

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

NGÔ KIẾN ĐỨC

**ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CỦA 3-
MONOCLOROPROPAN-1,2-DIOL (3-MCPD)
TRÊN GAN, MÁU VÀ THẦN KINH
CỦA CHUỘT NHẮT**

CHUYÊN NGÀNH: KIỂM NGHIỆM THUỐC VÀ ĐỘC CHẤT

MÃ SỐ: 62720410

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. Hồ Chí Minh, Năm 2016

Công trình được hoàn thành tại:

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Trần Mạnh Hùng

GS.TS. Nguyễn Văn Thanh

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Trường tại Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

Vào hồi:giờ.....ngày.....tháng.....năm.....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp TP.Hồ Chí Minh
- Thư viện Đại học Y Dược TP.Hồ Chí Minh

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Thực phẩm luôn là một phần thiết yếu của cuộc sống. Các chất lạ hiện diện trong thực phẩm luôn là mối quan tâm của người tiêu dùng. Các chất lạ có thể là các chất có khả năng gây độc cho cơ thể được cho vào thực phẩm nhằm mục đích bảo quản, tạo màu mùi thu hút; cũng có thể là những chất được sinh ra ngay trong quá trình sản xuất. Việc đánh giá, làm rõ mức độ gây độc của những chất này là cần thiết và luôn mang tính thời sự. 3-monocloropropan-1,2-diol (3-MCPD) là một hóa chất thuộc nhóm cloropropanol. Trong quá trình chế biến nhiều loại thực phẩm (như nước tương, dầu hào, các sản phẩm quay rán, nướng, bánh mì,...) luôn luôn tồn tại một dư lượng 3-MCPD trong sản phẩm cuối cùng. Để đánh giá toàn diện hơn về độc tính của chất này, ngoài độc tính đã biết của 3-MCPD trên thận và cơ quan sinh dục với nhiều bằng chứng thuyết phục, chúng tôi đặt trọng tâm nghiên cứu đánh giá độc tính của 3-MCPD trên những cơ quan khác như máu, gan, não nhằm cung cấp thêm các dữ liệu khoa học có ý nghĩa cho lĩnh vực an toàn thực phẩm. Mục tiêu của chúng tôi như sau:

1. Đánh giá độc tính của 3-MCPD trên huyết học sau khi gây phơi nhiễm mạn tính trong 6 tháng và 12 tháng.
2. Đánh giá độc tính của 3-MCPD trên nhiễm sắc thể ở các pha cấp tính, bán cấp tính và mạn tính bằng phương pháp vi nhân trên hồng cầu.
3. Đánh giá độc tính mạn tính của 3-MCPD trên gan thông qua các enzym chức năng gan và khảo sát mô học tế bào gan.
4. Đánh giá độc tính của 3-MCPD trên não chuột nhắt qua sự biểu hiện c-fos và sự thoái hóa tế bào thần kinh.

2. Tính cấp thiết của đề tài

Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu độc tính của 3-MCPD trên thận và cơ quan sinh sản. Những vấn đề được quan tâm còn lại khi đề cập đến độc tính của 3-MCPD là các tác động của 3-

MCPD trên huyết học, gan hay cơ quan thần kinh. Đồng thời, tác động của 3-MCPD trên nhiễm sắc thể trong các nghiên cứu đã công bố cũng chưa rõ ràng. Ngoài ra, cho đến nay chưa có công trình nào nghiên cứu đánh giá độc tính của 3-MCPD trên cơ thể người và động vật được thực hiện ở nước ta, do đó đề tài nghiên cứu độc tính của 3-MCPD trên chuột nhắt trên các cơ quan mục tiêu gan, máu và thần kinh là cần thiết, rất có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

3. Những đóng góp mới của luận án

Kết quả của luận án đã đóng góp mới thêm một số tác động của 3-MCPD như: 3-MCPD làm thay đổi số lượng và biến đổi hình thái bạch cầu lympho khi phơi nhiễm mạn tính; gây biến đổi hình thái tế bào hồng cầu; gây sự hình thành vi nhân ở tế bào hồng cầu máu ngoại vi ở liều cao trong giai đoạn cấp tính và liều thấp trong giai đoạn mạn tính; có tác động gây khuynh hướng tăng nghịch sản tế bào gan khi phơi nhiễm mạn tính; gây biểu hiện c-fos ở liều cao.

4. Bộ cục luận án

Luận án gồm 125 trang: đặt vấn đề 3 trang, tổng quan tài liệu 34 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 16 trang, kết quả nghiên cứu 52 trang, bàn luận 17 trang; kết luận và kiến nghị 3 trang. Luận án có 32 bảng, 13 biểu đồ, 6 sơ đồ, 40 hình, 110 tài liệu tham khảo.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. ĐẠI CƯƠNG VỀ 3-MONOCOLOROPROPAN-1,2-DIOL (3-MCPD)

3-MCPD, tên gọi khác là alpha-monoclorohydrin, thuộc nhóm hóa chất gây độc có tên gọi chung là cloropropanol, công thức phân tử là $C_3H_7ClO_2$. 3-MCPD được hình thành do kết quả của quá trình phản ứng giữa chất béo (triglycerid) với một nguồn có chứa Cl⁻ trong thực phẩm (ví dụ: muối ăn, hay acid hydrocloric) hoặc phản ứng với một thành phần nào đó trong thực phẩm dưới sự xúc tác của nhiệt độ

(chiên, nướng...). Tùy loại thực phẩm cũng như thời gian, nhiệt độ chế biến mà lượng 3-MCPD được tạo ra là nhiều hay ít.

