhóm thí nghiệm được tiếp xúc với Crom (VI), bên cạnh những phôi phát triển bình thường, đã xuất hiện một số phôi phát triển bất thường về hình thái, dòng sinh chất 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 3.9. 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

Kết quả đánh giá hình thái ấu trùng cho thấy, ở ngày thứ 3 đến ngày thứ 7, 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 [21]. Ấu trùng cá ngựa vẫn phát triển bình thường bao gồm mắt, noãn hoàng, cột sống, dòng sinh chất, tim và vây (Hình 3.9 A). Tuy nhiên, phôi cá trong các nhóm thí nghiệm có những phôi phát triển bình thường nhưng đa số phát triển chậm, sức sống yếu 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 phôi chết và biểu hiện dị tật tăng theo nồng độ Crom (VI) và thời gian tiếp xúc với Crom (VI) (Hình 3.9 B, 3.9 C, 3.9 D).



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 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 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 µg/L và 1 µg/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 ($\geq 3,125$ µg/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 µg/L; 6,25 µg/L và 12,5 µg/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 [80]. 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.

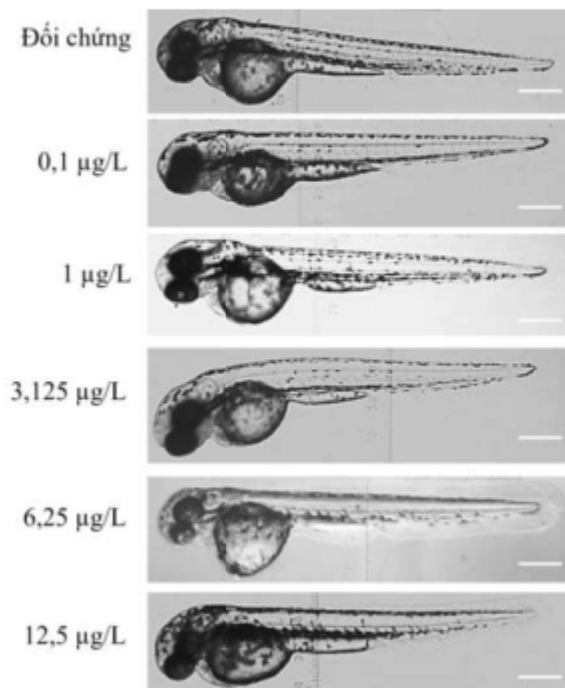
Các dị tật do Crom (VI) gây ra thường thấy như: tổn thương ở cột sống và hệ thống xương của ấu trùng cá ngựa vằn. Nghiên cứu của Sfakianakis và cộng sự (2006) cho rằng một số biến dạng phổ biến nhất có thể xác định ở cột sống, trong số các dị tật gây ra ở ấu trùng cá ngựa vằn do tiếp xúc với Crom (VI) bao gồm độ cong của cột sống và xương biến dạng rõ nhất [85]. 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.

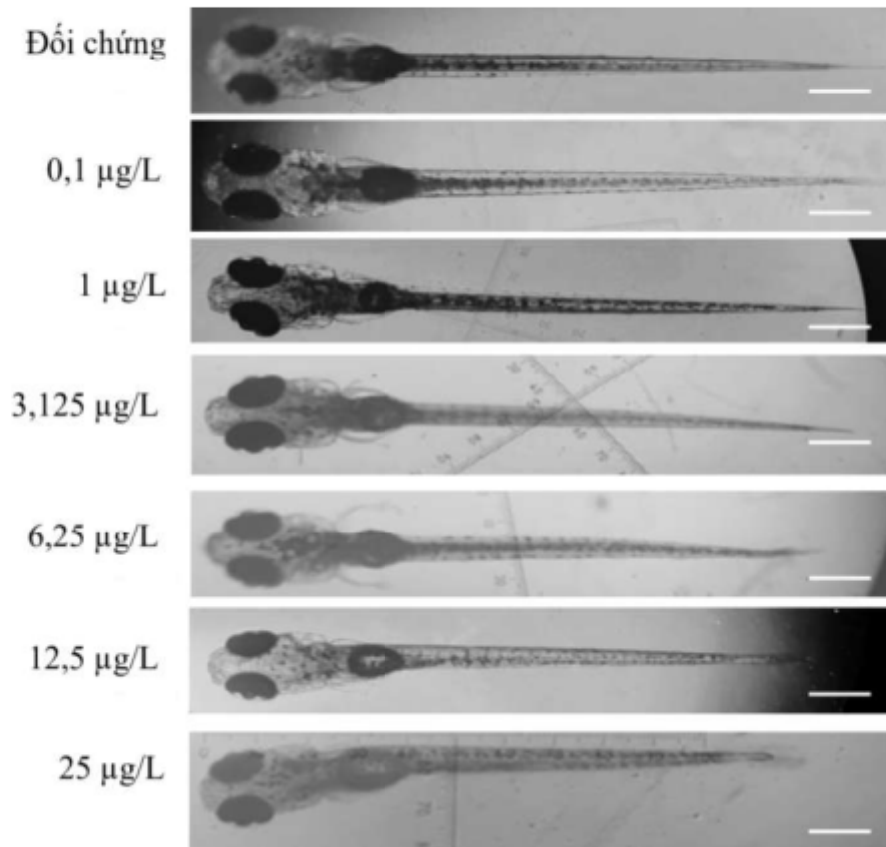
Nghiên cứu này đã chứng minh, Crom (VI) tác động tiêu cực đến sự phát triển của cá ngựa vằn. Tiếp xúc với Crom (VI) trong thời gian dài sẽ dẫn đến các hậu quả nghiêm trọng như: sự giảm tỷ lệ sống và xuất hiện các dị tật cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn và giai đoạn phôi là thời điểm nhạy cảm nhất đối với 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*)

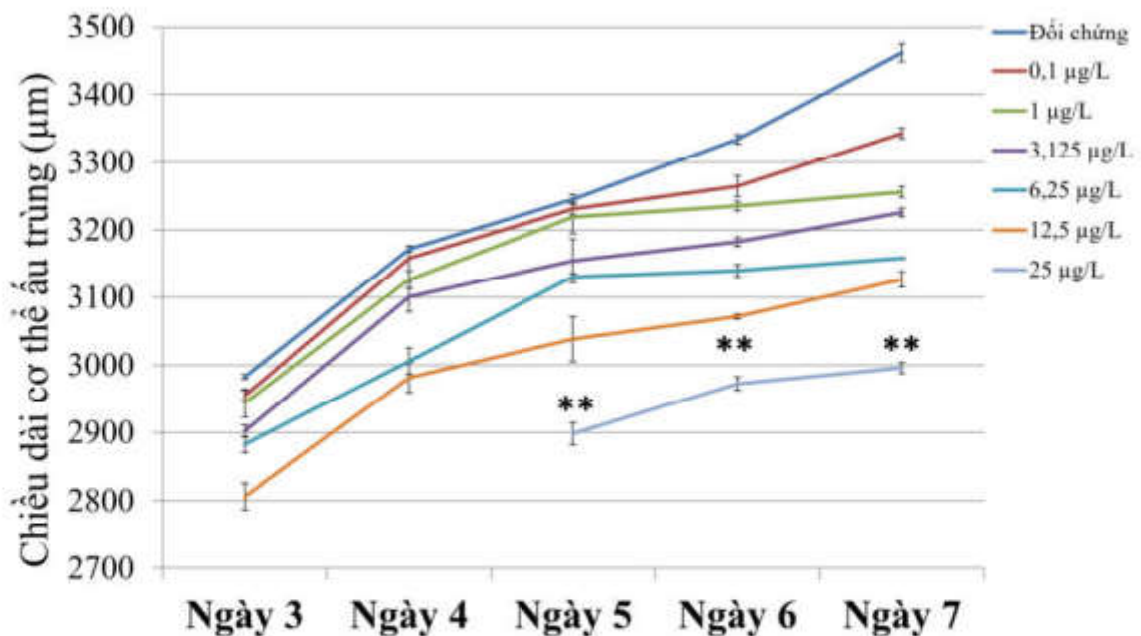
Ngoài các tác động đến tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng của cá ngựa vằn, sự phát triển về hình thái cũng bị ảnh hưởng bởi các nồng độ Crom (VI). Mức độ phát triển được đánh giá bằng cách đo chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Hình 3.11, 3.12, 3.13 và bảng số liệu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

$\mu\text{g/L}$; 12,5 $\mu\text{g/L}$ và 25 $\mu\text{g/L}$). 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 $\mu\text{g/L}$ đến 12,5 $\mu\text{g/L}$ có chiều dài cơ thể ngắn hơn so với nhóm đối chứng.

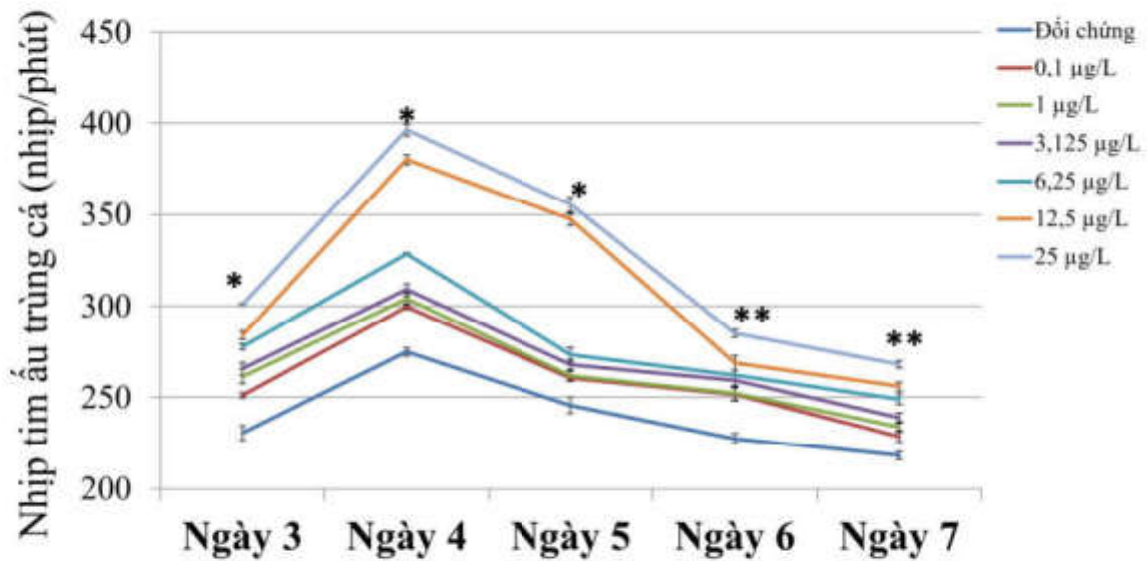
Sự chậm nở của phôi ở nồng độ Crom (VI) 25 $\mu\text{g/L}$ dẫn đến sự tăng trưởng thấp của ấu trùng cá ngựa vằn từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 7, với kích thước thay đổi từ 2898 μm đến 2996 μm . Những kết quả này cho thấy sự gia tăng nồng độ Crom (VI) đã gây ra mức độ ức chế đáng kể cho sự phát triển của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

Những thay đổi về kích thước phôi dẫn đến sự bất thường trong quá trình nở [79]. 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 $\mu\text{g/L}$.

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

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 ($p < 0,05$).

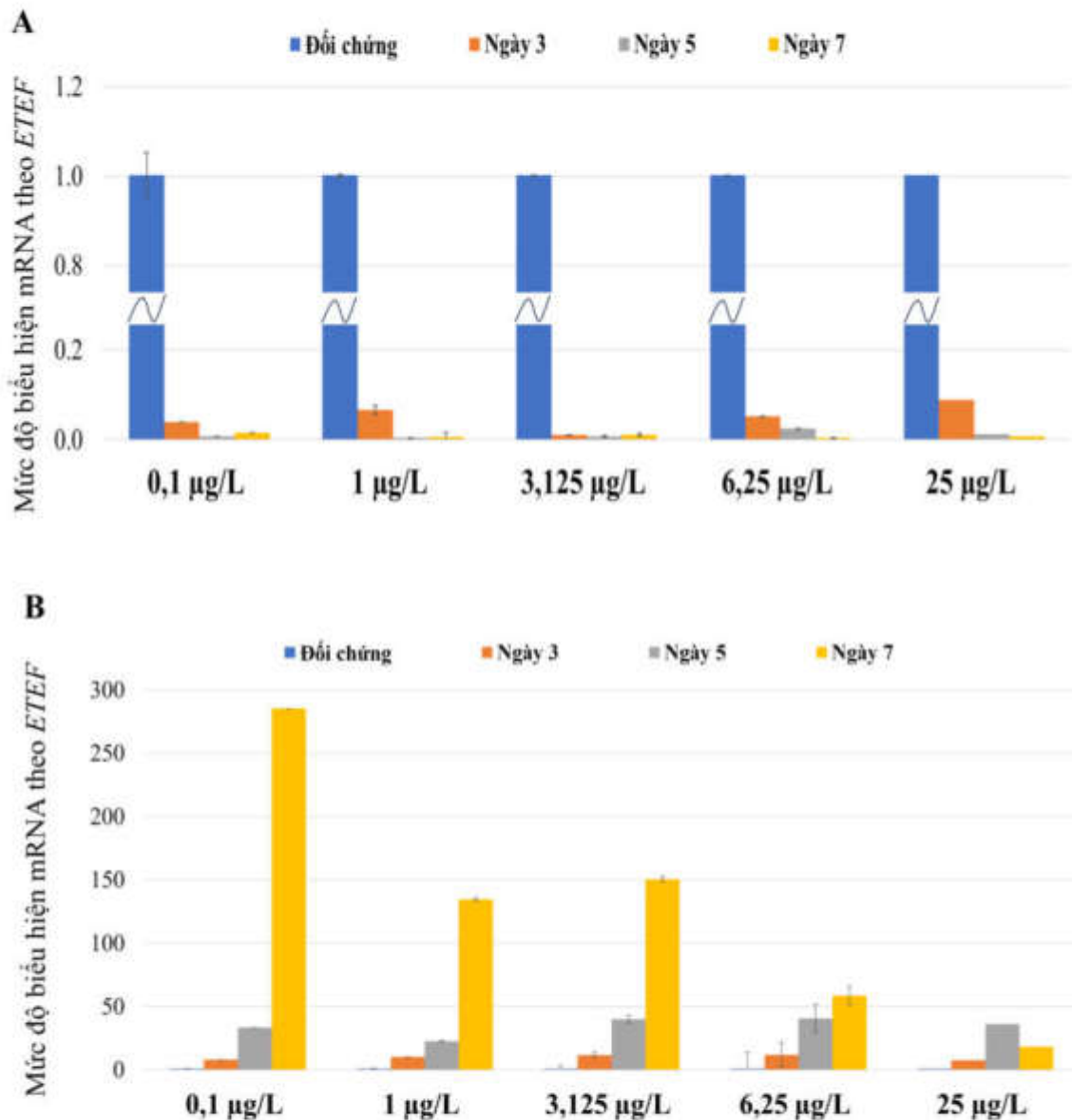
Crom (VI) đã ảnh hưởng đến nhịp tim của ấu trùng cá ngựa vằn theo một cách đặc biệt. Sự tăng nhịp tim có thể là một phản ứng tạm thời đầu tiên của cơ thể để thích nghi với tác động của Crom (VI) [21, 86, 87]. Tuy nhiên, khi tiếp tục tiếp xúc với Crom (VI) trong thời gian dài, cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn đã phản ứng chống lại sự tác động của 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.