1.2. CÁC NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CỦA 3-MCPD

1.2.1. Nghiên cứu độc tính cấp

Nghiên cứu xác định liều gây chết của 3-MCPD được thực hiện trên chuột nhắt ICR với LD₅₀ là 190 mg/kg.

1.2.2. Độc tính trên thần kinh trung ương

3-MCPD gây nhiều tổn thương trên chất xám, trải dài từ vỏ não cho đến tủy sống, làm tăng thể tích nước trong bào tương, gây phù các tế bào hình sao. Ở liều cao (250-1000 mg/kg), 3-MCPD gây chết động vật thí nghiệm trong vòng 24 giờ do gây tổn thương nghiêm trọng thần kinh trung ương. Chuột nhận ba liều 3-MCPD 100 mg/kg hàng ngày đã chết và có tổn thương lan rộng riêng biệt ở vùng chất xám, từ vỏ não đến tủy sống. Ở nhóm dùng liều 50 mg/kg/ngày trong 5 ngày cho thấy có các tổn thương nhỏ ở vùng trung tâm thân não.

1.2.3. Độc tính trên gan và huyết học

Ở liều 75 mg/kg, 3-MCPD gây tăng nhẹ trọng lượng gan, và sưng tế bào gan ở mức độ nhẹ đến trung bình. Trên chuột nhắt, 3-MCPD làm tăng nhẹ chỉ số thể tích trung bình của hồng cầu (MCV) ở chuột đực (liều 400 ppm) và chuột cái (liều 100 và 200 ppm) nhưng không làm thay đổi số lượng hồng cầu. 3-MCPD liều 30 mg/kg trong 6 tuần trên khỉ gây thiếu máu, giảm bạch cầu, giảm tiểu cầu và suy tủy xương.

1.2.4. Độc tính trên thận

3-MCPD gây tích tụ acid oxalic (hình thành từ sự chuyển hóa 3-MCPD) và gây ra sự tạo sỏi calci oxalat, gây hiện tượng viêm cầu thận cấp, vô niệu và có thể gây tử vong ở liều cao (≥ 100 mg/kg). 3-MCPD liều 100 mg/kg gây hiện tượng protein niệu và glucose niệu trầm trọng. Sự thay đổi hình thái thận được ghi nhận sau 1 ngày dùng liều 75 mg/kg 3-MCPD, quan sát thêm sau 75 ngày còn thấy sự hoại tử, tái tạo và phình to ống thận.

1.2.5. Độc tính trên cơ quan sinh sản

3-MCPD có ảnh hưởng đến nhiều enzym của các tế bào biểu mô tinh hoàn, dẫn đến kết quả là giảm ly giải glucose. 3-MCPD làm giảm sự sản sinh progesteron ở tế bào leydig của chuột cống, gây ra sự biến đổi hình thái và phá hủy DNA ở tế bào leydig gây chết tế bào. 3-MCPD gây ra sự thay đổi cấu trúc chức năng protein ở tế bào tinh hoàn chuột cống ở giai đoạn sớm của sự suy giảm chức năng cơ quan sinh sản. 3-MCPD liều 75 mg/kg tiêm phúc mạc gây tắc nghẽn túi tinh hoặc gây tắc nghẽn ống dẫn tinh sau 5-7 ngày. Chuột cống đực vô sinh sau 3-6 ngày khi được tiêm 3-MCPD liều 15-40 mg/kg/ngày.

1.2.6. Độc tính dài hạn của 3-MCPD

Chuột cống Fischer 344 được cho uống 3-MCPD liều từ 1,1 đến 35 mg/kg/ngày trong 104 tuần. Bệnh thận mạn tính được ghi nhận ở tất cả các lô, tỉ lệ gia tăng theo liều, có ý nghĩa thống kê ở 2 lô sử dụng liều cao. Bệnh thận là nguyên nhân gây tăng tỉ lệ chết non và có sự khác biệt giữa chuột đực và chuột cái. Các biểu hiện bệnh thận ở các lô được ghi nhận khác biệt có ý nghĩa, thể hiện độc tính phụ thuộc liều trên các chỉ tiêu trọng lượng thận, nồng độ creatinin huyết thanh, và BUN. Tăng sản tế bào biểu mô ống thận được ghi nhận ở hai lô dùng liều cao. Tỉ lệ tăng sản và xuất hiện các khối u liên quan đến liều được ghi nhận ở tất cả các lô, ở thận: tăng sản ống thận và các u tuyến, tinh hoàn: tăng sản tế bào Leydig, u tuyến hay ung thư, tuyến vú và tuyến bao quy đầu chuột đực: u tuyến, và ung thư.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Hóa chất 3-MCPD (98% tinh khiết) của hãng Sigma. Chuột nhắt trắng, giống đực, chủng *Swiss albino*, 6-8 tuần tuổi, khỏe mạnh, không dị tật, do Viện Vaccin và Sinh phẩm y tế Nha Trang cung cấp. Trọng lượng khi bắt đầu thí nghiệm là 22 ± 2 gam.

2.2. THUỐC THỬ - TRANG THIẾT BỊ – NƠI THỰC HIỆN

2.2.1. Thuốc thử: Kháng thể sơ cấp đa dòng kháng c-fos ly trích từ thỏ (Sigma). Kháng thể thứ cấp liên kết với Extravidin-peroxidase (Sigma). Bộ kit phát hiện màu AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazole, Sigma). Các thuốc thử, hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phòng thí nghiệm.

2.2.2. Nơi thực hiện và trang thiết bị sử dụng trong các thử nghiệm

Nơi thực hiện: Bộ môn Dược lý, Bộ môn Hóa sinh - Khoa Dược, Bộ môn Giải phẫu bệnh – Khoa Y (Đại học Y Dược TPHCM), Bệnh viện Chợ Rẫy.

Trang thiết bị: máy sinh hóa TECNO 168, Ý; máy huyết học EXCELL 2280, Mỹ; máy huyết học ADVIA 2120i, Mỹ.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp nghiên cứu độc tính của 3-MCPD trên chuột nhắt được thực hiện theo các nguyên tắc sau:

a) Chọn chuột thử nghiệm đạt yêu cầu nghiên cứu.

- Cho chuột phơi nhiễm 3-MCPD: khảo sát lượng nước uống trung bình hàng ngày của chuột thử nghiệm, chất 3-MCPD (98% tinh khiết) được tính toán và pha với liều thích hợp vào nước uống hàng ngày của các lô thử nghiệm.

- Các lô thử nghiệm bao gồm lô chứng (chỉ uống nước) và các lô cho uống 3-MCPD hàng ngày với liều khác nhau. Số lượng chuột cho từng lô được tính toán đáp ứng được yêu cầu nghiên cứu và thống kê theo công thức: $E = \text{tổng số lượng chuột trong các lô} - \text{tổng số lô}$, điều kiện chấp nhận: $10 < E < 20$.

- Liều 3-MCPD cho chuột phơi nhiễm được chọn dựa trên cơ sở tham khảo liều gây độc thấp nhất của 3-MCPD (1,1 mg/kg), tăng dần 10 lần, 20 lần, 40 lần, 100 lần từ liều thấp nhất để có thể đánh giá được tác động có thể có của 3-MCPD và tác động (nếu có) có đáp ứng theo liều hay không.

b) Sau khi đạt thời gian phơi nhiễm mong muốn, chuột thử nghiệm

được lấy máu để đánh giá độc tính của 3-MCPD trên huyết học (công thức máu, hình thái tế bào, thời gian đông cầm máu), và trên nhiễm sắc thể (thử nghiệm vi nhân) hoặc lấy cơ quan (gan, não) để đánh giá độc tính của 3-MCPD trên gan và thần kinh.

c) Tiêu chí loại bỏ chuột: chuột trong hoặc sau thời gian phơi nhiễm sẽ không được chọn lấy mẫu nếu chết hay xuất hiện ghẻ lở, hoặc bị tiêu chảy... ảnh hưởng đến sức khỏe. Các mẫu lấy từ chuột không đạt yêu cầu như: mẫu máu đông, hay mẫu mô không cho hình ảnh rõ cũng không được đưa vào kết quả nghiên cứu.

2.3.1. Đánh giá độc tính của 3-MCPD trên huyết học

➤ **Trên công thức máu:** chuột được lấy máu toàn phần để đánh giá độc tính mạn tính của 3-MCPD (6 tháng, 12 tháng) trên công thức máu bao gồm: hồng cầu, hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), thể tích trung bình hồng cầu (MCV), lượng huyết sắc tố trung bình trong hồng cầu (MCH) và nồng độ huyết sắc tố trung bình trong hồng cầu; tổng lượng bạch cầu, bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu lympho; tiểu cầu và thể tích trung bình tiểu cầu.

➤ **Trên hình thái hồng cầu, bạch cầu:** sau thời gian phơi nhiễm (cấp tính, bán cấp tính và mạn tính), hình thái hồng cầu được quan sát trên kính hiển vi bằng kỹ thuật phết máu ngoại vi. Ở pha mạn tính 12 tháng, hình thái hồng cầu và bạch cầu được khảo sát trên máy huyết học ADVIA 2120i tại bệnh viện Chợ Rẫy.

➤ **Trên quá trình đông máu - cầm máu:** đánh giá độc tính của 3-MCPD ở giai đoạn cầm máu ban đầu thông qua khảo sát thời gian chảy máu và thời gian đông máu được tiến hành trong thời gian 3 tháng, 6 tháng và 12 tháng.