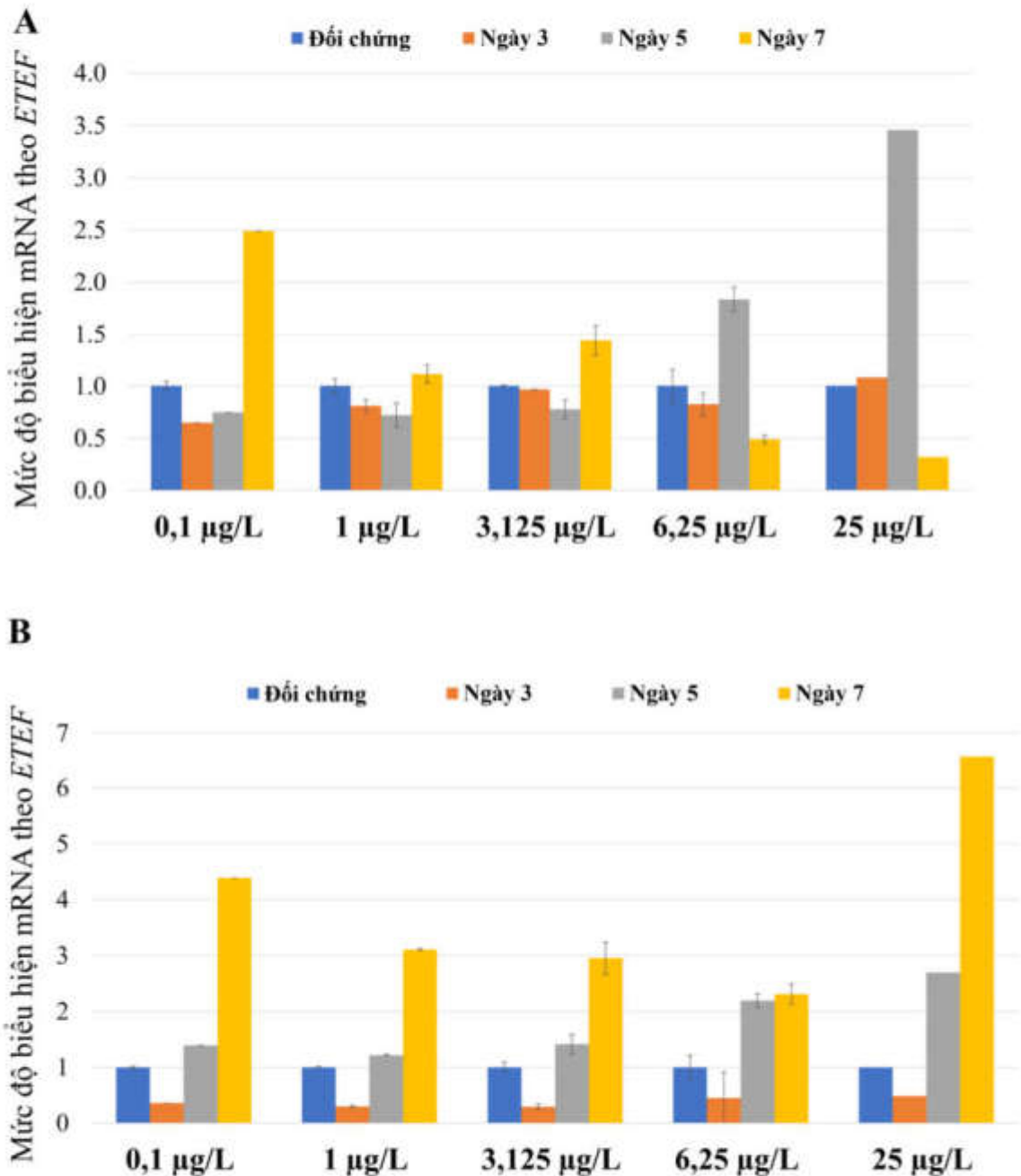
Ở ngày thứ 5, sự biểu hiện của gene *gadd45g* tiếp tục tăng so với ngày thứ 3 và nhóm đối chứng ở tất cả các nhóm thí nghiệm, nhưng không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm thí nghiệm. Điều này chứng tỏ rằng tác động của Crom (VI) vẫn tiếp tục gây tổn thương và gene *gadd45g* vẫn được kích hoạt để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

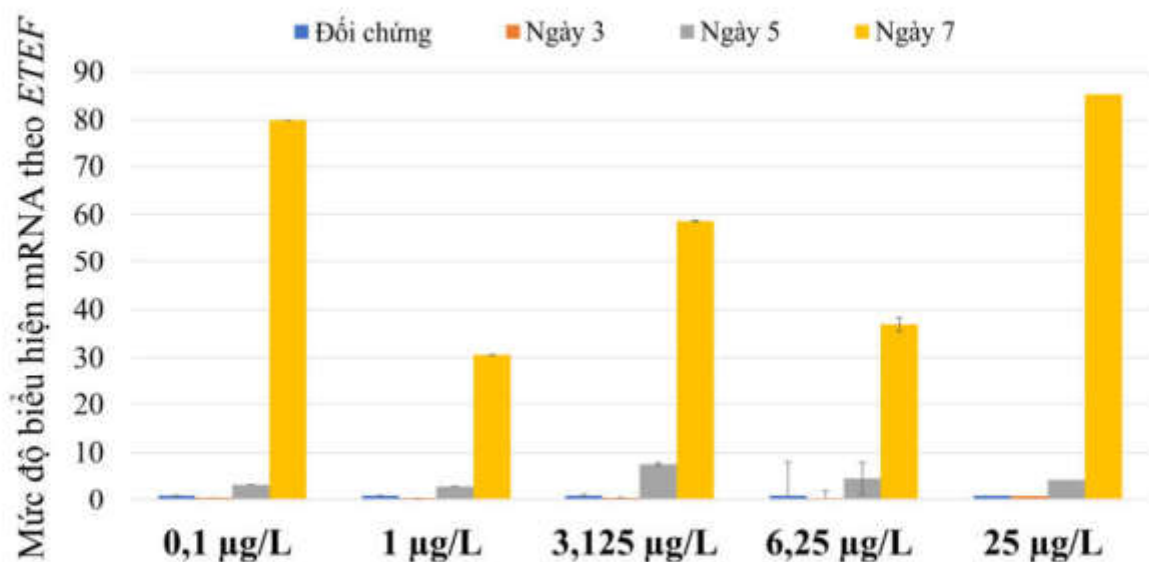
Kết quả nghiên cứu này cho thấy sự ảnh hưởng của Crom (VI) đối với sự phát triển của ấu trùng cá ngựa vằn có tác động trực tiếp đến biểu hiện gene *sod1* và *sod2*, hai gene này quan trọng tham gia vào quá trình kháng oxy hóa trong cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn.

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.

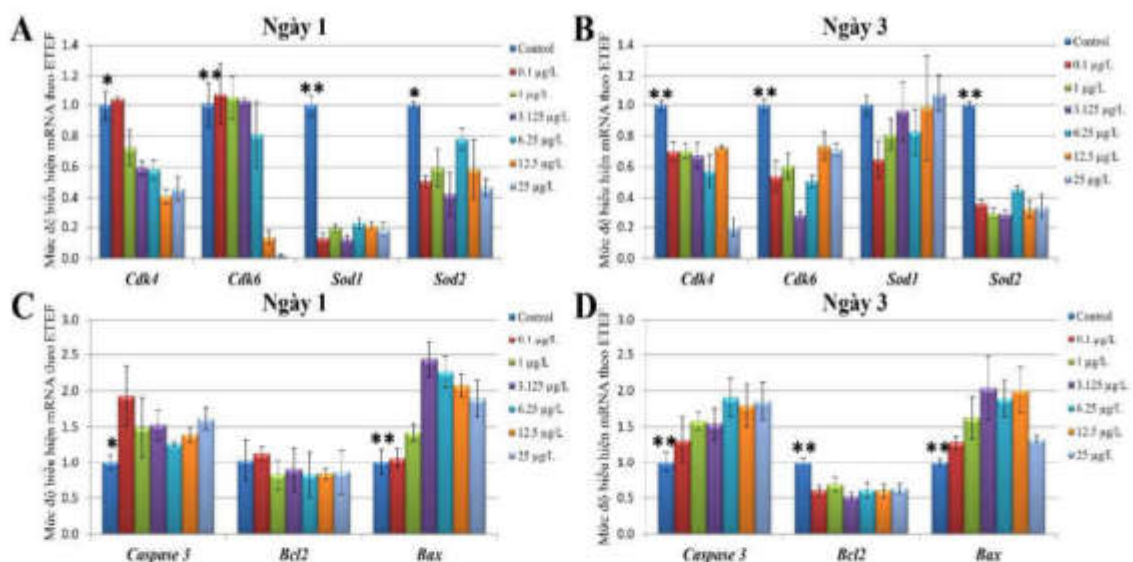
Ở ngày thứ 7, sự biểu hiện mRNA của gene *mt2* tăng so với ngày thứ 5 và có sự khác biệt trong biểu hiện mRNA của gene *mt2* giữa các nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng. Điều này chứng tỏ rằng Crom (VI) có ảnh hưởng đến biểu hiện mRNA của gene *mt2* sau một thời gian tiếp xúc và sự tăng biểu hiện này 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 ngựa 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 µg/L crom và 25 µg/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.

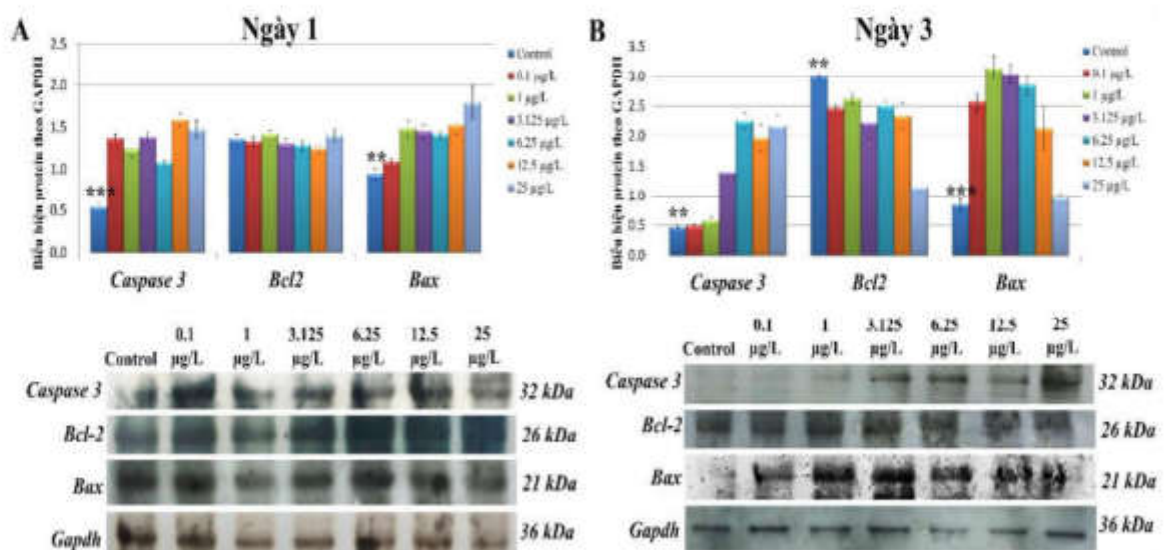
Các nhóm thí nghiệm tiếp xúc với Crom (VI) có mức độ biểu hiện của *sod1* đã tăng lên ở ngày thứ 3 sau khi biểu hiện giảm vào ngày thứ 1.

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 $\mu\text{g/L}$ biểu hiện tăng Bax so với nhóm đối chứng, biểu hiện tăng này tiếp tục nhận thấy ở nồng độ Crom (VI) 1 $\mu\text{g/L}$, nồng độ Crom (VI) 3,125 $\mu\text{g/L}$ và 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 đối chứng và nồng độ Crom (VI) 0,1 $\mu\text{g/L}$. 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 $\mu\text{g/L}$ biểu hiện tăng Bcl2 so với nhóm đối chứng, biểu hiện tăng này tiếp tục nhận thấy ở nồng độ Crom (VI) 1 $\mu\text{g/L}$, nồng độ Crom (VI) 3,125 $\mu\text{g/L}$ và 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 nồng độ Crom (VI) 1 $\mu\text{g/L}$ và 3,125 $\mu\text{g/L}$. Sự biểu hiện của protein Bcl2 trong phôi cá ở nồng độ 6,25 $\mu\text{g/L}$ 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 $\mu\text{g/L}$ biểu hiện tăng Caspase 3 so với nhóm đối chứng, biểu hiện tăng này tiếp tục nhận thấy ở nồng độ Crom (VI) 1 $\mu\text{g/L}$ và 3,125 $\mu\text{g/L}$. Sự biểu hiện của protein này không có sự khác biệt về mặt thống kê nồng độ Crom (VI) lần lượt là 0,1 $\mu\text{g/L}$, 1 $\mu\text{g/L}$ và 3,125 $\mu\text{g/L}$.

Sự biểu hiện của protein Caspase 3 trong phôi cá ở nồng độ 6,25 $\mu\text{g/L}$ 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

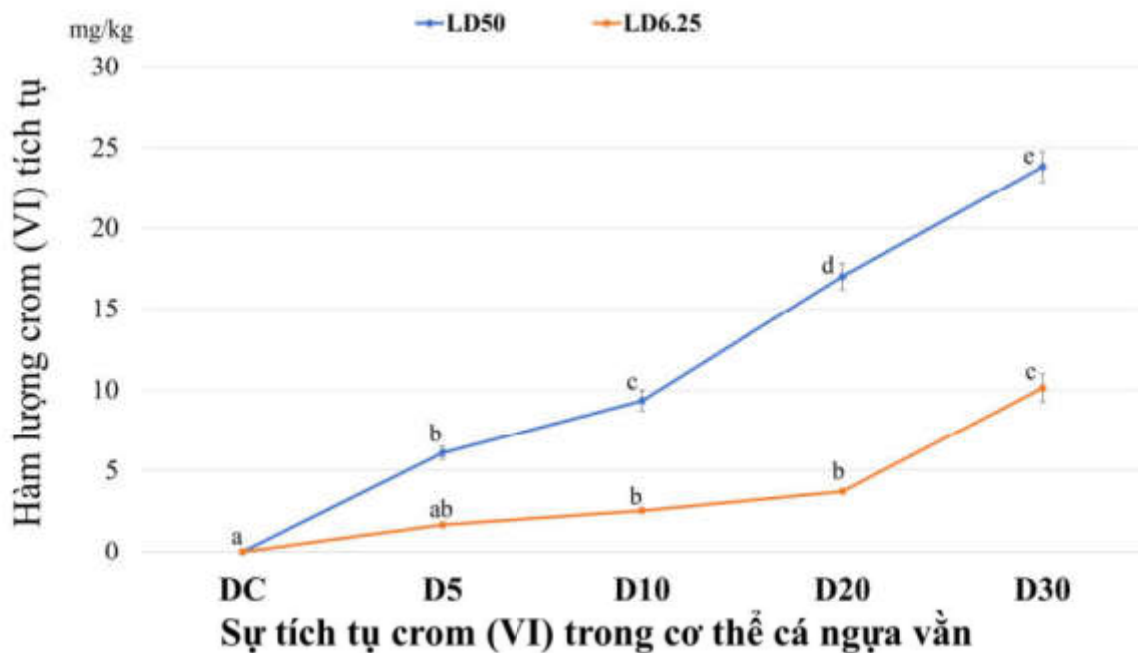
thứ 3 (hình 3.19 B) ở nhóm nồng độ Crom (VI) 0,1 $\mu\text{g/L}$ biểu hiện tăng Bax so với nhóm đối chứng, biểu hiện tăng này tiếp tục nhận thấy ở nhóm nồng độ Crom (VI) 1 $\mu\text{g/L}$, nhóm nồng độ Crom (VI) 3,125 $\mu\text{g/L}$ và nhóm nồng độ Crom (VI) 6,25 $\mu\text{g/L}$. Sự biểu hiện của protein 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 ($17,0 \pm 0,8$ 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

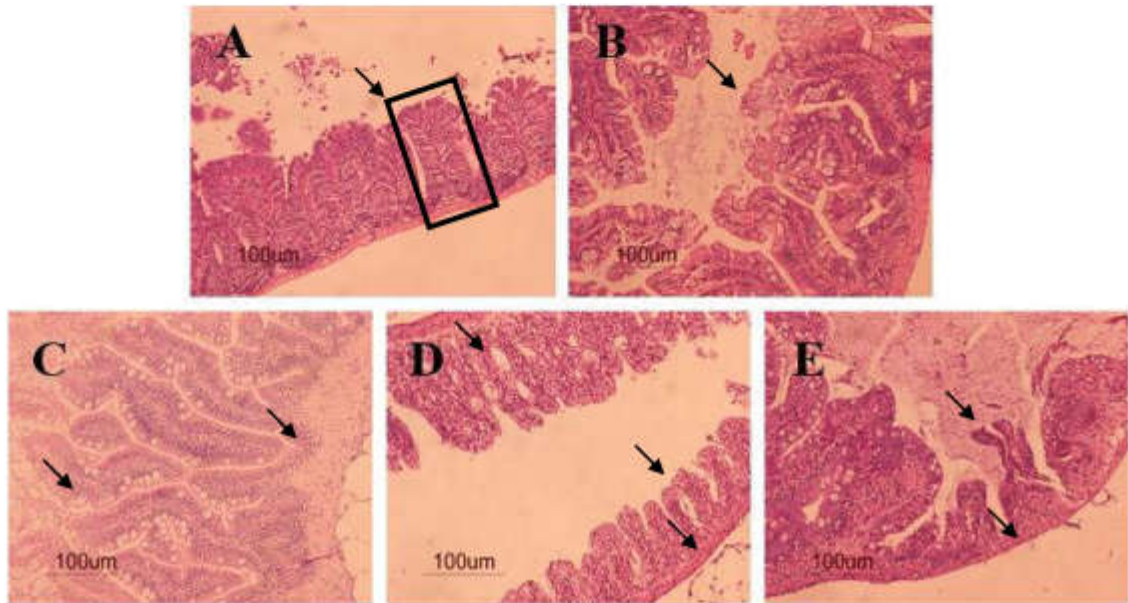
nhất ở ngày 30 ($10,1 \pm 0,9$ mg/kg) và cao gấp 5,9 lần so với ngày 5 ($1,7 \pm 0,1$ mg/kg), cao gấp 4,1 lần so với ngày 10 ($2,5 \pm 0,1$ mg/kg) và cao gấp 2,7 lần so với ngày 20 ($3,7 \pm 0,0$ mg/kg). Đối với lô đối chứng tỷ lệ là 0%, chứng tỏ lượng Crom (VI) không tích tụ trong cơ thể cá ngựa vằn.