2.3.2. Đánh giá độc tính của 3-MCPD trên nhiễm sắc thể

Cho chuột thử nghiệm uống 3-MCPD hàng ngày với liều từ 1 mg/kg đến 100 mg/kg trong thời gian tương ứng với các pha cấp tính (24, 48, 72 giờ và 2 tuần), bán cấp tính (3 tháng) và mạn tính (6 tháng,

12 tháng). Đánh giá độc tính của 3-MCPD thông qua sự thành lập vi nhân trong hồng cầu bằng phương pháp phết máu ngoại vi.

2.3.3. Đánh giá độc tính mạn của 3-MCPD trên gan

Cho chuột thử nghiệm uống 3-MCPD hàng ngày với liều từ 1 mg/kg đến 40 mg/kg trong thời gian 6 tháng và 12 tháng. Đánh giá độc tính của 3-MCPD qua thông số các enzym gan (AST, ALT) và giải phẫu mô học gan. Quan sát đại thể gan so sánh màu sắc, hình dạng của gan giữa các lô uống 3-MCPD với lô chứng. Quan sát vi thể gan: cấu trúc, hình thái tế bào gan trong các tiểu thùy gan được xem xét để tìm ra những cấu trúc và hình thái bất thường.

2.3.4. Đánh giá độc tính của 3-MCPD trên thần kinh

Cho chuột thử nghiệm uống 3-MCPD với liều 10, 50 và 100 mg/kg trong thời gian 24, 48, 72 giờ và 2 tuần. Đánh giá độc tính của 3-MCPD trên não chuột dựa trên phương pháp hóa mô miễn dịch của sự biểu hiện c-fos và phương pháp nhuộm cresyl violet để phát hiện sự thoái hóa tế bào thần kinh.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đánh giá độc tính của 3-MCPD trên huyết học

3.1.1. Độc tính của 3-MCPD trên công thức máu

3.1.1.1. Tác động của 3-MCPD sau 6 tháng phơi nhiễm

➤ Tác động trên tổng lượng bạch cầu và các loại bạch cầu

Không có sự khác biệt về tổng lượng bạch cầu giữa lô chứng so với các lô có sử dụng 3-MCPD. Trên bạch cầu trung tính: các lô 3-MCPD 10 mg/kg và 20 mg/kg giảm khoảng 50%, có ý nghĩa thống kê. Số lượng bạch cầu đơn nhân ở các lô 3-MCPD có khuynh hướng giảm ($p = 0,07$). 3-MCPD làm tăng số lượng bạch cầu lympho. Như vậy, phơi nhiễm 3-MCPD trong 6 tháng ở liều 10 và 20 mg/kg gây giảm số lượng bạch cầu trung tính, có khuynh hướng gây giảm bạch cầu đơn nhân và gây tăng bạch cầu lympho.

➤ **Tác động của 3-MCPD sau 6 tháng phơi nhiễm trên hồng cầu**

3-MCPD gây tăng nồng độ huyết sắc tố trong hồng cầu (MCHC). Lô 3-MCPD liều 1 mg/kg làm giảm có ý nghĩa hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu. Như vậy 3-MCPD với liều 1 mg/kg/ngày - 20 mg/kg/ngày sử dụng liên tục trong 6 tháng có khuynh hướng gây giảm thể tích trung bình hồng cầu và làm tăng nồng độ huyết sắc tố trung bình trong hồng cầu.

➤ **Tác động của 3-MCPD sau 6 tháng phơi nhiễm trên tiểu cầu**

Số lượng tiểu cầu ở các lô uống 3-MCPD đều tăng lên, trong đó lô 3-MCPD liều 10 mg/kg và 20 mg/kg gây tăng có ý nghĩa thống kê. Thể tích trung bình của tiểu cầu giảm ở các lô sử dụng 3-MCPD.

3.1.1.2. Tác động của 3-MCPD sau 12 tháng phơi nhiễm

➤ **Tác động trên tổng lượng bạch cầu và các loại bạch cầu**

Sau 12 tháng, toàn bộ chuột trong lô liều 3-MCPD liều 40 mg/kg bị tử vong. 3-MCPD làm giảm tổng lượng bạch cầu, bạch cầu trung tính, bạch cầu lympho và gây tăng bạch cầu đơn nhân.

➤ **Tác động của 3-MCPD trên hồng cầu**

3-MCPD liều 1 và 10 mg/kg gây giảm số lượng hồng cầu, hematocrit và hemoglobin. Trên các thông số MCH, MCHC và MCV, tất cả đều không cho thấy có sự thay đổi rõ rệt. Như vậy, sau 12 tháng phơi nhiễm, 3-MCPD có tác động làm giảm số lượng hồng cầu, hemoglobin và hematocrit.

➤ **Tác động của 3-MCPD sau 12 tháng phơi nhiễm trên tiểu cầu**

Số lượng tiểu cầu ở các lô phơi nhiễm 3-MCPD 1 mg/kg, 10 mg/kg đều tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng, đã củng cố cho kết quả thu được sau 6 tháng.