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 dần 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*)

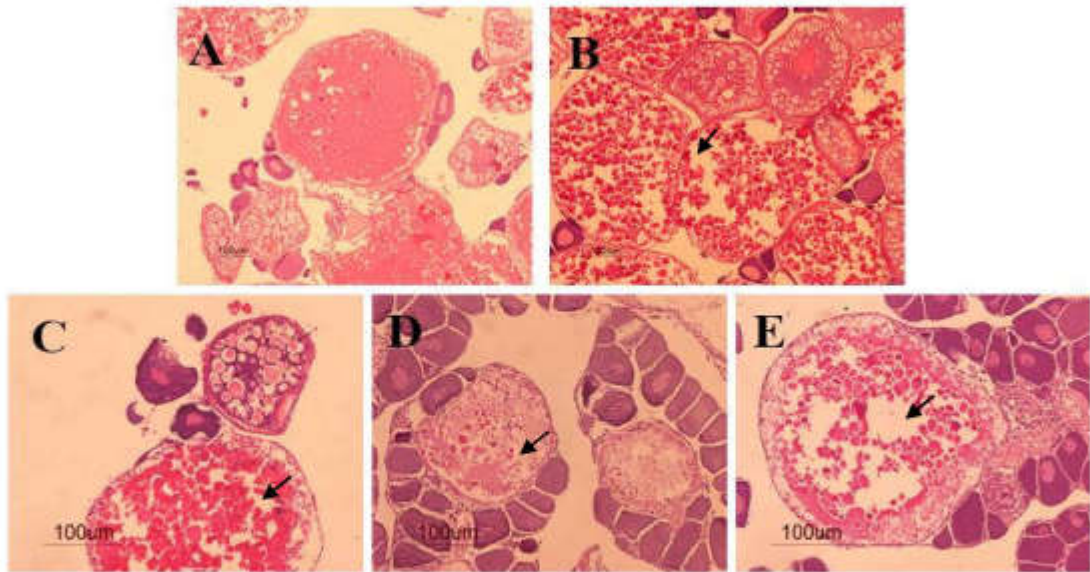
Sự tích tụ của Crom (VI) trong cơ thể cá ngựa vằn không chỉ gây ra các tổn thương đối với các mô tế bào mà còn gây ra sự thay đổi đáng kể trong cấu trúc của chúng. Nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc tiếp xúc với Crom (VI) có thể dẫn đến sự biến đổi của các mô quan trọng như mô ruột, mô gan và mô buồng trứng. 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 ngừ 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.



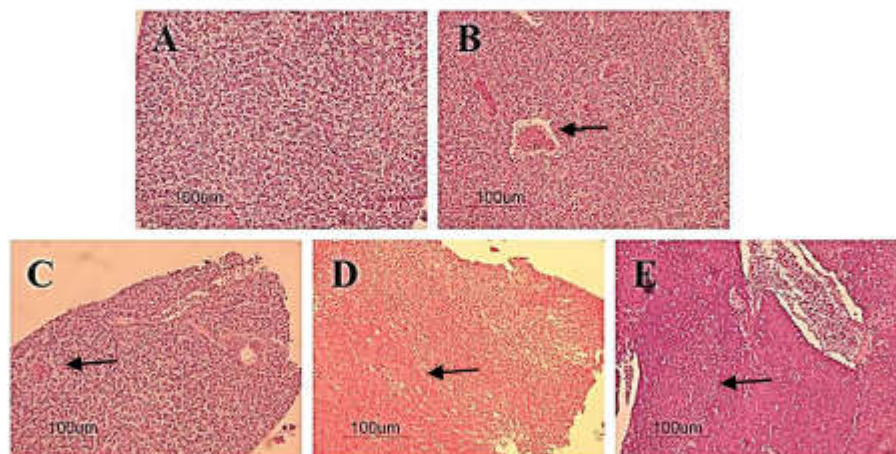
Hình 3.21. Hình cắt lớp mô ruột cá ngừ vằn sau khi tiếp xúc với nồng độ Crom (VI), độ phóng đại 200, thước đo 100µm. A: Hình cắt lớp mô nhóm đối chứng; B, C, D, E: Hình cắt lớp mô ruột cá ngừ vằn lần lượt của các ngày 5, 10, 20 và 30.

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, sự thay đổi này 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 lớp mô buồng trứng cá ngựa vằn khi tiếp xúc với nồng độ Crom (VI), độ phóng đại 200, thước đo 100µm. A: Hình cắt lớp mô buồng trứng của nhóm đối chứng; B, C, D, E: Hình cắt lớp mô buồng trứng lần lượt của các ngày 5, 10, 20 và 30. Mũi tên đen chỉ thị các vị trí cấu trúc không đồng đều tế bào.

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, tế bào chất phân bố không đồng đều, xuất hiện nhiều khoan rỗng. Ở ngày 5 đến ngày 30 tỷ lệ các hạt lipid giảm đều so với nhóm đối chứng.



Hình 3.23. Hình cắt lớp 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

Luận án đánh giá được tác động của Crom (VI) lên sự phát triển của cá ngựa vằn bao gồm tỷ lệ % sống của phôi, sự thay đổi nhịp tim, xác định hàm lượng Crom (VI) tích tụ trong cơ thể cá, đánh giá được sự ảnh hưởng của Crom (VI) lên cấu trúc mô ruột, mô gan, mô buồng trứng và sự biểu hiện các gene liên quan đến chu kỳ tế bào và các gene liên quan đến quá trình kháng oxy hóa.

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. Tarrance, 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. Langley, 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 Crolius, 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 embryo-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 TPHCM, 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.

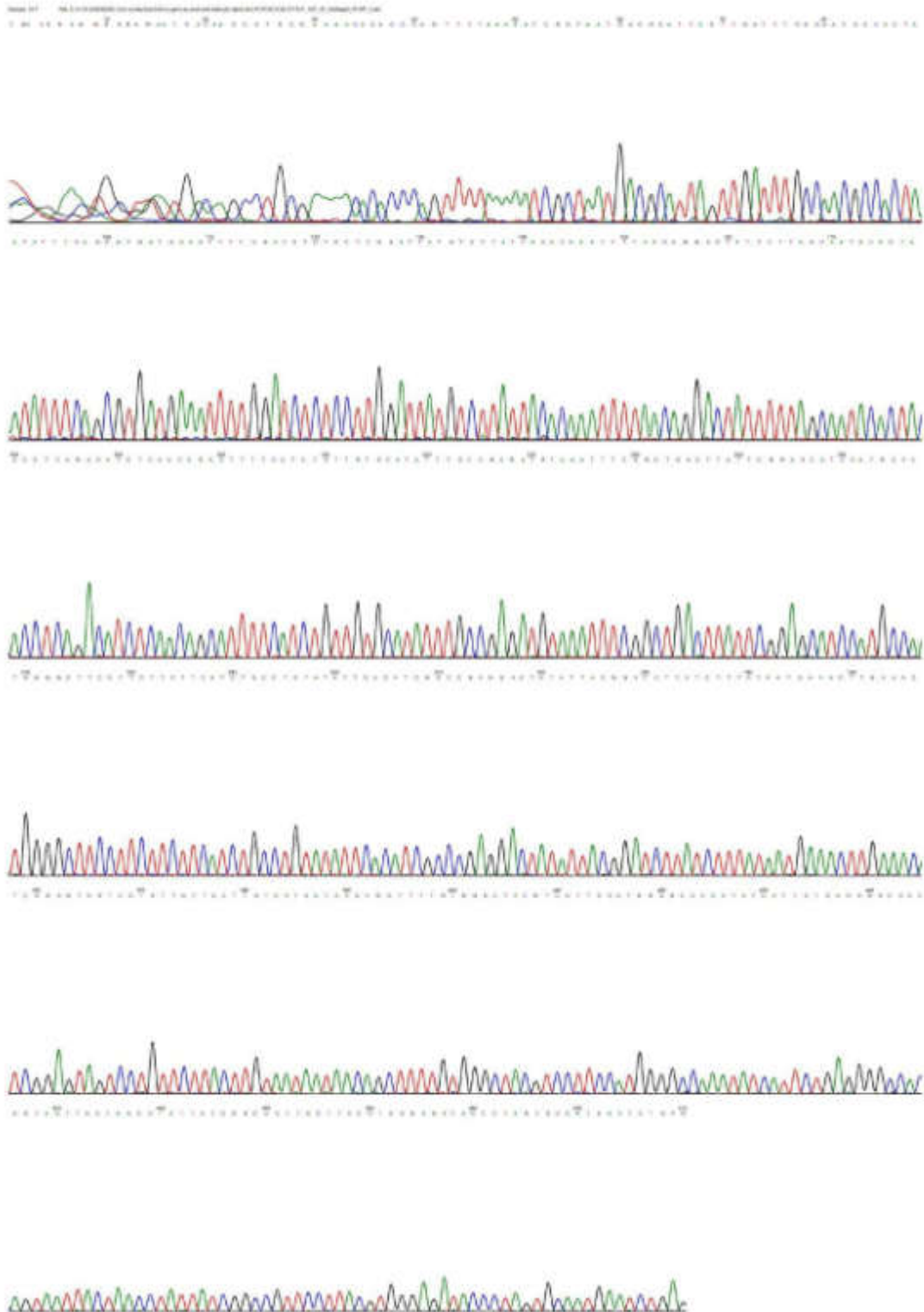
75. Topacio, B.R., E. Zatulovskiy, S. Cristea, S. Xie, C.S. Tambo, S.M. Rubin, J. Sage, M. Kõivomägi, J.M. Skotheim, *Cyclin D-Cdk4, 6 drives cell-cycle progression via the retinoblastoma protein's C-terminal helix*. *Molecular cell*, 2019. **74**(4): p. 758-770. e4.
76. Mayden, R.L., K.L. Tang, K.W. 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. Papanasi, 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.
80. 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.
81. 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.
82. NEGRAO, D., M.Z. NIEGOWSKA, C.L. GOMEZ, T. LETTIERI, *Testing comparability of existing and innovative bioassays for water quality assessment*.
83. 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.
84. 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.
85. 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.
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. Creti, 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.

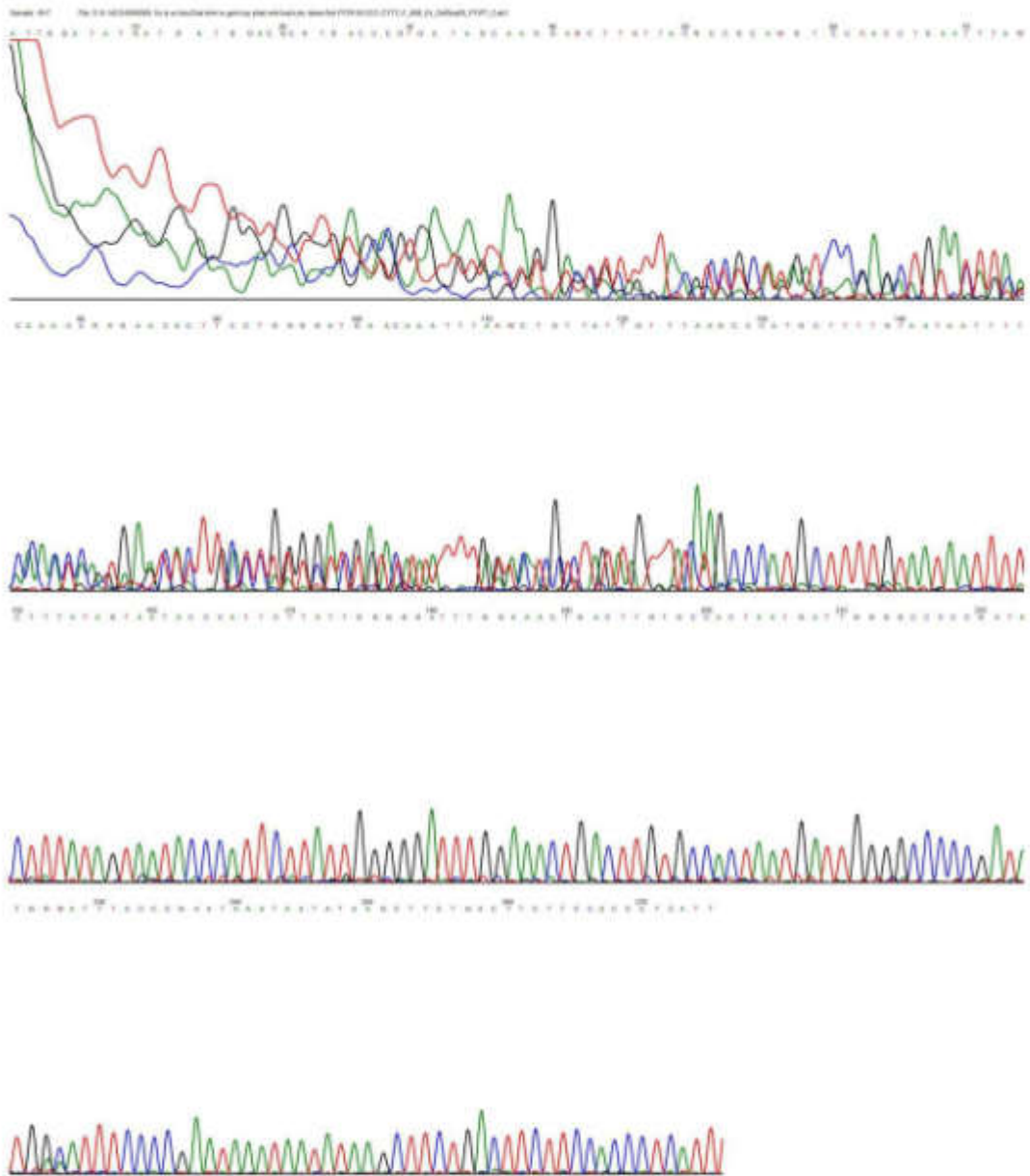
PHỤ LỤC

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

1.1. Gene *cytochrome b*



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

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	50	50	50	47	47	46	46	44	42
2	50	50	49	48	44	46	46	45	44
3	50	50	48	47	48	46	46	40	47
4	50	50	47	48	49	44	45	40	41
5	50	50	49	49	49	47	43	47	49

Tỷ lệ sống (%)

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	50	47	49	44	45	44	21	34	42
2	50	50	49	45	38	45	26	42	44
3	50	50	48	45	47	43	27	11	42
4	50	50	47	46	48	42	21	18	39
5	50	50	48	48	46	47	23	33	48

Tỷ lệ sống (%)

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) (µg/L)								
	ĐC	0.1	1	3.125	6.25	12.5	25	50	100
1	50	47	49	44	42	44	20	29	0
2	50	50	49	45	36	45	26	30	0
3	50	50	48	45	47	43	26	6	0
4	50	50	47	46	48	42	20	8	0
5	50	50	48	48	46	47	23	2	0

Tỷ lệ sống (%)

Stt	Các nồng độ Crom (VI) (µg/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) (µg/L)								
	ĐC	0.1	1	3.125	6.25	12.5	25	50	100
1	50	47	49	44	40	43	18	0	0
2	50	50	49	42	36	44	23	0	0
3	50	50	48	40	40	41	24	0	0
4	50	50	47	36	36	39	17	0	0
5	50	50	48	39	39	45	19	0	0

Tỷ lệ sống (%)

Stt	Các nồng độ Crom (VI) (µg/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) (µg/L)								
	ĐC	0.1	1	3.125	6.25	12.5	25	50	100
1	50	47	49	44	40	43	14	0	0
2	50	50	49	42	36	42	19	0	0
3	50	50	48	40	40	39	20	0	0
4	50	50	47	36	36	33	15	0	0
5	50	50	48	39	39	45	9	0	0

Tỷ lệ sống (%)

Stt	Các nồng độ Crom (VI) (µg/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) (µg/L)								
	ĐC	0.1	1	3.125	6.25	12.5	25	50	100
1	50	47	49	44	39	38	14	0	0
2	50	50	49	38	36	36	19	0	0
3	50	50	48	40	40	24	19	0	0
4	50	50	47	36	36	16	15	0	0
5	50	50	48	39	38	23	9	0	0

Tỷ lệ sống (%)

Stt	Các nồng độ Crom (VI) (µg/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) (µg/L)								
	ĐC	0.1	1	3.125	6.25	12.5	25	50	100
1	50	47	49	44	39	38	14	0	0
2	50	50	49	38	36	36	19	0	0
3	50	50	48	40	40	24	19	0	0
4	50	50	47	36	36	16	15	0	0
5	50	50	48	39	38	23	9	0	0

Tỷ lệ sống (%)

Stt	Các nồng độ Crom (VI) (µg/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) (µg/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 vào ngày thứ 4

Stt	Crom (VI) (µg/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 vào ngày thứ 5

Stt	Crom (VI) (µg/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 vào ngày thứ 6

Stt	Crom (VI) (µg/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) (µg/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
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 ấu 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 ấu 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 ấu 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	Đối 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	Đối 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

4. Sự tích tụ Crom (VI) trong cơ thể cá ngựa vằn

LD₅₀

Stt	Đối chứng	Ngày 5	Ngày 10	Ngày 20	Ngày 30
1	0.00	6.46	8.71	16.20	24.80
2	0.00	5.68	9.93	17.80	22.90

LC_{6.25}

Stt	Đối chứng	Ngày 5	Ngày 10	Ngày 20	Ngày 30
1	0.00	1.72	2.64	3.73	11.00
2	0.00	1.59	2.41	3.68	9.26

Số: 198 /QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 27 tháng 03 năm 2024

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện
GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 303/QĐ-VHL ngày 01/03/2023 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 08/2017/TT-BGDĐT ngày 04/04/2017 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế tuyển sinh và đào tạo trình độ tiến sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1948/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2018 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy định đào tạo trình độ tiến sĩ tại Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Quyết định số 2019/QĐ-HVKHCN ngày 10/12/2020 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận nghiên cứu sinh trúng tuyển đợt 2 năm 2020;

Xét đề nghị của Trưởng phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Đặng Đăng Khoa với đề tài:

Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá Ngựa vằn (*Danio rerio*)

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận án kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận án tiến sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ.

Quyết định có hiệu lực tối đa 90 ngày kể từ ngày ký. Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và nghiên cứu sinh có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. /

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ NCS;
- Lưu: VT, ĐT, MT17.

GIÁM ĐỐC



GS. TS. Vũ Đình Lâm

**DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ
CẤP HỌC VIỆN**



Kèm theo Quyết định số **198** /QĐ-HVKHCN ngày **27** / 03 /2024
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

Cho luận án của nghiên cứu sinh: **Đặng Đăng Khoa**

Tên đề tài: **Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá Ngựa vằn
(Danio rerio)**

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Thầy hướng dẫn: 1. PGS. TS. Nguyễn Thị Phương Thảo

- Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. TS. Lê Thành Long

- Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1	PGS. TS. Trần Lê Bảo Hà	Sinh lý học người và động vật	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM	Chủ tịch
2	PGS.TS. Nguyễn Thị Thương Huyền	Sinh lý học người và động vật	Trường Đại học Sư phạm TP. HCM, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Phản biện 1
3	PGS. TS. Nguyễn Thanh Bình	Công nghệ sinh học	Trường Đại học Thủ Dầu Một, Ủy ban Nhân dân tỉnh Bình Dương	Phản biện 2
4	PGS.TS. Ngô Xuân Quảng	Sinh thái học	Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 3
5	TS. Nguyễn Hoàng Dũng	Công nghệ sinh học	Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
6	PGS. TS. Nguyễn Thị Nga	Sinh thái học	Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Ủy viên
7	TS. Huỳnh Duy Thảo	Sinh lý học người và động vật	Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, Ủy ban Nhân dân TP.HCM	Ủy viên

(Hội đồng gồm 07 thành viên)./ *JH*

Hồ Chí Minh, ngày 09 tháng 5 năm 2024



**QUYẾT ĐỊNH THÀNH VIÊN HỘI ĐỒNG
ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN**

Nghiên cứu sinh: Đặng Đăng Khoa

Tên đề tài: Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá Ngựa vằn (*Danio rerio*).

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học.

Mã số: 9 42 02 01

Ngày bảo vệ: 09/05/2024

Số Quyết định thành lập Hội đồng: 198/QĐ-HVKHCN ngày 27/3/2024

Số TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chức danh trong Hội đồng	Chữ ký
1	PGS.TS. Trần Lê Bảo Hà	Chủ tịch	
2	PGS.TS. Nguyễn Thị Thương Huyền	Phản biện 1	
3	PGS.TS Nguyễn Thanh Bình	Phản biện 2	
4	PGS.TS Ngô Xuân Quảng	Phản biện 3	
5	TS Nguyễn Hoàng Dũng	Thư ký	
6	PGS.TS. Nguyễn Thị Nga	Ủy viên	
7	TS. Huỳnh Duy Thảo	Ủy viên	

Tp. HCM, ngày 14 tháng 04 năm 2024

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Tên đề tài luận án: “Đánh giá ảnh hưởng của kim loại Crom (VI) lên sự phát triển của cá Ngựa vằn (*Danio rerio*)”

Người nhận xét: PGS. TS. Nguyễn Thị Thương Huyền

Cơ quan công tác của người nhận xét: Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Đề tài có tính cần thiết, thời sự, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao. Kết quả nghiên cứu này có thể góp phần giải quyết các vấn đề về ô nhiễm môi trường và bảo vệ môi trường. Cụ thể:

- *Tính cần thiết:*

+ Crom (VI) là một kim loại nặng phổ biến trong môi trường do các hoạt động công nghiệp và nông nghiệp. Nó có độc tính cao đối với nhiều sinh vật, bao gồm cả cá.

+ Cá Ngựa vằn (*Danio rerio*) là một mô hình sinh học phổ biến được sử dụng trong nghiên cứu khoa học. Chúng có kích thước nhỏ, dễ nuôi dưỡng và sinh sản, có bộ gene đã được giải mã.

+ Nghiên cứu ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá Ngựa vằn sẽ giúp chúng ta hiểu rõ hơn về độc tính của kim loại này và ảnh hưởng của nó đến môi trường.

- *Tính thời sự:* ô nhiễm môi trường do kim loại nặng là một vấn đề ngày càng gia tăng trên toàn thế giới. Hiểu rõ hơn về độc tính của kim loại nặng đối với sinh vật là cần thiết để phát triển các biện pháp phòng ngừa và kiểm soát hiệu quả.

- *Ý nghĩa khoa học:* nghiên cứu này sẽ cung cấp thông tin mới về cơ chế độc hại của Crom (VI) đối với cá ngựa vằn nói riêng và các động vật thủy sinh nói chung. Nó sẽ giúp chúng ta hiểu rõ hơn về vai trò của các yếu tố môi trường trong sự phát triển của cá. Kết quả nghiên cứu này có thể được sử dụng để phát triển các phương pháp đánh giá rủi ro môi trường và các biện pháp bảo vệ môi trường.

- *Ý nghĩa thực tiễn:* nghiên cứu này có thể giúp cải thiện chất lượng nước và bảo vệ môi trường; có thể giúp phát triển các biện pháp kiểm soát ô nhiễm kim loại nặng hiệu quả

hơn. Ngoài ra, đề tài này còn có ý nghĩa giáo dục, giúp nâng cao nhận thức của cộng đồng về tác hại của ô nhiễm môi trường và tầm quan trọng của việc bảo vệ môi trường.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đề tài luận án của NCS không có sự trùng lặp với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước. Các số liệu, các trích dẫn trong đề tài có tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong danh mục tài liệu tham khảo. Các tài liệu trích dẫn có nguồn gốc rõ ràng, phù hợp với quy định chung.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên đề tài phù hợp với nội dung trình bày trong luận án; giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành là phù hợp.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu sử dụng trong đề tài hợp lý với nội dung nghiên cứu: phương pháp phối cá, thu phối, phương pháp đánh giá nhịp tim, chiều dài, phương pháp định danh cá ngựa vằn,... Các số liệu của luận án đã được xử lý thống kê thông bằng phần mềm Sigma Plot, với mức độ tin cậy là 90%, nên đảm bảo độ chính xác của các kết quả và có độ tin cậy cao.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống, ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó

- Crom (VI) có khả năng ức chế sự phát triển và làm chậm quá trình nở (thoát màng) của phối cá ngựa vằn ở giai đoạn sớm: tỉ lệ sống của phối, ấu trùng và chiều dài ấu trùng giảm dần theo sự tăng dần nồng độ khảo sát; nhịp tim tăng theo độ tăng của nồng độ khảo sát; xuất hiện các dị tật ở ấu trùng.

- Crom (VI) có thể cảm ứng sự sai hỏng trong cấu trúc ruột, gan và buồng trứng của cá ngựa vằn.

- Crom (VI) cảm ứng sự thay đổi biểu hiện một số gene liên quan đến quá trình apoptosis

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Đề tài có khối lượng công việc đủ cho luận án tiến sĩ, các phương pháp nghiên cứu đáng tin cậy và phù hợp, giải quyết được các vấn đề đặt ra ban đầu. Tuy nhiên, tác giả

cần trình bày phương pháp một cách rõ ràng và khoa học hơn; luận án còn nhiều lỗi chính tả và lỗi trình bày.

Góp ý:

6.1. Tóm tắt

NCS cần viết lại cho cô đọng hơn: cần có mục tiêu, phương pháp, kết quả và kết luận.

6.2. Mở đầu (3 trang)

NCS cần xem lại cách viết để tránh trùng lặp với phần tổng quan ở trang 5 và trang 6.

Mục tiêu cần viết thêm ý nghĩa của đề tài hoặc tách riêng một mục ý nghĩa của đề tài (ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn).

6.3. Chương 1. Tổng quan (24 trang) là còn ít so với công trình một luận án tiến sĩ, NCS cần bổ sung các nội dung liên quan để có cơ sở khoa học cho phần bản luận.

Các mục viết còn dài, chưa có tiểu kết của từng mục. NCS cần tách thành các tiểu mục. Cần có tổng quan về tình trạng ô nhiễm Crom hiện nay; cơ chế gây độc của Crom nói chung và Crom (VI) lên cơ thể động vật; các phương pháp định danh cá ngựa vằn; các gene *Caspase 3*, *Bax* và *Bcl2* (cần viết rõ hơn).

Cần có hình ảnh ấu trùng cá ngựa vằn từ lúc nở đến giai đoạn 7 ngày tuổi, giai đoạn trưởng thành.

Kết thúc phần tổng quan về các công trình nghiên cứu trong và ngoài nước, NCS cần viết một đoạn hoặc một mục nhận định về tình hình nghiên cứu.

Tổng quan về độ độc cấp tính của Crom.

6.4. Chương 2. Vật liệu và Phương pháp nghiên cứu (19 trang)

- Bổ sung nguồn cá mua từ đâu? Kích thước bể nuôi cá.

- Lỗi chính tả: phin => phình; thủy tinh => thủy tinh;

- Trang 30: Hình 2.1 và 2.2 cần gộp lại thành một hình, chú ý size chữ trong sơ đồ (đang quá nhỏ), cũng cần bổ sung phần định danh cá vào sơ đồ bố trí thí nghiệm tổng thể. Cơ sở chọn các nồng độ Crom và các gene khảo sát; các ngày đánh giá hàm lượng Crom tích tụ trong cơ thể cá và tác động lên nội quan cá.

Tại sao tác giả không gây nhiễm Crom liên tục từ phôi đến cá trưởng thành mà tách thành 2 giai đoạn phôi đến ấu trùng; nhiễm trên cá trưởng thành. Như vậy có đánh giá được tính liên tục như tên đề tài không?

Trang 35: cần mô tả chi tiết phôi cá và thu phôi (thời gian nào trong ngày, làm sao để thu được phôi đúng giai đoạn cần cho thí nghiệm?)

Trang 36: hút phôi 2-3 lần như vậy có gây tác động cơ học đến phôi không? Liệu có ảnh hưởng đến tỉ lệ sống, tỉ lệ nở của phôi không?

Chi tiêu đánh giá phôi cần mô tả một cách rõ ràng hơn.

Trang 37: bổ sung mô tả cách xác định nhịp tim của cá ngựa vằn.

Trang 39: Bảng 2.8 => cần để trên một trang.

Trang 42. Cần có kết quả phân tích hàm lượng Crom trong mẫu cá ở phụ lục (đường dẫn cụ thể).

Trang 44: cần mô tả chi tiết cách thu mẫu và số mẫu dùng cho nhuộm H&E.

Cơ sở chọn LC50 của phôi và ấu trùng? Tại sao ở cá trưởng thành không có làm 2 nồng độ 50 và 100 $\mu\text{g/L}$?

6.5. Chương 3. Kết quả và Thảo luận

Mục định danh bằng hình thái cần viết kết quả ngắn gọn.

Các nội dung đầu của kết quả đã nói ở phương pháp sẽ không lặp lại ở kết quả.

Trang 51: Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử nên viết sao cho cô đọng hơn.

Xem lại thuật ngữ ngân hàng gene *Danio rerio*.

Trang 56: nên có hình ảnh các dạng bất thường của phôi cá ngựa vằn.

Các hình vẽ đồ thị => cần chú thích các kí hiệu mà sắc sao cho dễ phân biệt hơn.

Trang 58: Cơ sở nào để đưa ra LC50 vào ngày thứ 3 và thứ 7 lần lượt là 32,3 $\mu\text{g/mL}$ và 16,4 $\mu\text{g/mL}$?

Trong phụ lục cần trình bày số liệu thô về phôi và ấu trùng cụ thể ở mỗi nghiệm thức chứ không phải tỉ lệ %.

Trang 74. Hình 3.20 cần bổ sung đơn vị, nên là biểu đồ dạng cột mới thích hợp.

Trang 75-77: kết quả mô học còn phân tích và chú thích hình sơ sài, hình ảnh chưa thấy thể hiện ổ viêm.

Tại sao tác giả chỉ làm trên mô buồng trứng mà không có trên mô tinh sào của cá?

Phần bản luận còn sơ sài.

6.6. Kết luận: cần viết ngắn gọn tương ứng với các nội dung nghiên cứu.

6.7. Phụ lục: bổ sung kết quả phân tích Crom; số liệu thô về phôi, ấu trùng.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu Hội nghị Khoa học và giá trị của các công trình đã công bố

Nội dung của luận án được tác giả công bố trong 02 bài báo trên các tạp chí chuyên ngành có uy tín, phản ánh kết quả chủ yếu của luận án.

- Bài báo 1 được đăng ở tạp chí Current Issues in Molecular Biology 2023, 45(8), 6916-6926. SCIE Q2, IF 3.1, H-Index 57.

- Bài báo 2 đăng ở tạp chí International Journal of Biosciences 2023, 23(3): pp 164-169.

8. Kết luận chung

- Nội dung và kết quả nghiên cứu của luận án đáp ứng được các yêu cầu của một luận án Tiến sĩ chuyên ngành Công nghệ Sinh học.

- Những kết quả nghiên cứu của luận án có tính thực tiễn cao.

- Nội dung bản tóm tắt luận án thể hiện được đầy đủ nội dung cơ bản của luận án.

- Luận án có thể được đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận bằng Tiến sĩ.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 09 tháng 5 năm 2024

Người nhận xét



PGS. TS. Nguyễn Thị Thương Huyền

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên đề tài luận án: “**Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá Ngựa vằn (*Danio rerio*)**”.

Chuyên ngành đào tạo: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Họ và tên nghiên cứu sinh: Đặng Đăng Khoa

Cán bộ hướng dẫn :

Cán bộ hướng dẫn 1: PGS. TS. Nguyễn Thị Phương Thảo

Cán bộ hướng dẫn 2: TS. Lê Thành Long

Người nhận xét: PGS.TS. Trần Lê Bảo Hà

Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án.

Crom là một nguyên tố vết thiết yếu, giúp tăng cường hoạt động của hormone insulin, tổng hợp acid béo, cholesterol, hoạt động của não bộ... trong cơ thể con người và động vật. Tuy nhiên, việc phơi nhiễm crom có thể gây ra nhiều tác hại cho cơ thể như lão hóa sinh sản, gây chết tế bào theo chương trình, ung thư và có thể dẫn đến tử vong. Do đó, các đánh giá về tác động của crom đối với cơ thể ở các cấp độ từ mức cơ quan, mô, tế bào, phân tử cần được thực hiện để có các minh chứng thực nghiệm, từ đó làm tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn nhằm bảo vệ sức khỏe cho con người và động vật. Do đó, luận án có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

Luận án không trùng lặp so với các luận án hay công trình khoa học đã công bố trong và ngoài nước.

Luận án có 101 tài liệu tham khảo tiếng Việt và tiếng Anh, trong đó 24 tài liệu trong 5 năm gần đây. Các tài liệu tham khảo được trích dẫn rõ ràng. Tuy nhiên, cần thống nhất cách viết tài liệu tham khảo (tên tác giả có in hoa không/81, nếu công trình có quá nhiều tác giả thì có thể giới hạn số tác giả và công sự không/23)

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

Tên luận án phù hợp với nội dung, nội dung phù hợp với ngành Công nghệ sinh học và mã số ngành 9420201.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.

- Các nguyên vật liệu, trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu từ các hãng uy tín: Merck, Abcam, Bio-Rad Thermo Scientific, Agilent...

- Các phương pháp nghiên cứu phù hợp: phương pháp định danh cá ngựa vằn, phương pháp đánh giá biểu hiện mức độ phiên mã của các gene...

- Các thí nghiệm được thiết kế chặt chẽ, có nhóm chứng, theo tiến trình rõ ràng. Phương pháp xử lý số liệu phù hợp.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả.

Đã ghi nhận được crom (VI) có khả năng gây ức chế sự phát triển và làm chậm quá trình thoát nang của phôi cá ngựa vằn; cảm ứng sự sai hỏng trong cấu trúc ruột, gan, buồng trứng; cảm ứng sự thay đổi biểu hiện của một số gene liên quan đến sự chết theo chương trình của tế bào.

Các kết quả đạt được này thực sự có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao, có giá trị trong nghiên cứu độc học và hướng đến chăm sóc sức khoẻ con người, động vật.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Luận án được trình bày rõ ràng, dễ đọc, cấu trúc phù hợp. Cần lưu ý một số vấn đề sau:

- Nguồn nước, thức ăn cho cá ngựa vẫn có chuẩn không? Có kiểm tra kim loại nặng?

- Có sử dụng công thức tính cỡ mẫu cho các nghiệm thức không?

- Có tuân theo đạo đức trong nghiên cứu không?

- Có rất nhiều lỗi chính tả, lỗi đánh máy

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.

Hai bài báo khoa học được đăng trên các tạp chí ngoài nước (thuộc danh mục do Hội đồng chức danh Giáo sư Nhà nước quy định), trong đó có một bài báo SCIE, Q2, IF3.1 (Current Issues in Molecular Biology).

Các bài báo đều thể hiện trực tiếp nội dung của luận án.

8. Kết luận chung

Luận án đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ ngành Công nghệ sinh học.

Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án.

Luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ.

Người nhận xét



Trần Lê Bảo Hà

BẢN NHẬN XÉT/ PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên đề tài luận án: “Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá Ngựa vằn (*Danio rerio*)”.