Sau 6 tháng và 12 tháng thử nghiệm, có thể thấy rằng: phơi nhiễm mạn tính 3-MCPD với liều từ 1-20 mg/kg gây độc tính trên hệ tạo máu. Độc tính này thể hiện khác nhau trên từng dòng tế bào máu. Rối loạn sản xuất bạch cầu lympho và gia tăng số lượng tiểu cầu có

thể là dấu hiệu của nguy cơ gây ung thư máu của 3-MCPD.

3.1.2. Độc tính của 3-MCPD trên hình thái hồng cầu và bạch cầu

3.1.2.1. Trên hình thái hồng cầu

a. Tác động của 3-MCPD trên hình thái hồng cầu ở pha cấp tính

Sau 2 tuần, không quan sát thấy có biểu hiện bất thường về hình thái hồng cầu ở hai lô 1 mg/kg và lô 10 mg/kg. Sau 48 giờ và 72 giờ, hồng cầu ở lô 100 mg/kg có màng tế bào không còn tròn đều, xuất hiện những chỗ lõm và một số tế bào hồng cầu có gai nhọn. Như vậy, 3-MCPD ở liều 100 mg/kg trong thời gian ngắn có thể đã tác động đến màng tế bào hồng cầu dẫn đến thay đổi đến cấu trúc màng tế bào.

b. Tác động của 3-MCPD trên hình thái hồng cầu ở pha bán cấp tính

Sau 3 tháng, ở lô 3-MCPD liều 1 mg/kg vẫn không có sự thay đổi so với lô chứng. Ở lô 10 mg/kg, màng hồng cầu đã bắt đầu thay đổi, những chỗ lõm trên màng hồng cầu rõ hơn, hình thành những gai nhọn hay tròn. Tế bào hồng cầu có hình dạng như thế này được gọi là hồng cầu hình gai (echinocytes hay crenated/ burr cells), có hình dạng với nhiều thể hình kim đồng nhất đâm xuyên ra ngoài màng tế bào.

c. Tác động của 3-MCPD trên hình thái hồng cầu ở pha mạn tính

Sau 6 tháng và 12 tháng, 3-MCPD liều 1 mg/kg vẫn chưa gây những thay đổi về hình thái hồng cầu so với lô chứng. Ở lô 10 mg/kg, sau 6 tháng và 12 tháng, và ở lô 40 mg/kg, sau 6 tháng, kết quả cho thấy số lượng hồng cầu gai nhọn xuất hiện nhiều hơn. Như vậy, sau 12 tháng sử dụng liên tục, 3-MCPD ở 2 liều 10 mg/kg và 40 mg/kg gây biến đổi hình thái hồng cầu rõ rệt. Kích thước hồng cầu nhỏ lại, sắc tố gia tăng và hồng cầu có dạng gai.

➤ Khảo sát các chỉ số bất thường của hồng cầu trên xét nghiệm huyết học ADVIA 2120i sau khi phơi nhiễm 3-MCPD 12 tháng

Có 5/9 mẫu 3-MCPD 10 mg/kg có biến đổi về hình thái hồng cầu. Ngoài tác dụng gây biến đổi hình thái hồng cầu, kết quả xét nghiệm còn cho thấy 3-MCPD gây hiện tượng hồng cầu có vi nhân

(NucRBC), hồng cầu có nhân kết đặc (NRBC), đặc biệt là gây phân mảnh hồng cầu, và tình trạng hồng cầu có kích thước thu nhỏ.

3.1.2.2. Đánh giá tác động của 3-MCPD trên hình thái bạch cầu

Tần số xuất hiện các lympho đa hình (variant lympho) ở lô 3-MCPD 10 mg/kg là 44,44%. Ở cả 2 lô phơi nhiễm 3-MCPD đều có lympho bất thường. Các khác biệt đều có ý nghĩa thống kê so với lô chứng.

3.1.3. Độc tính của 3-MCPD trên thời gian đông máu - chảy máu

➤ Tác động của 3-MCPD lên thời gian chảy máu

Sau 3 tháng, thời gian chảy máu ở lô 10 mg/kg và lô 40 mg/kg giảm rõ rệt, đều có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và kết quả cũng lặp lại sau 6 tháng và 12 tháng. Như vậy 3-MCPD đã tác động đến quá trình cầm máu sơ khởi sau 3 tháng ở liều 10 mg/kg và 40 mg/kg.

➤ Tác động 3-MCPD lên thời gian đông máu

Cả ba liều 3-MCPD 1, 10 và 40 mg/kg làm giảm thời gian đông máu có ý nghĩa thống kê sau 3 tháng và 6 tháng. Sau 12 tháng, kết quả lặp lại với sự giảm thời gian đông máu ở lô 1 mg/kg và 10 mg/kg.

3.2. Đánh giá độc tính của 3-MCPD trên nhiễm sắc thể

3.2.1. Tác động gây sự hình thành vi nhân của 3-MCPD ở pha cấp tính

Ở lô 3-MCPD 100 mg/kg, chuột bắt đầu chết vào ngày thứ ba và sau 5 ngày thì không còn chuột nào sống sót. Sau 2 tuần, không có sự hình thành vi nhân ở lô 1 mg/kg và lô 10 mg/kg. Tuy nhiên ở lô 100 mg/kg đã có sự hình thành vi nhân sau 24 giờ, có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,01$). Như vậy với liều cao của 3-MCPD (100 mg/kg) đã gây ra sự hình thành vi nhân chỉ trong thời gian ngắn.

3.2.2. Tác động gây sự hình thành vi nhân của 3-MCPD ở pha bán cấp tính (3 tháng) và mạn tính (6 tháng)

Chúng tôi thử nghiệm thêm 1 lô uống 3-MCPD liều 40 mg/kg trong 6 tháng để đánh giá mức độ gây độc mạn tính theo liều của 3-MCPD. Sau 3 tháng, cả hai lô 1 và 10 mg/kg đều có sự hình thành vi nhân có ý nghĩa thống kê so với lô chứng. Sau 6 tháng, sự hình thành

vi nhân càng thể hiện rõ hơn với tỷ lệ hồng cầu có vi nhân xuất hiện càng nhiều và mức độ xuất hiện vi nhân tăng theo liều lượng. Đặc biệt ở hai lô 10 mg/kg và 40 mg/kg, số lượng tế bào có vi nhân xuất hiện rất nhiều trên thị trường và rất dễ dàng quan sát thấy.

Như vậy, 3-MCPD gây xuất hiện vi nhân ở tế bào hồng cầu, một biểu hiện của tổn thương nhiễm sắc thể, lệ thuộc vào liều lượng và thời gian phơi nhiễm. Ở liều cao (100 mg/kg), 3-MCPD có thể gây tổn thương nhiễm sắc thể trong vòng 24 giờ. Ở liều thấp 1 mg/kg, tác động gây tổn thương nhiễm sắc thể của 3-MCPD thể hiện sau 3 tháng phơi nhiễm.

➤ **3.2.3. Tác động gây sự hình thành vi nhân của 3-MCPD sau 12 tháng phơi nhiễm**

Sau 12 tháng phơi nhiễm, sự hình thành vi nhân trong hồng cầu thể hiện khá rõ, với tỉ lệ hồng cầu có vi nhân xuất hiện cao hơn nhiều so với pha 6 tháng và mức độ xuất hiện tăng theo liều lượng phơi nhiễm. Kết quả này củng cố lại những kết quả bất thường thu được sau khi nghiên cứu ở các pha cấp tính, bán cấp tính và mạn tính (3, 6 tháng). Vì thế có thể kết luận 3-MCPD gây tổn thương trên nhiễm sắc thể lệ thuộc vào thời gian phơi nhiễm và liều lượng sử dụng.

3.3. Đánh giá độc tính mạn tính của 3-MCPD trên gan

3.3.1. Độc tính của 3-MCPD trên gan trong 6 tháng

➤ **Tác động của 3-MCPD lên hoạt tính các enzym AST và ALT**

3-MCPD ở các liều 1, 10 và 20 mg/kg thể trọng không làm thay đổi hoạt tính AST và ALT có ý nghĩa về mặt bệnh lý so với lô chứng.

➤ **Tác động của 3-MCPD trên mô học gan**

a. Tác động của 3-MCPD lên tỷ số khối lượng gan / thể trọng chuột

Có sự thay đổi nhỏ về tỷ số khối lượng gan và thể trọng giữa lô chứng và các lô 3-MCPD. Trọng lượng thực của gan ở các lô có sử dụng 3-MCPD cũng giảm nhẹ so với lô chứng, như vậy 3-MCPD sử dụng ở liều cao nhất là 20 mg/kg trong 6 tháng không làm to gan hay

teo gan nhưng có khuynh hướng làm giảm trọng lượng gan.

b. Quan sát đại thể gan

Gan chuột ở lô chứng và các lô uống 3-MCPD có bề mặt nhẵn bóng, màu nâu đỏ đồng nhất, không xuất hiện những nốt trắng hay nốt tằng sần bất thường trên gan.

c. Quan sát vi thể gan

Kết quả sinh thiết gan ở lô chứng và các lô uống 3-MCPD cho thấy tế bào gan có cấu trúc bình thường, không có thâm nhập tế bào viêm quanh khoảng cửa. Tất cả các mẫu sinh thiết không có hình ảnh xơ gan.

Như vậy, qua xét nghiệm sinh hóa các enzym ở gan (AST, ALT) và phân tích mô học, kết quả cho thấy 3-MCPD ở 3 liều lượng 1 mg/kg, 10 mg/kg và 20 mg/kg sử dụng liên tục trong 6 tháng không gây xuất hiện những bất thường trên cấu trúc và chức năng gan.