Chuyên ngành đào tạo: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Họ và tên nghiên cứu sinh: Đặng Đăng Khoa

Cán bộ hướng dẫn :

Cán bộ hướng dẫn 1: PGS. TS. Nguyễn Thị Phương Thảo

Cán bộ hướng dẫn 2: TS. Lê Thành Long

Người nhận xét/ Người phản biện: PGS.TS Nguyễn Thanh Bình

Cơ quan công tác: Trường Khoa Y dược - Đại học Thủ Dầu Một

Nội dung nhận xét:

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án:

Xác định nồng độ Cr nhằm xác định độc tính của kim loại nặng và tác động của kim loại nặng này trên cá thể cá ngựa vằn (*Danio rerio*) và làm cơ sở khoa học đánh giá tác động đến sức khỏe con người trong tương lai.

Thông qua cá thể ngựa vằn, đánh giá tác động Cr trên các giai đoạn phát triển phôi, ấu trùng và cá trưởng thành để ghi nhận tác động của kim loại nặng đến quá trình phát triển và ảnh hưởng tác động của Cr.

Đề tài có ý nghĩa học, làm cơ sở cho việc đánh giá yếu tố gây độc và nguy cơ gây biến đổi qua việc đánh giá cấp độ tế bào và cá thể trưởng thành

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Hiện tại chưa có nghiên cứu ảnh hưởng Cr trên cá thể ngựa vằn.

Đề tài rõ ràng và đầy đủ các trích dẫn tài liệu tham khảo

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

Nội dung đề tài phù hợp với tên đề tài và mã số chuyên ngành

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.
Đề tài sử dụng các phương pháp khoa học phù hợp cho việc đánh giá các chỉ tiêu trong nghiên cứu

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả.

- Khẳng định Crom gây ra những thay đổi trong quá trình phát triển của phôi và ấu trùng

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Ưu điểm:

- Luận văn trình bày rõ các mục, người đọc dễ hiểu và có thể đánh giá được luận văn

- Hình ảnh rõ ràng và mang tính minh chứng khoa học cao

Một số lưu ý:

- Tóm tắt luận án: cần viết lại theo chuẩn quy định

- Tính cấp thiết của đề tài cần bổ sung cơ sở khoa học tác giả chọn đối tượng nghiên cứu là cá ngựa vằn trên cơ sở có những nghiên cứu trước đây. Cần làm rõ tính mới trong nghiên cứu của mình

- Hình trích dẫn cùng kích thước

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.

Công bố 2 tạp chí khoa học ISI

8. Kết luận chung:

Đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành.

Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án

Luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ được hay không.

Người nhận xét



Nguyễn Thanh Bình

BẢN NHẬN XÉT/ PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên đề tài luận án: “**Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá Ngựa vằn (*Danio rerio*)**”.

Chuyên ngành đào tạo: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Họ và tên nghiên cứu sinh: Đặng Đăng Khoa

Cán bộ hướng dẫn :

Cán bộ hướng dẫn 1: PGS. TS. Nguyễn Thị Phương Thảo

Cán bộ hướng dẫn 2: TS. Lê Thành Long

Người phản biện: PGS.TS. Ngô Xuân Quảng

Cơ quan công tác: Viện sinh học nhiệt đới.

NỘI DUNG NHẬN XÉT:

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án.

Trước tốc độ phát triển kinh tế và quá trình công nghiệp hoá tăng nhanh, rất nhiều hệ sinh thái và môi trường đất, nước và không khí đang bị ô nhiễm, đặc biệt là ô nhiễm kim loại nặng đang là vấn đề đáng báo động. Trong số các ô nhiễm kim loại đáng lưu ý thì ô nhiễm Crom VI (ion Cr^{6+}) có độc tính cao và gây hại cho các loài thủy sinh vật và sức khỏe con người. Crom VI có trong nước thải sản xuất kim loại, xử lý bề mặt kim loại, sản xuất thuốc nhuộm, nhà máy dệt may, da giày,... Nguồn nước ô nhiễm chứa Crom (VI) có thể gây độc đối với cá, tôm, cua và các sinh vật phù du, hạn chế quá trình quang hợp của tảo, ảnh hưởng đến chuỗi thức ăn trong hệ sinh thái thủy vực. Crom VI có thể nhiễm vào cơ thể người qua đường các nguồn thực phẩm thủy sản bị ô nhiễm Crom VI, qua hô hấp hay qua da sẽ gây ngộ độc crom, dẫn đến các triệu chứng như đau bụng, nôn mửa, tiêu chảy, suy thận, gây ung thư thậm chí tử vong.

Do đó, nghiên cứu về ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự sinh trưởng và phát triển của các loài thủy sinh, thủy sản là rất quan trọng, cần thiết, có tính thời sự và khoa học. Đề tài lựa chọn cá ngựa vằn (*Danio rerio*) làm đối tượng nghiên cứu là mô hình động vật có xương sống phù hợp cho các nghiên cứu in vivo về độc tính thủy sinh vật.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

- Đề tài của luận án không trùng lặp với các công trình, luận án đã công bố trong và ngoài nước.

- Các tài liệu tham khảo trích dẫn rõ ràng, đầy đủ, đúng quy định.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

- Tên đề tài và nội dung luận án là phù hợp.
- Nội dung luận án phù hợp với chuyên ngành công nghệ sinh học và mã số của chuyên ngành.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.

- Phương pháp nghiên cứu của luận án có tính hiện đại, được ứng dụng rộng rãi trong các công bố trên thế giới, đáng tin cậy, áp dụng phù hợp cho đối tượng và các nội dung nghiên cứu.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả.

Đề tài đóng góp mới trong việc nghiên cứu tác động của Crom (VI) lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cá ngừ vân như:

- Ức chế sự phát triển và làm chậm quá trình thoát nang của phôi cá ngừ vân ở giai đoạn sớm như giảm tỉ lệ sống, sự thay đổi chiều dài cơ thể ấu trùng, nhịp tim tăng và các hình thái dị tật cá.
- Gây sai hỏng trong cấu trúc một số nội quan quan trọng của cá như ruột (tăng lông nhung), gan (viêm) và buồng trứng (giảm các hạt lipid trong mô). Đây cũng chính là tác động trực tiếp lên hệ nội tiết và hệ tiêu hoá của cá.
- Tác động thay đổi biểu hiện của một số gene liên quan quá trình stress oxy hoá và apoptosis.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Ưu điểm

- Kết cấu và hình thức của luận án được thực hiện tốt, đáp ứng được mục tiêu đề ra. Các nội dung của luận án đầy đủ, hình thức trình bày đẹp.
- Tổng quan phong phú, bao quát được các vấn đề chính của luận án.
- Nghiên cứu sinh đã triển khai thí nghiệm, thu thập dữ liệu, tổng hợp và phân tích rất công phu để hoàn thành các nội dung đặt ra.
- Kết quả và thảo luận của luận án cho thấy nghiên cứu sinh đã tìm hiểu sâu các công trình liên quan để đối chiếu và biện luận.

- Nghiên cứu sinh tư duy tốt, phát triển ý phong phú và có nhiều phát hiện thú vị, có giá trị khoa học.
- Kết quả luận án là cơ sở khoa học quan trọng cho công tác nghiên cứu phơi nhiễm độc tố môi trường, an toàn thực phẩm và sức khỏe y học.

Nhược điểm:

- Phần tổng quan nên tìm hiểu thêm các nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam về ảnh hưởng của Crom VI lên các loài cá hay loài thủy sinh vật khác? Không chỉ trên chuột? Các nghiên cứu này đã phát hiện những gì, nghiên cứu tới đâu?
- Bảng 2.6, tên các loài cá trên ngân hàng GenBank nên được in nghiêng.
- Phương pháp phân tích số liệu còn sơ sài, cần chi tiết hơn. Cần ghi rõ phương pháp kiểm tra điều kiện đáp ứng phân tích ANOVA hay không? Bao nhiêu yếu tố? phương pháp gì được dùng khi kiểm định ANOVA không thoả mãn?
- Các nghiên cứu ảnh hưởng của Crom VI lên phát triển của cá ngựa vẫn còn ở mức định tính mô tả, nên tìm hiểu sâu hơn về định lượng ở các nồng độ Crom VI khác nhau.
- Các hình ảnh minh hoạ cần có thuyết minh giới thiệu trước khi chèn hình.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.

Công trình được công bố trên 2 tạp chí quốc tế uy tín là:

- Tạp chí quốc tế thuộc danh mục tạp chí SCI (Q2, IF = 3.1): Current Issues in Molecular Biology (ISSN: 1467-3037).
- Tạp chí quốc tế International Journal of Biosciences (ISSN: 2220-6655).

8. Kết luận chung:

- Luận án đáp ứng yêu cầu của 1 luận án tiến sĩ chuyên ngành Công nghệ Sinh học.
- Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án.
- Luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ.

Xác nhận của cơ quan công tác

Người nhận xét



Ngô Xuân Quảng

BẢN NHẬN XÉT/ PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Đề tài: *Đánh giá ảnh hưởng của Crom lên sự phát triển của cá ngựa vằn (Danio rerio)*

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9420201

Họ và tên nghiên cứu sinh: Đặng Đăng Khoa

Cán bộ hướng dẫn :

Cán bộ hướng dẫn 1: PGS. TS. Nguyễn Thị Phương Thảo

Cán bộ hướng dẫn 2: TS. Lê Thành Long

Người nhận xét/ Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Nga

Nơi công tác: Chuyên gia độc lập

Nội dung nhận xét:

- Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án:

Đã có nhiều nghiên cứu về độc tính của kim loại Crom được tiến hành bằng nhiều mô hình động vật khác nhau như chuột, thỏ và các động vật có vú khác. Tuy vậy, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào tiến hành một cách toàn diện chi tiết về sự ảnh hưởng của Crom (VI) với các nồng độ khác nhau; đặc biệt độc tính Crom (VI) ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các gen liên quan đến sự chết tự nhiên (apoptosis) và kháng oxy hóa trên mô hình cá ngựa vằn (đối tượng nghiên cứu được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu về y học, nhờ tính ưu việt thuận lợi của đối tượng nghiên cứu này). Điều này có thể gây nên sự thiếu hụt thông tin; thiếu cơ sở khoa học cho các nghiên cứu về độc tính của kim loại nặng nói chung và Crom (VI) nói riêng tác động đến sức khỏe con người. Do vậy, nghiên cứu "*Đánh giá ảnh hưởng của Crom lên sự phát triển của cá ngựa vằn (Danio rerio)*" ở các giai đoạn phôi, ấu trùng, giai đoạn trưởng thành, đặc biệt đánh giá sự thay đổi biểu hiện với các nồng độ khác nhau của

Crom (VI) lên hình thái, cấu trúc mô, tỷ lệ sống, nhịp tim, sự thay đổi biểu hiện của gen liên quan đến quá trình apoptosis và oxy hóa của cá ngừ vằn có ý nghĩa khoa học và thực tiễn lớn. Cách đặt vấn đề và giải quyết vấn đề hợp lý. Tuy vậy, cần phân tích cụ thể sâu hơn những kết quả đã nghiên cứu; ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận văn.

- Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành:

Tên đề tài phù hợp với nội dung nghiên cứu, phù hợp với chuyên ngành và mã số chuyên ngành 9420201 – Công nghệ sinh học.

- Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu:

Nghiên cứu sinh đã sử dụng các phương pháp nghiên cứu chuyên ngành, hiện đại để giải quyết các nội dung và mục tiêu của luận án, đặc biệt là mục 2.2 (trang 25-26) sơ đồ tóm tắt các nghiên cứu được thể hiện khoa học, hợp lý. Vì vậy, kết quả được trình bày trong luận án có độ tin cậy và thuyết phục cao. Tuy vậy, ở chương mục này cần cần bổ sung hoàn chỉnh, đầy đủ hơn về địa điểm, thời gian nghiên cứu, các phương pháp cần tóm tắt ngắn gọn hơn.

- Kết quả nghiên cứu mới của tác giả:

Luận án đã đạt được một số kết quả sau:

- Định danh cá ngừ vằn bằng phương pháp hình thái học và sinh học phân tử.
- Xác định được ảnh hưởng của Crom (VI) đến tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngừ vằn.
- Xác định được ảnh hưởng của Crom (VI) đến chiều dài cơ thể ấu.
- Xác định được ảnh hưởng của Crom (VI) đến nhịp tim ấu trùng cá ngừ vằn.
- Xác định được ảnh hưởng của Crom (VI) đến sự thay đổi biểu hiện các gen đáp ứng và các gen kiểm soát tổn thương lên sự phát triển của cá ngừ vằn.

- Xác định được sự tích tụ của Crom (VI) trong cơ thể cá ngựa vằn.
- Xác định được ảnh hưởng của Crom (VI) lên cấu trúc mô.

Những đóng góp mới của luận án:

- 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: giảm tỷ lệ sống, sự thay đổi trong chiều dài cơ thể, nhịp tim tăng và hình thái dị tật ở cá ngựa vằn.
- Crom (VI) cảm ứng sự sai hỏng trong cấu trúc một số nội quan quan trọng như ruột, gan và buồng trứng của cá ngựa vằn.
- Crom (VI) cảm ứng sự thay đổi biểu hiện của một số gen liên quan đến quá trình apoptosis.

Những đóng góp mới này của luận án đã góp phần bổ sung những thiếu hụt thông tin về Crom (VI) với các nồng độ khác nhau của mô hình nghiên cứu cá ngựa vằn. Từ đó, góp phần làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu về độc tính của kim loại nặng nói chung và Crom (VI) nói riêng tác động đến sức khỏe con người.

- Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án:

Kết luận của luận án tương đối phù hợp với cách đặt vấn đề, đáp ứng nội dung, mục tiêu của luận án. Tuy vậy, cần nêu bật những kết quả (số liệu cụ thể), những vấn đề đã đạt được theo 03 nội dung chính của luận án (trang 3). Ví dụ: Tỷ lệ sống? chiều dài cơ thể? nhịp tim tăng? khi tiếp xúc với Crom (VI) ở nồng độ khác nhau. Cần nói rõ nội dung nghiên cứu ở mục 4 trang 3 mô hình cá ngựa vằn được nghiên cứu ở giai đoạn cụ thể nào? Cần phân tích sâu hơn và so sánh kết quả của luận án với những kết quả nghiên cứu trước đây.

- **Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:**

Luận án không trùng lặp so với các đồ án, luận văn, luận án hay các công trình khoa học đã công bố trong và ngoài nước. Các tài liệu trích dẫn trung thực, rõ ràng, đầy đủ và trung thực.

- **Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố:**

Nghiên cứu sinh có 02 bài báo được đăng và đã chấp nhận đăng ở 02 tạp chí chuyên ngành sinh học phân tử quốc tế có uy tín và phù hợp với nội dung nghiên cứu của luận án.

- **Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không; luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ được hay không:**

Luận án đáp ứng yêu cầu về nội dung và hình thức đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành Công nghệ sinh học. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án. Luận án được đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ.

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

Người nhận xét



PGS.TS. Nguyễn Thị Nga

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên đề tài luận án: **“Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá Ngựa vằn (*Danio rerio*)”.**

Chuyên ngành đào tạo: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Họ và tên nghiên cứu sinh: Đặng Đăng Khoa

Cán bộ hướng dẫn :

Cán bộ hướng dẫn 1: PGS. TS. Nguyễn Thị Phương Thảo

Cán bộ hướng dẫn 2: TS. Lê Thành Long

Người nhận xét: TS. Huỳnh Duy Thảo

Cơ quan công tác: Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

Nội dung nhận xét:

- Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án.

Việc đánh giá sự tác động của các kim loại nặng trên các mô hình động vật để có các minh chứng khoa học, góp phần làm sáng tỏ các ảnh hưởng của các kim loại này trên cơ thể sinh vật là một nghiên cứu cần thiết, có tính thực tiễn và có giá trị để góp phần dự phòng và cải thiện môi trường sống cho các loài sinh vật và con người. Luận án này đã tiến hành đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá ngựa vằn và cho thấy rằng với nồng độ Crom (VI) cao $\geq 3,125 \mu\text{g/L}$ đã bắt đầu ảnh hưởng lên sự phát triển của phôi, tỷ lệ sống và các dị tật bất thường ở cá. Điều này, đã chứng minh rằng Crom (VI) đã có các tác động thật sự lên sự phát triển của cá từ giai đoạn phôi đến cơ thể trưởng thành bằng các phương pháp nghiên cứu từ quan sát hình thái cho đến khảo sát sự biểu hiện của các gene. Do đó, luận án có tính thực tiễn và có giá trị để khai thác thông tin để mở rộng ra mô hình đánh giá Crom trên các hệ sinh thái để góp phần giữ gìn và bảo vệ môi trường, nâng cao chất lượng môi trường sống và bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

- **Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.**

Luận án không trùng lặp với các công trình nghiên cứu khác trong và ngoài nước. Tài liệu tham khảo được trích dẫn đầy đủ và rõ thông tin.

- **Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.**

Tên đề tài phù hợp với nội dung và mục tiêu nghiên cứu, phù hợp với mã số và chuyên ngành học tập.

- **Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.**

Các phương pháp nghiên cứu sử dụng đa dạng, từ đơn giản đến hiện đại. Nghiên cứu sinh đã sử dụng các phương pháp quan sát hình thái, mô học đến các phương pháp hiện đại như khảo sát sự biểu hiện gene bằng RT-PCR cho đến giải trình tự gene. Các nghiệm thức có tính lặp lại và các bước được nêu rõ ràng cùng với các phương pháp đánh giá nên có độ tin cậy và hiện đại.

- **Kết quả nghiên cứu mới của tác giả.**

Kết quả nghiên cứu đã chứng minh được sự tác động của Crom (VI) làm ức chế sự phát triển và làm chậm quá trình thoát nang của phôi cá ngựa vằn, ảnh hưởng lên tỷ lệ sống của phôi, thay đổi hình thái, cơ quan và sự biểu hiện của các gene. Bằng các số liệu nghiên cứu và hình ảnh minh chứng cụ thể, nghiên cứu sinh đã chứng minh được tác động của Crom (VI) lên sự phát triển của cá ngựa vằn.

- **Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.**

Ưu điểm: luận án trình bày rõ ràng, đầy đủ các phần của một luận án tiến sĩ. Nội dung được thiết kế phù hợp để đạt được các mục tiêu nghiên cứu.

Nhược điểm:

- Còn nhiều lỗi chính tả cần khắc phục, thuật ngữ cần sử dụng thống nhất (như sulfua hay sunfua trang 4, gene hay gen trang 10, trang 19, cộng sự hay đồng nghiệp trang 15), hãng Merc của Đức (trang 36) => Merck. Trang 42, các công thức hoá học chưa viết chính xác như HNO₃, H₂O ...

- Một số thuật ngữ dùng chưa chính xác và khó hiểu như “bộ phận sinh học” trang 6, đoạn: “... các kênh clorua trong tế bào chất và màng bào quan => **các kênh clorua trên màng các bào quan trong tế bào chất**”, đoạn: “... niêm mạc mạch máu của các tuyến chất béo, trang 7. Cũng trong trang này NCS cho rằng tới thời điểm hiện tại chưa có nghiên cứu nào về Crom (VI) lên cá ngựa vằn... nhưng ở trang 16, NCS viết theo tác giả Chen và CS đã đánh giá sự tác động của Crom (VI) lên cá ngựa vằn ở giai đoạn phôi (2021), tài liệu tham khảo số 38. Trang 9, đoạn: “ ...càng nhiều trình tự của cá ngựa vằn được so sánh, % tương đồng với bộ gene người sẽ tăng lên và có thể đạt tới 100% trong tương lai?. Trang 15, cụm từ : “trong ngữ cảnh của bảo vệ môi trường” , trang 16: “sự suy thoái của mảng cơ dọc và xương sụn? Phần xương sụn này là gì? Sang trang 17 thì lại dùng là hệ cơ xương sụn? sau đó là cơ xương và xương sụn.
- Trong trang 17, đoạn nói về đạo đức nghiên cứu liên quan đến ấu trùng cá ngựa vằn chưa phải là động vật hoàn chỉnh nên không bị ràng buộc bởi các quy định nghiêm ngặt như các động vật khác => viết như thế này thì chưa ổn.
- Trang 20, NCS cho rằng là mô hình được nhiều nhà khoa học sử dụng và thử nghiệm thuốc trong y khoa nhưng không có dẫn chứng và tài liệu tham khảo. Và thật sự rất ít nghiên cứu ở VN sử dụng thuốc để đánh giá trên mô hình này.
- Trang 22, nhận định với tác động của Crom (VI) trên cá ngựa vằn từ đó rút ra ảnh hưởng của Crom (VI) lên cơ thể con người là thiếu minh chứng khoa học và không thể rút ra được?
- Trang 28, phần vật liệu thiếu thông tin về nguồn nước và thức ăn viên? Nước dùng là loại nước gì? Nguồn cung cấp như thế nào? Vì ảnh hưởng rất nhiều đến kết quả nuôi và nghiên cứu? tương tự là thức ăn của cá? Nguồn gốc, thành phần ...?
- Trang 29, mục 2.1.3, bảng 2.3 hoá chất sử dụng thì mục 3 và 4 trong bảng có phải là hoá chất không? CL-Xposure Film và màng PVDF? Cột thí ghi là thiết bị? hoá chất mới đúng.
- Trang 30, sơ đồ nghiên cứu: 2 đực và 1 cái? Nhưng trang 35 phần phối cá thì ngược lại là 1 đực và 2 cái??



- Trang 37, phần đếm nhịp tim nên mô tả cụ thể hơn phương pháp đếm như thế nào? Có dùng thiết bị hỗ trợ không?
- Trang 43 phần phương pháp mô tả quá dài, nên viết ngắn gọn và gạch đầu dòng.
- Trang 44, phần nhuộm H&E gần 2 trang, không cần thiết vì kỹ thuật này quá thường quy nên ghi ngắn gọn.
- Phần kết quả:
 - + Phần 3.1. Định danh cá thiếu các hình ảnh minh họa theo thời gian mô tả? từ sau 8 giờ thụ tinh cho đến 5 ngày, NCS mô tả rất nhiều nhưng không có hình ảnh minh chứng? nên bổ sung cho chính chu.
 - + Phần 3.2 ở trang 56, NCS nhận định: "...điều này chứng tỏ rằng trong điều kiện thí nghiệm hiện tại, phôi cá ngựa vẫn không bị ảnh hưởng xấu từ yếu tố môi trường đến sự phát triển của chúng và duy trì cấu trúc bình thường? chẳng lẽ mẫu đối chứng mà bị ảnh hưởng hoặc mình thiết kế thí nghiệm không đạt chuẩn?
 - + Trang 69, nhận định gene mt2 được kích hoạt để tham gia vào quá trình loại bỏ hoặc kiểm soát độc tính của Crom (VI) trong cơ thể cá ngựa vẫn => nhận định chú quan vì thiếu tài liệu tham khảo và minh chứng bằng dữ liệu.
 - + Trang 75, Crom (VI) đã gây tổn thương đối với các mô tế bào? mô là mô, tế bào là tế bào=> lên tế bào và mô của cá ngựa vẫn.
- Một số hình ảnh minh họa cho các bảng biểu chưa đạt nội dung truyền tải thông tin (như hình 3.10, 3.13, 3.14, 3.18, 3.19) vì hình ảnh nhỏ và màu sắc các biểu đồ không đủ độ tương phản để phân tích tốt
- Các hình ảnh mô học (như 3.21, 3.22, 3.23) ở các vật kính nhỏ (20X) không đủ tiêu chí để phân tích mô học cũng như các thuật ngữ mô học chưa mang tính thống nhất, các nhận định trên hình ảnh mô học không minh chứng đi kèm trên hình ảnh.
- + Ví dụ hình 3.21. Hình cắt lớp mô ruột? hình chụp tiêu bản mô ruột cắt ngang hay cắt dọc gì đó? Hình ảnh chụp không theo chiều của mô ví dụ toàn bộ là cắt ngang hoặc toàn bộ là cắt dọc. Hình A, D là cắt dọc nhưng hình B,C,E là cắt ngang và các hình có độ phóng đại không đồng đều trong khi đang so sánh giữa các ngày với nhau. Lông nhưng

(hay vi nhung mao?), các mô mỡ trong ruột giảm theo thời gian? Mô mỡ ở đâu? Hay NCS đang nói đến các tế bào đại thực bào của các nhung mao ruột?

+ Hình 3.22, các hạt lipid ở đâu ra? Vì nếu nhuộm H&E thì toàn bộ mô mỡ đã bị thoái biến, không còn thành phần lipid trong tiêu bản? phải nhuộm bằng kỹ thuật khác hoặc thuốc nhuộm đặc hiệu?

+ Hình 3.23, có sự xuất hiện ổ viêm? Không thể quan sát được? nếu có ổ viêm phải có sự hiện diện của các tế bào viêm cũng như các tế bào bạch cầu ..

- Trang 79, phù giữa niêm mạc và niêm mạc [101] là cái gì? Vì cấu trúc mô học của ruột chỉ có 1 niêm mạc và niêm mạc liên kết với thành cơ thì là sao?

- Tài liệu tham khảo nên chia ra thành tiếng việt và tiếng nước ngoài. Các tài liệu số 26,27,45,81 và 89 chưa đúng format và bị thiếu nội dung.

- Phần phụ lục có thể bổ sung thêm thông tin về sản phẩm là thức ăn cho cá, các hình thái phát triển của phôi theo thời gian, các hình ảnh mô học ở các độ phóng đại khác nhau cho từng loại mô quan sát.

- **Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỹ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.**

Nội dung nghiên cứu đã được công bố trên hai tạp chí "Current Issues in Molecular Biology" SCI, Q2 và tạp chí International Journal of Biosciences. Đây là các tạp chí uy tín.

- **Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành.**

- Bản tóm tắt luận án phản ánh đúng nội dung trong luận án.

Các nhận xét khác:

- Phần mục tiêu nghiên cứu (trang 2), nên viết lại cho phù hợp, nội dung bị ngược.

- Nội dung nghiên cứu (trang 4) thì đánh giá tác động của Crom (VI) lên giai đoạn phôi, ấu trùng mà không thấy trên cá thể trưởng thành (trong khi mục tiêu nghiên cứu có nội dung này).

Xác nhận của cơ quan công tác

Người nhận xét

A handwritten signature in blue ink, consisting of a series of fluid, connected strokes that form a cursive representation of the name 'Huỳnh Duy Thảo'. The signature is positioned above two horizontal blue lines that serve as a separator between the signature and the printed name below.

TS. Huỳnh Duy Thảo

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên nghiên cứu sinh: Đặng Đăng Khoa

Đề tài: “Đánh giá ảnh hưởng của Crom lên sự phát triển của cá ngựa vằn (*Danio rerio*)”

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Người nhận xét luận án: TS. Nguyễn Hoàng Dũng

Cơ quan công tác của người nhận xét: Viện Sinh học nhiệt đới

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án. Cách đặt vấn đề và giải quyết vấn đề đã hợp lý hay chưa.

Ý nghĩa khoa học: Ô nhiễm kim loại nặng là vấn đề luôn được quan tâm bởi ảnh hưởng tới môi trường cũng như rủi ro đối với sức khỏe của con người. Vì vậy, các nghiên cứu về đánh giá tác động của kim loại nặng trên động vật cần thiết được triển khai thực hiện. Trong nghiên cứu này, tác hại của Crom VI lên sự phát triển của cá ngựa vằn và các gene liên quan đến con đường apoptosis, kháng oxy hóa trên cá ngựa vằn khi tiếp xúc với Crom VI được thực hiện. Nghiên cứu là cơ sở giúp đánh giá nguy cơ tác hại của Crom đối với sức khỏe sinh vật thủy sinh, gây mất cân bằng sinh thái, ô nhiễm môi trường, từ đó có những biện pháp can thiệp cho việc giảm thải crom vào môi trường. Nghiên cứu có ý nghĩa khoa học cao.

Ý nghĩa thực tiễn: Nghiên cứu góp phần cung cấp thêm cơ sở khoa học về tác hại của Crom VI trên cá ngựa vằn để từ đó có cơ sở tiến hành đánh giá tác hại của Crom VI trên các mô hình động vật hữu nhũ khác, từ đó cho thấy nguy cơ tác hại của Crom VI đối với con người. Nghiên cứu cũng góp phần cung cấp thêm thông tin về tác hại của Crom VI đối với động vật thủy sinh để từ đó có cơ sở đánh giá, quản lý phù hợp. Nghiên cứu có ý nghĩa thực tiễn.

Cách đặt vấn đề và giải quyết vấn đề phù hợp.

2. Sự hợp lý và độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu

Các phương pháp sử dụng trong nghiên cứu phù hợp với mục tiêu và nội dung nghiên cứu. Các phương pháp sử dụng là các phương pháp hiện đại, có độ tin cậy cao.

3. Đánh giá các kết quả đạt được, nêu những đóng góp mới và giá trị của các đóng góp đó

Thông qua nghiên cứu, nghiên cứu sinh đã xác định ngưỡng nồng độ cao hơn 3,125 $\mu\text{g/L}$ có thể làm giảm tỷ lệ sống, kéo dài thời gian nở phôi, và giảm chiều dài của cá ngựa vằn, và làm tăng nhịp tim. Đối với ấu trùng và phôi, Crom VI làm thay đổi mức độ biểu hiện của một số gene liên quan đến quá trình apoptosis và các gene đáp ứng kháng oxy hóa. Crom VI làm giảm biểu hiện của gen sửa chữa tổn thương DNA là gadd45a, làm tăng mức độ biểu hiện của gen đáp ứng stress tổn thương trong tế bào là gadd45g, làm thay đổi mức độ biểu hiện của gen đáp ứng stress oxi hoá là SOD1,2, và làm tăng biểu hiện gen có chức năng đào thải kim loại nặng là mt2. Kết quả còn cho thấy crom VI có thể ức chế chu kỳ tế bào thông qua làm giảm mức độ biểu hiện của gen Cdk4,6 và làm tăng quá trình apoptosis thông qua làm tăng biểu hiện của gen caspase 3, Bax và giảm biểu hiện của gen Bcl2. Nghiên cứu cũng cho thấy khi tiếp xúc với Crom (VI), cá ngựa vằn 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. Nhìn chung, các kết quả đạt được phù hợp với luận án tiến sĩ.

Những đóng góp mới của luận án:

+ 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: giảm tỷ lệ sống, sự thay đổi trong chiều dài cơ thể ấu trùng cá ngựa vằn, nhịp tim tăng và các hình thái dị tật ở cá.

+ Xác định sự ảnh hưởng của Cr (VI) lên cá ngựa vằn trưởng thành thông qua sự tăng tích tụ Cr (VI) trong một số cơ quan nội tạng quan trọng như ruột, gan và buồng trứng.

+ Xác định được sự ảnh hưởng của Cr (VI) lên mức độ biểu hiện các gen liên quan đến đáp ứng kháng oxy hóa và quá trình apoptosis.

4. Các kết luận của luận án có phù hợp với cách đặt vấn đề ở đầu luận án và có đủ sức thuyết phục hay không? Những ưu điểm và thiếu sót, những điểm cần được bổ sung và sửa chữa?

Các kết luận của luận án có tính thuyết phục, phù hợp với vấn đề đặt ra và có đủ sức thuyết phục.

Ưu điểm và thiếu sót, những điểm cần được bổ sung và sửa chữa:

Ưu điểm: luận án được trình bày ngắn gọn, rõ ràng, hình ảnh minh phù hợp.

Những điểm cần được bổ sung và sửa chữa:

- Về hình thức: nghiên cứu còn mắc một số lỗi chính tả, lỗi viết tên loài, lỗi số thập phân, một số hình cần bổ sung chú thích.

- Về nội dung :

Phần tổng quan : nên bổ sung thêm tình hình nhiễm Crom ở Việt Nam và thế giới.

Phần phương pháp cần bổ sung trích dẫn đầy đủ. Bảng 2.6 nên gộp lại trong 2 trang.

Phần kết quả - thảo luận: nên có thêm thảo luận để làm rõ hơn tính mới của nghiên cứu.

Phần phụ lục cần bổ sung thêm xử lý số liệu, một số hình ảnh liên quan đến các thí nghiệm trên mô hình cá ngựa vằn.

5. Đánh giá về sự trùng lặp của luận án so với các đồ án, luận văn, luận án hay công trình khoa học đã công bố trong và ngoài nước ? Cần khẳng định luận án có trùng lặp hay không trùng lặp? Nếu trùng lặp, đề nghị ghi rõ tên, nhà xuất bản, năm xuất bản của tài liệu đã công bố.

Không có sự trùng lặp của nghiên cứu này so với các đồ án, luận văn, luận án hay công trình khoa học đã công bố trong và ngoài nước.

6. Nhận xét về chất lượng những bài báo khoa học đã được nghiên cứu sinh công bố, khẳng định sự phù hợp về nội dung của chúng với nội dung luận án. Nhận xét về vị thế khoa học của các diễn đàn, nơi các bài báo được công bố có đáp ứng yêu cầu đối với luận án tiến sĩ?

Kết quả nghiên cứu của Luận án đã được công bố trên 01 tạp chí uy tín quốc tế ISI, Q2 (Curr Issues in molecular biology) và 01 tạp chí quốc tế có ISSN(Int J BioSciences).

Các kết quả trong bài báo đều phản ánh đúng với kết quả của luận án.

7. Tính trung thực trong việc trích dẫn các công trình đã được nghiên cứu sinh công bố trong và ngoài nước, tài liệu tham khảo.

NCS đã tham khảo 101 tài liệu trong và ngoài nước. Các TLTK được trích dẫn trung thực, rõ ràng.

8. Kết luận:

Luận án hoàn toàn đáp ứng đầy đủ yêu cầu về nội dung và hình thức đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành công nghệ sinh học.

Nghiên cứu sinh cần điều chỉnh theo góp ý của Hội đồng để luận án hoàn thiện hơn.

Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án.

Luận án đủ điều kiện bảo vệ cấp Học viện để nghiên cứu sinh nhận bằng tiến sĩ.

TP Hồ Chí Minh, ngày 15 tháng 04 năm 2024

Người nhận xét



Nguyễn Hoàng Dũng

Hà Nội, ngày 09 tháng 05 năm 2024

**QUYẾT NGHỊ CỦA
HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN**

Họ và tên NCS: **Đặng Đăng Khoa**

Tên đề tài luận án: **“Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá Ngựa vằn (*Danio rerio*)”**

Chuyên ngành: **Công nghệ sinh học**

Mã số: **9 42 02 01**

Người hướng dẫn: **PGS.TS. Nguyễn Thị Phương Thảo
TS. Lê Thành Long**

1. Hội đồng đã tiến hành bỏ phiếu và kết quả kiểm phiếu như sau

Tổng số phiếu phát ra:	7
Tổng số phiếu thu vào:	7
Số phiếu hợp lệ:	7
Số phiếu không hợp lệ:	0
Số phiếu tán thành:	7
Số phiếu không tán thành:	0
Trong đó số phiếu xếp loại xuất sắc là:	0

(Kết quả bỏ phiếu có biên bản riêng và được công bố tại Hội đồng)

2. Những kết luận khoa học cơ bản, những điểm mới, đóng góp mới của luận án

Những kết luận khoa học cơ bản của luận án gồm:

+ Đã xác định ngưỡng nồng độ từ 3,125 $\mu\text{g/L}$ có thể làm giảm tỷ lệ sống, kéo dài thời gian nở phôi, giảm chiều dài và làm tăng nhịp tim của ấu trùng cá ngựa vằn.