3.3.2. Đánh giá độc tính mạn tính của 3-MCPD trên gan sau 12 tháng phơi nhiễm

Sau 12 tháng thử nghiệm, kết quả về mặt đại thể gan tương tự như kết quả thu được trong 6 tháng, tuy nhiên kết quả vi phẫu gan thu được những kết quả rất khác biệt. Trên nghịch sản tế bào gan: lô 3-MCPD 10 mg/kg có tỉ lệ nghịch sản tế bào gan là 45,45 %, cao hơn 4 lần so với lô chứng, tuy khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê nhưng nó cũng cho thấy, việc sử dụng 3-MCPD ở liều 10 mg/kg có khuynh hướng làm tăng tỉ lệ nghịch sản tế bào gan ($p = 0,07$).

Các tổn thương hoại tử đốm, hoại tử quanh tĩnh mạch trung tâm, hoại tử theo chu trình apoptosis đều xảy ra ở tất cả các lô thí nghiệm với các tỉ lệ khác nhau. Với bản chất chung là hoại tử theo chu trình, có thể các tổn thương này không liên quan đến việc sử dụng 3-MCPD mà là quá trình tự phát khi chuột lão hóa.

3.4. Đánh giá độc tính của 3-MCPD trên não chuột nhắt

3.4.1. Khảo sát sự biểu hiện c-fos trên não chuột

➤ **Khảo sát sự biểu hiện c-fos sau khi gây phơi nhiễm 3-MCPD liều 10, 50 mg/kg trong 24-48-72 giờ**

Quan sát sự nhuộm màu bằng hóa mô miễn dịch của các lát cắt não, trong khoảng từ Bregma 0.0 đến -1.0 mm, cho thấy 3-MCPD liều 10 và 50 mg/kg hầu như không gây kích hoạt sự biểu hiện c-fos ở 3 thời điểm gây phơi nhiễm.

➤ **Khảo sát sự biểu hiện c-fos sau khi gây phơi nhiễm 3-MCPD liều 100 mg/kg trong 24-48-72 giờ**

Không phát hiện não chuột có dấu hiệu biểu hiện c-fos sau khi uống 3-MCPD liều trong 24 giờ. Sự biểu hiện c-fos được quan sát sau 48 giờ, chủ yếu ở vùng vỏ não. Sự biểu hiện c-fos không tập trung trên một vị trí mà được trải ra một cách rải rác. 3-MCPD liều 100 mg/kg cũng gây biểu hiện c-fos rải rác trong vùng vỏ não sau 72 giờ. Dù không thể xác định chính xác được mức độ biểu hiện, nhưng mật độ tín hiệu dương tính có vẻ thấp hơn so với thời điểm 48 giờ.

3.4.2. Khảo sát tác động của 3-MCPD trên sự thoái hóa tế bào thần kinh não chuột bằng phương pháp nhuộm cresyl violet

Ở giai đoạn cấp tính (từ 24-72 giờ), 3-MCPD ở các liều 10 mg/kg, 50 mg/kg và 100 mg/kg hầu như chưa thể hiện tác động gây thoái hóa tế bào thần kinh nào ở vùng hồi hải mã. Sau 2 tuần cho uống 3-MCPD tất cả các chuột uống liều 100 mg/kg đều bị tử vong. Sự nhuộm màu vùng hồi hải mã bằng cresyl violet cho thấy hầu như không có sự khác biệt rõ rệt nào giữa các lô uống 3-MCPD ở các liều 10 mg/kg và 50 mg/kg so với lô chứng.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Chọn liều nghiên cứu và thời gian thử nghiệm

Trong nghiên cứu của chúng tôi, liều phơi nhiễm 3-MCPD trên chuột thử nghiệm được chọn dựa trên cơ sở liều thấp nhất có khả năng gây độc của 3-MCPD là 1,1 mg/kg; đồng thời cũng dựa trên cơ sở tham

khảo từ các công trình đã công bố khi nghiên cứu về độc tính của 3-MCPD với khoảng liều sử dụng dao động từ 1-100 mg/kg thể trọng. Liều 3-MCPD thử nghiệm sẽ được tăng dần từ liều thấp nhất lên 10 lần, 20 lần, 40 lần, 100 lần để có thể đánh giá được mức liều gây tác động của 3-MCPD trên các cơ quan theo mục tiêu (trên gan, máu và thần kinh) cũng như theo dõi được sự đáp ứng theo liều nếu có.

Thời gian thử nghiệm cũng được thiết kế phù hợp với tính chất của thử nghiệm như thử nghiệm trong thời gian ngắn đối với biểu hiện c-fos do c-fos là gen chỉ biểu hiện sau khi có yếu tố tác động trong vòng 24 giờ. Thử nghiệm trong thời gian dài (6 tháng, 12 tháng) khi một số thử nghiệm độc tính trong thời gian ngắn chưa cho thấy tác động rõ ràng của 3-MCPD như tác động trên gan, huyết học.

4.2. Độc tính của 3-MCPD trên huyết học

So sánh với các nghiên cứu đã thực hiện, thiết kế trong nghiên cứu của chúng tôi xác định mục tiêu đánh giá độc tính của 3-MCPD theo các mốc thời gian trải dài từ pha cấp tính, bán cấp tính và mạn tính (6 tháng, 12 tháng) và chỉ tiêu để đánh giá trong nghiên cứu của chúng tôi cũng có khác biệt với các nghiên cứu trước đây là thời gian đông cầm máu. Với những sự khác biệt này, tác động của 3-MCPD trên huyết học sẽ được đánh giá bao quát và rõ ràng hơn.