+ Đối với ấu trùng và phôi, Crom (VI) làm thay đổi mức độ biểu hiện của một số gene liên quan đến quá trình apoptosis theo hướng làm tăng biểu hiện gene caspase 3, bax và giảm bcl2 và các gene đáp ứng kháng oxy hóa sod1, sod2 theo hướng giảm.



+ Nghiên cứu cho thấy khi tiếp xúc với Crom (VI), cá ngựa vằn có khả năng tích tụ Crom (VI) trong cơ thể và tăng theo thời gian 30 ngày. Sự tích tụ này gây tổn thương đến cấu trúc gan, mô buồng trứng và thay đổi cấu trúc vi nhung mao trong ruột.

Luận án đạt được một số kết quả mới như sau:

+ Crom (VI) gây ức chế sự phát triển và làm chậm quá trình nở (thoát màng) của phôi cá ngựa vằn ở giai đoạn sớm: tỉ lệ sống của phôi, ấu trùng và chiều dài ấu trùng giảm dần theo sự tăng dần nồng độ khảo sát; nhịp tim tăng theo độ tăng của nồng độ khảo sát; xuất hiện các dị tật ở ấu trùng.

+ Crom (VI) cảm ứng sự thay đổi biểu hiện một số gene liên quan đến quá trình apoptosis (caspase 3, bax, bcl2) và kháng oxy hóa sod1, sod2.

+ Nghiên cứu cho thấy khi tiếp xúc với Crom (VI), cá ngựa vằn có khả năng tích tụ Crom (VI) trong cơ thể và tăng theo thời gian 30 ngày. Sự tích tụ này gây tổn thương đến cấu trúc gan, mô buồng trứng và thay đổi cấu trúc vi nhung mao trong ruột.

3. Cơ sở khoa học, độ tin cậy của những luận điểm và những kết luận nêu trong luận án

Luận án sử dụng các phương pháp nghiên cứu hiện đại kết hợp phương pháp thường quy phù hợp với mục tiêu và nội dung nghiên cứu.

4. Ý nghĩa về lý luận, thực tiễn và những đề nghị sử dụng các kết quả nghiên cứu của luận án

Ý nghĩa lý luận: đã cung cấp dữ liệu khoa học về ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển và giải thích cơ chế tác động thông qua sự biểu hiện gene và tích tụ của Crom (VI) trong các cơ quan nội tạng của cá ngựa vằn.

Ý nghĩa thực tiễn: nghiên cứu góp phần xây dựng mô hình thử nghiệm có hiệu quả, từ đó làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về ảnh hưởng của Crom (VI) lên động vật khác và con người. Kết quả đề tài là tiền đề cho các nghiên cứu sử dụng cá ngựa vằn làm mô hình chỉ thị các yếu tố gây ô nhiễm môi trường, đặc biệt là mô hình cá nhạy cảm đối với các thay đổi kim loại nặng trong môi trường nước.

5. Những thiếu sót về nội dung và hình thức của luận án

Chỉnh sửa theo các góp ý của các thành viên hội đồng theo biên bản họp hội đồng.

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

6. Mức độ đáp ứng các yêu cầu của luận án

Luận án đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của một luận án tiến sĩ nêu ở Quy chế đào tạo Sau đại học. Luận án cần chỉnh sửa để hoàn chỉnh theo kết luận của hội đồng.

7. Những điểm cần bổ sung, sửa chữa (nếu có) trước khi nộp luận án cho Thư viện Quốc gia Việt Nam

Đề nghị nghiên cứu sinh nghiêm túc chỉnh sửa, bổ sung và hoàn chỉnh theo các góp ý của hội đồng và gửi lại cho các thành viên phản biện xác nhận.

8. Kiến nghị của Hội đồng về việc công nhận trình độ và cấp bằng tiến sĩ cho nghiên cứu sinh

Đề nghị Học viện cấp bằng Tiến sĩ ngành Công nghệ sinh học cho NCS. Đặng Đăng Khoa.

9. Nghị quyết được 7/7 thành viên Hội đồng nhất trí thông qua bằng biểu quyết công khai

Chủ tịch hội đồng tuyên bố kết thúc buổi chấm luận án tiến sĩ lúc 12 giờ 05 phút cùng ngày.

THƯ KÝ

TS. Nguyễn Hoàng Dũng

CHỦ TỊCH

PGS.TS. Trần Lê Bảo Hà



XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung

(Mẫu 20-HV-BB của HĐ cấp Học viện)

VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 09 tháng 05 năm 2024

**BIÊN BẢN CỦA
HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN**

Họ và tên NCS: **Đặng Đăng Khoa**

Tên đề tài luận án: “Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá Ngựa vằn (*Danio rerio*)”

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Người hướng dẫn: **PGS.TS. Nguyễn Thị Phương Thảo
TS. Lê Thành Long**

Phần I:

- Đại diện cơ sở đào tạo tuyên bố lý do, đọc quyết định 198/QĐ-HVKHCN ngày 27/03/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện và đề nghị Chủ tịch Hội đồng PGS.TS. Trần Lê Bảo Hà điều khiển phiên họp.
- Chủ tịch Hội đồng công bố danh sách thành viên có mặt thông qua chương trình buổi bảo vệ, đề nghị Thư ký thông báo các điều kiện chuẩn bị cho buổi bảo vệ và đọc lý lịch khoa học của nghiên cứu sinh.

Danh sách hội đồng gồm 7 thành viên

TT	Họ và tên	Chức danh trong hội đồng
1	PGS.TS. Trần Lê Bảo Hà	Chủ tịch
2	PGS.TS. Nguyễn Thị Thương Huyền	Phản biện 1
3	PGS.TS. Nguyễn Thanh Bình	Phản biện 2
4	PGS.TS. Ngô Xuân Quảng	Phản biện 3
5	TS. Nguyễn Hoàng Dũng	Ủy viên – Thư ký
6	PGS.TS. Nguyễn Thị Nga	Ủy viên
7	TS. Huỳnh Duy Thảo	Ủy viên



Số thành viên có mặt: 7 thành viên. Vắng: 0

3. Thư ký thông báo các điều kiện cho buổi bảo vệ luận án.
Thư ký đọc lý lịch khoa học, bảng điểm của nghiên cứu sinh và các điều kiện cần thiết để nghiên cứu sinh bảo vệ luận án.
4. Các thành viên hội đồng và những người tham dự nêu câu hỏi hoặc ý kiến thắc mắc về lý lịch khoa học và quá trình đào tạo của nghiên cứu sinh:
Không có
5. Nghiên cứu sinh Đặng Đăng Khoa trình bày nội dung luận án trong thời gian 30 phút.
6. Các phản biện đọc nhận xét (biên bản kèm theo) và đặt câu hỏi
 - Dùng pipet hút phôi có ảnh hưởng tới tỷ lệ sống hay không?
 - Cách xác định LD50 trang 57, 58 (Hình 3.10)?
 - Trình bày chi tiết hơn cách xác định nhịp tim trong nghiên cứu?
 - Cơ sở khoa học nào để thay đổi nồng độ Crom (VI) lên sinh lý và bệnh lý của cá ngựa vằn.
7. Tác giả luận án trả lời các câu hỏi của phản biện
 - Trong nghiên cứu này, pipet pasteur với đường kính trong 2 mm được sử dụng để hút phôi, đường kính phôi cá ngựa vằn dao động từ 500 – 700 μm do đó quá trình hút không ảnh hưởng đến cấu trúc phôi và sức sống phôi.
 - Đánh giá LD₅₀ bằng chương trình Quest Graph™ Calculator của AAT Bioquest.
 - Nhịp tim của ấu trùng cá được ghi nhận bằng video. Quá trình xác định được thực hiện cho từng cá thể, chỉ tiêu này được đánh giá bằng số nhịp tim trong một phút.
 - Dựa trên nghiên cứu của Moura và cộng sự vào năm 2019, tôi tiến hành nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên một số đặc điểm sinh lý của cá ngựa vằn
8. Các thành viên khác trong Hội đồng đưa ra ý kiến nhận xét (đính kèm biên bản) và đặt câu hỏi
 - Ý nghĩa của sự giống nhau 70% bộ nhiễm sắc thể giữa cá ngựa vằn và người?

- Có cách xác định nồng độ Crom VI trên mô.

9. Tác giả luận án trả lời các câu hỏi nêu ra

- Câu này được chỉnh sửa lại như sau: “Các nhà nghiên cứu đã chứng minh rằng 70% gen mã hóa protein ở con người có liên quan đến các gen được tìm thấy ở cá ngựa vằn, trong số đó 84% gen liên quan đến bệnh tật ở người có bản sao của cá ngựa vằn. Điều này cho thấy tầm quan trọng của cá ngựa vằn như một mô hình cho nghiên cứu bệnh tật ở người.”
- Trong nghiên cứu này, tác giả đã phân tích tồn dư kim loại Crom trong toàn bộ cơ thể cá, việc phân tích kim loại Crom VI trong mẫu mô cần một số lượng mẫu lớn, do đó nghiên cứu sắp tới tác giả sẽ đánh giá thêm các chỉ tiêu này.

10. Đại diện tập thể hướng dẫn TS. Lê Thành Long phát biểu ý kiến (Đính kèm bản nhận xét)

Phần II: Hội đồng họp riêng để bầu ban kiểm phiếu, bỏ phiếu kín và thảo luận thông qua quyết nghị của Hội đồng.

1. Đề nghị thành lập ban kiểm phiếu gồm:

- PGS.TS. Nguyễn Thị Thương Huyền – Trưởng ban
- PGS.TS. Nguyễn Thanh Bình - Ủy viên
- TS. Nguyễn Hoàng Dũng - Ủy viên

Hội đồng nhất trí với danh sách Ban kiểm phiếu và tiến hành bỏ phiếu.

Kết quả bỏ phiếu như sau:


Tổng số phiếu phát ra:	7
Tổng số phiếu thu vào:	7
Số phiếu hợp lệ:	7
Số phiếu không hợp lệ:	0
Số phiếu tán thành:	7
Số phiếu không tán thành:	0
Trong đó số phiếu xếp loại xuất sắc là:	0

Sau khi thảo luận, Hội đồng thống nhất ra nghị quyết (kèm theo văn bản).

Phần III:

1. Trưởng ban kiểm phiếu PGS.TS. Nguyễn Thị Thương Huyền công bố kết quả đánh giá luận án.
2. Chủ tịch Hội đồng PGS.TS. Trần Lê Bảo Hà đọc quyết nghị của Hội đồng.
3. Chủ tịch Hội đồng PGS.TS. Trần Lê Bảo Hà tuyên bố Hội đồng đã hoàn thành nhiệm vụ và trao lại quyền điều khiển cho Cơ sở đào tạo.

THƯ KÝ


Nguyễn Hoàng Dũng

CHỦ TỊCH


Trần Lê Bảo Hà

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**




Nguyễn Thị Trung



Ý KIẾN CỦA CÁC THÀNH VIÊN HỘI ĐỒNG

PGS.TS. Nguyễn Thị Thương Huyền

Đề tài có tính cần thiết, thời sự, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao. Kết quả nghiên cứu này có thể góp phần giải quyết các vấn đề về ô nhiễm môi trường và bảo vệ môi trường.

Tính cần thiết: Crom (VI) là một kim loại nặng phổ biến trong môi trường do các hoạt động công nghiệp và nông nghiệp. Nó có độc tính cao đối với nhiều sinh vật, bao gồm cả cá. Cá Ngựa vằn (*Danio rerio*) là một mô hình sinh học phổ biến được sử dụng trong nghiên cứu khoa học. Chúng có kích thước nhỏ, dễ nuôi dưỡng và sinh sản, có bộ gene đã được giải mã. Nghiên cứu ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá Ngựa vằn sẽ giúp chúng ta hiểu rõ hơn về độc tính của kim loại này và ảnh hưởng của nó đến môi trường.

Tính thời sự: ô nhiễm môi trường do kim loại nặng là một vấn đề ngày càng gia tăng trên toàn thế giới. Hiểu rõ hơn về độc tính của kim loại nặng đối với sinh vật là cần thiết để phát triển các biện pháp phòng ngừa và kiểm soát hiệu quả

Ý nghĩa khoa học: nghiên cứu này sẽ cung cấp thông tin mới về cơ chế độc hại của Crom (VI) đối với cá ngựa vằn nói riêng và các động vật thủy sinh nói chung. Nó sẽ giúp chúng ta hiểu rõ hơn về vai trò của các yếu tố môi trường trong sự phát triển của cá. Kết quả nghiên cứu này có thể được sử dụng để phát triển các phương pháp đánh giá rủi ro môi trường và các biện pháp bảo vệ môi trường. –

Ý nghĩa thực tiễn: nghiên cứu này có thể giúp cải thiện chất lượng nước và bảo vệ môi trường; có thể giúp phát triển các biện pháp kiểm soát ô nhiễm kim loại nặng hiệu quả hơn.

Nghiên cứu chưa tìm thấy sự trùng lặp.

Phương pháp nghiên cứu sử dụng trong đề tài hợp lí với nội dung nghiên cứu: phương pháp phối cá, thu phối, phương pháp đánh giá nhịp tim, chiều dài, phương pháp định danh cá ngựa vằn,... Các số liệu của luận án đã được xử lí thống kê thông bằng phần mềm Sigma Plot, với mức độ tin cậy là 90%, nên đảm bảo độ chính xác của các kết quả và có độ tin cậy cao

Nghiên cứu đạt được một số tính mới như trình bày trong luận án.

Luận án đáp ứng yêu cầu của luận án tiến sĩ

Một số góp ý:

Luận án còn một số lỗi chính tả và lỗi trình bày.

Phần tóm tắt cần trình bày rõ ràng hơn.

Phần mở đầu cần biên tập, tránh trùng lặp so với tổng quan.

Tổng quan (24 trang) hơi ngắn, cần bổ sung cơ chế gây độc của Crom VI, các phương pháp định danh cá ngựa vằn, các thông tin về gen liên quan đến apoptosis chưa sâu, LD₅₀. Sau tổng quan nên có nhận định về các vấn đề chưa giải quyết để làm rõ hơn tính cấp thiết của nghiên cứu

Tác giả cần trình bày phương pháp một cách rõ ràng và khoa học hơn; cần bổ sung thông tin về nguồn gốc cá ngựa vằn sử dụng, kích thước bể nuôi cá.

Trang 35 cần trình bày chi tiết thông tin về thời gian phôi cá và thu phôi.

Trang 36, dùng pipet hút phôi có ảnh hưởng tới tỷ lệ sống hay không?

Bổ sung phương pháp đếm nhịp tim,

Bổ sung kết quả phân tích Crom ở phụ lục.

Trang 44, bổ sung chi tiết phương pháp thu mẫu, nhuộm HE

Cách xác định LD₅₀ trang 57, 58 (Hình 3.10)?

Trang 56 nên có hình dạng bất thường của phôi cá ngựa vằn

Cách vẽ đồ thị cần chú thích để dễ phân biệt.

Trang 74, bổ sung đơn vị, nên sử dụng biểu đồ cột.

Trang 77, cấu trúc mô gan chụp ở X10 chưa rõ, các mũi tên chưa phù hợp.

Nên có thêm bàn luận.

Phần kết luận cần trình bày ngắn gọn, bám theo nội dung luận án

Bổ sung phụ lục chi tiết hơn.

Luận án đáp ứng yêu cầu của luận án tiến sĩ.

PGS.TS. Nguyễn Thanh Bình

Đồng ý với các nhận xét của cô phản biện. Một số góp ý thêm

Tóm tắt luận án: cần viết lại theo chuẩn quy định

Tính cấp thiết của đề tài cần bổ sung cơ sở khoa học tác giả chọn đối tượng nghiên cứu là cá ngựa vằn trên cơ sở có những nghiên cứu trước đây. Cần làm rõ tính mới trong nghiên cứu của mình.

Trình bày chi tiết hơn cách xác định nhịp tim trong nghiên cứu;

Cơ sở khoa học nào để thay đổi nồng độ Crom (VI) lên sinh lý và bệnh lý của cá ngựa vằn.

Hình trích dẫn cần điều chỉnh cùng kích thước.

PGS.TS Ngô Xuân Quảng

Đồng ý với các nhận xét của các thầy cô phản biện. Một số góp ý thêm

Phần tổng quan nên tìm hiểu thêm các nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam về ảnh hưởng của Crom VI lên các loài cá hay loài thủy sinh vật khác. Các nghiên cứu này đã phát hiện những gì, nghiên cứu tới đâu?

Bảng 2.6, tên các loài cá trên ngân hàng GenBank nên được in nghiêng.

Phương pháp phân tích số liệu còn sơ sài, cần chi tiết hơn. Cần ghi rõ phương pháp kiểm tra điều kiện đáp ứng phân tích ANOVA hay không? Bao nhiêu yếu tố? phương pháp gì được dùng khi kiểm định ANOVA không thoả mãn?

Các nghiên cứu ảnh hưởng của Crom (VI) lên phát triển của cá ngựa vẫn còn ở mức định tính mô tả, nên tìm hiểu sâu hơn về định lượng ở các nồng độ Crom VI khác nhau.

Các hình ảnh minh họa cần có thuyết minh giới thiệu trước khi chèn hình.

PGS.TS. Nguyễn Thị Nga

Đồng ý với các nhận xét của các thầy cô phản biện.

Các thuật ngữ trong luận án cần sử dụng thống nhất

Một số hình ảnh, bảng biểu, biểu đồ cần rõ, đẹp, khoa học hơn

Mục kết luận và kiến nghị: cần bổ sung đầy đủ hơn những kết quả đạt được, rút ngắn gọn hơn và cần số liệu cụ thể

Mục đóng góp mới cần nêu cụ thể số liệu.

TS. Huỳnh Duy Thảo

Cần thống nhất sử dụng một số thuật ngữ

Xem lại thông tin trang 17, 20

Chỉnh chu lại thông tin nguồn nước, thức ăn viên

Trang 29, bảng hóa chất mục 3,4 chưa phù hợp.

Một số nhận định mang tính chủ quan không có hình ảnh và dữ liệu minh chứng

Một số đoạn văn trình bày còn khó hiểu, hình ảnh minh họa cho các bảng biểu chưa đạt nội dung truyền tải thông tin (Hình 3.10, 3.13, 3.14, 3.18, 3.19) vì hình ảnh nhỏ, chưa đủ độ tương phản.

Tài liệu tham khảo cần trích dẫn theo quy định

Một số thuật ngữ mô học chưa mang tính thống nhất.

TS. Nguyễn Hoàng Dũng

Đồng ý với các nhận xét của các thầy cô nhận xét.

Phản tổng quan: nên bổ sung thêm tình hình nhiễm Crom ở Việt Nam và thế giới, làm nổi bật hơn tính mới của nghiên cứu.

Phản phương pháp cần bổ sung trích dẫn đầy đủ. Bảng 2.6 nên gộp lại trong 2 trang.

Phản kết quả - thảo luận : nên có thêm thảo luận để làm rõ hơn tính mới của nghiên cứu.

Phản phụ lục cần bổ sung thêm xử lý số liệu, một số hình ảnh liên quan đến các thí nghiệm trên mô hình cá ngựa vằn.

PGS.TS Trần Lê Bảo Hà

Viết lại phần mở đầu, phần kết luận rõ ràng hơn.

Đồng ý với các nhận xét của các thầy cô. Một số góp ý, làm rõ thêm

Nguồn nước, thức ăn cho cá ngựa vằn có chuẩn không? Có kiểm tra kim loại nặng?

Có sử dụng công thức tính cỡ mẫu cho các nghiệm thức không?

Có tuân theo đạo đức trong nghiên cứu không?

Có rất nhiều lỗi chính tả, lỗi đánh máy.

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA, BỔ SUNG LUẬN ÁN TIẾN SĨ
CẤP HỌC VIỆN**

Ngày 09 tháng 5 năm 2024, Học viện Khoa học và Công nghệ đã tổ chức đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Đặng Đăng Khoa theo Quyết định số 198/QĐ-HVKHCN ngày 27 tháng 3 năm 2024 của Giám đốc Học viện.

Đề tài: Đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sự phát triển của cá Ngựa vằn (*Danio rerio*)

Ngành: Công nghệ sinh học,

Mã số: 9 42 02 01

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. Nguyễn Thị Phương Thảo - Viện Sinh học Nhiệt đới,
Viện Hàn lâm KHCNVN

2. TS. Lê Thành Long - Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm
KHCNVN

Theo Biên bản của Hội đồng, NCS phải bổ sung và chỉnh sửa luận án các điểm sau đây:

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, bổ sung	Nội dung đã được chỉnh sửa, bổ sung (Ghi rõ số trang/chương/mục... đã được chỉnh sửa)
	PGS.TS. Trần Lê Bảo Hà	NCS. Đặng Đăng Khoa
1	Viết lại phần mở đầu, phần kết luận rõ ràng hơn.	Đã chỉnh sửa theo góp ý của Hội đồng. Trang 1/ Mở đầu/ 1. Tính cấp thiết đề tài; Trang 2, 3/ Mở đầu/ 2. Mục tiêu nghiên cứu đã bổ sung thêm mục 2.1. Mục tiêu tổng quát và 2.2. Mục tiêu cụ thể. Trang 3, 4/ Mở đầu/ 5. Ý nghĩa của đề tài đã bổ sung thêm mục 5.1. Ý nghĩa khoa học và 5.2. Ý nghĩa thực tiễn. Trang 84/ Kết luận và kiến nghị/ Kết luận đã viết lại theo góp ý của hội đồng.
2	Nguồn nước, thức ăn cho cá ngựa vằn có chuẩn không? Có kiểm tra kim loại	Tất cả các nguyên liệu đầu vào được cung cấp bởi Viện Sinh học Nhiệt đới,

Lưu ý: Các chữ ký xác nhận cần gắn với nội dung trên cùng một trang giấy. Học viện sẽ không xác nhận nếu phần chữ ký tách rời với nội dung



	nặng?	đáp ứng các tiêu chuẩn của Bộ Y tế QCVN01: 2009/BYT. Do đó nguồn nước này thích hợp để thí nghiệm tác động của Crom VI lên cá ngừ vằn.
3	Có sử dụng công thức tính cỡ mẫu cho các nghiệm thức không?	Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được lặp lại ít nhất ba lần theo các nghiệm thức trước đây trên mô hình cá ngừ vằn.
4	Có rất nhiều lỗi chính tả, lỗi đánh máy	Đã rà soát toàn luận án và chỉnh sửa các lỗi theo góp ý của Hội đồng.
	PGS.TS. Nguyễn Thị Thương Huyền	NCS. Đặng Đăng Khoa
5	Phần tóm tắt cần trình bày rõ ràng hơn	Đã chỉnh sửa theo góp ý của Hội đồng Trang xi, xii/ Tóm tắt tiếng việt và tiếng anh đã viết lại cách thiết kế thí nghiệm, phương pháp, kết quả và kết luận.
6	Phần mở đầu cần biên tập, tránh trùng lặp so với tổng quan	Đã chỉnh sửa theo góp ý của Hội đồng. Trang 7, 8/ Chương 1/ Mục 1.1.2 đã viết lại các nội dung bị trùng lặp với phần tổng quan.
7	Tác giả cần trình bày phương pháp một cách rõ ràng và khoa học hơn; cần bổ sung thông tin về nguồn gốc cá ngừ vằn sử dụng, kích thước bể nuôi cá.	Đã chỉnh sửa theo góp ý của Hội đồng Trang 30/ Chương 2/ Mục 2.1.1 đã bổ sung nguồn gốc cá ngừ vằn được sử dụng trong nghiên cứu, kích thước bể nuôi cá. Trang 33,34/ Chương 2/ Mục 2.2 đã điều chỉnh sơ đồ tóm tắt các nội dung nghiên cứu theo góp ý của phản biện. Trang 38, 39/ Chương 2/ Mục 2.2.2.2 đã trình bày lại phương pháp phối cá. Trang 40/ Chương 2/ Mục 2.2.3 đã bổ sung phần thiết kế thí nghiệm độc tính. Trang 41/ Chương 2/ Mục 2.2.4/ Mục 2.2.4.1 đã viết lại rõ ràng chi tiêu đánh giá. Trang 41/ Chương 2/ Mục 2.2.4/ Mục 2.2.4.2. đã bổ sung phương pháp xác định nhịp tim. Trang 49/ Chương 2/ Mục 2.2.7 đã bổ sung phương pháp thu mẫu và số mẫu dùng cho nhuộm H&E.
8	Trang 35 cần trình bày chi tiết thông tin về thời gian phối cá và thu phối.	Trang 37/ Chương 2/ Mục 2.2.2.2 đã bổ sung thông tin về thời gian phối cá và thu phối cụ thể là tháo vách ngăn lúc 7 giờ

		sáng và sau 5 đến 10 phút tiến hành thu phôi.
9	Dùng pipet hút phôi có ảnh hưởng tới tỷ lệ sống hay không?	Trong nghiên cứu này, pipet pasteur với đường kính 2mm được sử dụng để hút phôi, đường kính phôi cá ngựa vẫn dao động từ 500 – 700 μ m do đó quá trình hút không ảnh hưởng đến phôi và sức sống phôi.
10	Bổ sung phương pháp đếm nhịp tim	Nhịp tim của ấu trùng cá được ghi nhận bằng video. Quá trình xác định được thực hiện cho từng cá thể, chỉ tiêu này được đánh giá bằng số nhịp tim trong một phút. Trang 41/ Chương 2/ Mục 2.2.4/ Mục 2.2.4.2. đã bổ sung phương pháp xác định nhịp tim
11	Cách xác định LD ₅₀ trang 57, 58 (Hình 3.10)?	Đánh giá LD ₅₀ bằng chương trình Quest Graph™ Calculator của AAT Bioquest.
12	Bổ sung kết quả phân tích Crom ở phụ lục.	Đã bổ sung phần số liệu thô của kết quả phân tích Crom (VI) ở phần phụ lục theo góp ý của phản biện. Trang PL-11/ Phụ lục/ Mục 4 đã bổ sung số liệu thô của kết quả phân tích Crom tại công ty TNHH phân tích kiểm nghiệm Việt Tin.
13	Trang 44, bổ sung chi tiết phương pháp thu mẫu, nhuộm HE	Đã bổ sung theo góp ý của Hội đồng. Trang 49/ Chương 2/ Mục 2.2.7 đã bổ sung phương pháp thu mẫu và số mẫu dùng cho nhuộm H&E. Phương pháp thu mẫu được thu nhận bằng cách gây tê cá bằng Licocain 2%, mổ cá để lấy các mẫu ruột, mẫu gan và mẫu buồng trứng sau đó cố định trong paraformaldehyde để bảo quản mẫu.
	PGS.TS. Nguyễn Thanh Bình	NCS. Đặng Đăng Khoa
14	Tóm tắt luận án: cần viết lại theo chuẩn quy định	Đã chỉnh sửa theo góp ý của Hội đồng. Toàn bộ tóm tắt Tiếng Việt và Tiếng Anh Đã trình bày lại theo quy định của Học viện KHCN.
15	Tính cấp thiết của đề tài cần bổ sung cơ sở khoa học tác giả chọn đối tượng	Đã bổ sung tính cấp thiết của đề tài và cơ sở khoa học cho việc tác giả chọn đối

	<p>ngiên cứu là cá ngựa vằn trên cơ sở có những nghiên cứu trước đây. Cần làm rõ tính mới trong nghiên cứu của mình.</p>	<p>tượng nghiên cứu là cá ngựa vằn. Tác giả dựa trên nghiên cứu của Moura và cộng sự vào năm 2019, để đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sinh lý và ảnh hưởng bệnh lý của cá ngựa vằn.</p> <p>Trang 3, 4/ Mở đầu/ Mục 5. Ý nghĩa của đề tài đã bổ sung thêm mục 5.1. Ý nghĩa khoa học và 5.2. Ý nghĩa thực tiễn. Trang 4/ Mở đầu/ Mục 6 tác giả đã bổ sung nội dung để làm nổi bật tính mới trong luận án.</p>
16	<p>Trình bày chi tiết hơn cách xác định nhịp tim trong nghiên cứu.</p>	<p>Nhịp tim của ấu trùng cá được ghi nhận bằng video. Quá trình xác định được thực hiện cho từng cá thể, chỉ tiêu này được đánh giá bằng số nhịp tim trong một phút. Trang 41/ Chương 2/ Mục 2.2.4/ Mục 2.2.4.2. đã bổ sung phương pháp xác định nhịp tim</p>
17	<p>Cơ sở khoa học nào để thay đổi nồng độ Crom (VI) lên sinh lý và bệnh lý của cá ngựa vằn.</p>	<p>Dựa trên nghiên cứu của Moura và cộng sự vào năm 2019, tác giả tiến hành nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của Crom (VI) lên sinh lý và ảnh hưởng bệnh lý của cá ngựa vằn.</p>
	<p>PGS.TS. Ngô Xuân Quảng</p>	<p>NCS. Đặng Đăng Khoa</p>
18	<p>Phần tổng quan nên tìm hiểu thêm các nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam về ảnh hưởng của Crom VI lên các loài cá hay loài thủy sinh vật khác. Các nghiên cứu này đã phát hiện những gì, nghiên cứu tới đâu?</p>	<p>Đã bổ sung thêm phần tổng quan về tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước theo góp ý của Hội đồng.</p>
19	<p>Phương pháp phân tích số liệu còn sơ sài, cần chi tiết hơn. Cần ghi rõ phương pháp kiểm tra điều kiện đáp ứng phân tích ANOVA hay không? Bao nhiêu yếu tố? phương pháp gì được dùng khi kiểm định ANOVA không thoả mãn?</p>	<p>Đã bổ sung theo góp ý của Hội đồng Trang 51/ Chương 2/ Mục 2.2.8 đã bổ sung phương pháp phân tích số liệu, các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần (n=3) 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 $p < 0,05$.</p>

20	Các nghiên cứu ảnh hưởng của Crom (VI) lên phát triển của cá ngựa vẫn còn ở mức định tính mô tả, nên tìm hiểu sâu hơn về định lượng ở các nồng độ Crom VI khác nhau.	Trong nghiên cứu này các chỉ tiêu được dùng để đánh giá tác động của Crom (VI) lên sự phát triển của cá ngựa vẫn, ngoài những xác định thay đổi về mặt hình thái: tỷ lệ sống, nhịp tim, kích thước tác giả còn đánh giá những thay đổi sự biểu hiện của các gene liên quan đến chu kỳ tế bào, quá trình kháng oxy hóa và sự chết theo chương trình cả mức phiên mã và dịch mã.
	PGS.TS. Nguyễn Thị Nga	NCS. Đặng Đăng Khoa
21	Các thuật ngữ trong luận án cần sử dụng thống nhất	Đã rà soát và thống nhất các thuật ngữ được sử dụng trong luận án.
22	Một số hình ảnh, bảng biểu, biểu đồ cần rõ, đẹp, khoa học hơn	Đã rà soát và chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng.
23	Mục kết luận và kiến nghị: cần bổ sung đầy đủ hơn những kết quả đạt được, rút ngắn gọn hơn và cần số liệu cụ thể	Đã chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng.
	TS. Huỳnh Duy Thảo	NCS. Đặng Đăng Khoa
24	Cần thống nhất sử dụng một số thuật ngữ	Đã rà soát và thống nhất các thuật ngữ được sử dụng trong luận án
25	Chỉnh chu lại thông tin nguồn nước, thức ăn viên	Tất cả các nguyên liệu đầu vào được cung cấp bởi Viện Sinh học Nhiệt đới, đáp ứng các tiêu chuẩn của Bộ Y tế QCVN01: 2009/BYT. Do đó nguồn nước này thích hợp để thí nghiệm tác động của Crom VI lên cá ngựa vằn.
26	Trang 29, bảng hóa chất mục 3,4 chưa phù hợp.	Đã chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng
27	Một số đoạn văn trình bày còn khó hiểu, hình ảnh minh họa cho các bảng biểu chưa đạt nội dung truyền tải thông tin (Hình 3.10, 3.13, 3.14, 3.18, 3.19) vì hình ảnh nhỏ, chưa đủ độ tương phản.	Đã chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng
	TS. Nguyễn Hoàng Dũng	NCS. Đặng Đăng Khoa
28	Phần tổng quan: nên bổ sung thêm tình hình nhiễm Crom ở Việt Nam và thế giới, làm nổi bật hơn tính mới của nghiên cứu.	Đã bổ sung thêm phần tổng quan về tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước theo góp ý của hội đồng.

29	Phần phương pháp cần bổ sung trích dẫn đầy đủ. Bảng 2.6 nên gộp lại trong 2 trang.	Đã chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng.
30	Phần kết quả - thảo luận : nên có thêm thảo luận để làm rõ hơn tính mới của nghiên cứu.	Đã chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng
31	Phần phụ lục cần bổ sung thêm xử lý số liệu, một số hình ảnh liên quan đến các thí nghiệm trên mô hình cá ngựa vằn.	Đã chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng

Nghiên cứu sinh chân thành cảm ơn Quý thầy, cô trong Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện đã góp ý và tạo cơ hội cho NCS hoàn thiện luận án của mình.

Xin trân trọng cảm ơn./.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 24 tháng 6 năm 2024

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

NGHIÊN CỨU SINH

(Trường hợp có 02 người hướng dẫn xin chữ ký cả 02 người, ký và ghi rõ họ tên)



PGS.TS. Nguyễn Thị Phương Thảo



TS. Lê Thành Long



Đặng Đăng Khoa

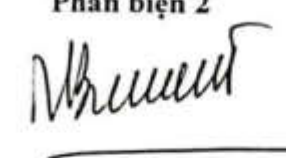


Phản biện 1

Phản biện 2



PGS.TS. Nguyễn Thị Thương Huyền



PGS.TS. Nguyễn Thanh Bình

Phản biện 3



PGS.TS. Ngô Xuân Quảng

**XÁC NHẬN CỦA HỌC VIỆN
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**



Nguyễn Thị Trung

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



PGS.TS. Trần Lê Bảo Hà