4.2.1. Trên chỉ số bạch cầu

Trong nghiên cứu của chúng tôi, trong 6 tháng, 3-MCPD có khuynh hướng gây giảm bạch cầu đơn nhân, giảm bạch cầu trung tính, và gây tăng bạch cầu lympho. Trong nghiên cứu của Kirton và cộng sự (1970) trên khỉ, kết quả cho thấy 3-MCPD (30 mg/kg) gây suy tủy, giảm bạch cầu, còn nghiên cứu của Cho và cộng sự (2008) trên chuột nhắt trong 13 tuần không cho thấy tác động nào của 3-MCPD. Vì thế, chúng tôi cho rằng thiết kế về thời gian, liều thử nghiệm và chủng thú vật thí nghiệm có thể cho những kết quả khác nhau. Sau 12 tháng, kết quả của chúng tôi cho thấy 3-MCPD gây giảm tổng lượng bạch cầu,

giảm bạch cầu trung tính và bạch cầu lympho, phù hợp với nghiên cứu của Kirton và cộng sự (1970), cũng như của Cho và cộng sự (về sự tăng bạch cầu đơn nhân, dù ở nghiên cứu của Cho là chưa có ý nghĩa thống kê). Chúng tôi còn nhận thấy khả năng tác động mạnh mẽ của 3-MCPD lên lympho bào, tạo ra những lympho có hình thái đa hình và những lympho bào bất thường. Những biến đổi nói chung về số lượng các loại bạch cầu cũng như về hình thái của bạch cầu lympho có thể là do tác động gây nhiễm độc mạn tính khác nhau của 3-MCPD trên dòng tế bào tủy (tế bào gốc đa năng tạo bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân) và trên dòng tế bào lympho (tạo lympho B và lympho T), làm rối loạn sự tăng sinh và biệt hóa các dòng bạch cầu. Trong nghiên cứu của chúng tôi, kết quả quan sát được chủ yếu trên các dòng bạch cầu ở máu ngoại vi. Chúng tôi chưa tiến hành được kỹ thuật phết tủy để có thể chứng minh nhận định nêu trên. ***Tuy vậy, với quy trình đánh giá độc tính của 3-MCPD được thiết kế trong thời gian dài hơn (6 tháng và 12 tháng), những tác động lên dòng tế bào bạch cầu của 3-MCPD ghi nhận được trong nghiên cứu này là một kết quả mới về độc tính của 3-MCPD so với những nghiên cứu trước đây. Kết quả này đưa ra lời cảnh báo về nguy cơ gây ung thư bạch cầu nếu bị phơi nhiễm mạn tính 3-MCPD.***

4.2.2. Trên chỉ số hồng cầu và các thông số liên quan

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy 3-MCPD gây tăng nồng độ huyết sắc tố trung bình trong hồng cầu, có khuynh hướng gây giảm thể tích trung bình hồng cầu sau 6 tháng phơi nhiễm và làm giảm số lượng hồng cầu, hematocrit, và Hb sau 12 tháng phơi nhiễm. Đồng thời, kết quả xét nghiệm bất thường hồng cầu cũng cho thấy có tình trạng hồng cầu có kích thước nhỏ ($MCV < 80$ fL). Như vậy, có thể độc tính mạn tính của 3-MCPD là gây thiếu máu hồng cầu nhỏ. Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Kirton và cộng sự (1970) cho thấy rằng 3-MCPD gây thiếu máu trên chuột cống. Trong

khi đó nghiên cứu của Cho và các cộng sự (2008) không quan sát thấy tình trạng thay đổi số lượng hồng cầu, mặc dù có sự gia tăng chỉ số thể tích trung bình hồng cầu (MCV). Qua kết quả này, có thể khẳng định rằng phơi nhiễm 3-MCPD lâu dài có nguy cơ gây thiếu máu hồng cầu nhỏ do 3-MCPD tác động lên dòng tế bào hồng cầu gây giảm số lượng hồng cầu và thay đổi kích thước hồng cầu.

➤ **Trên hình thái hồng cầu:** theo các tài liệu tham khảo, chúng tôi chưa tìm thấy có một nghiên cứu nào mô tả về tác động của 3-MCPD trên hình thái hồng cầu. Có lẽ phần lớn các nghiên cứu đều tập trung vào chỉ số sinh hóa huyết học và chưa quan tâm đến khía cạnh hình thái. Tác động của 3-MCPD trên hình thái hồng cầu theo thời gian ở các pha cấp tính, bán cấp tính và mạn tính, cho thấy ở pha cấp tính, 3-MCPD chưa tác động đến hình thái hồng cầu ngoại trừ liều rất cao 100 mg/kg; ở pha bán cấp tính, 3-MCPD với liều ≥ 10 mg/kg sau 3 tháng đã có tác động đến hồng cầu, làm màng tế bào hồng cầu xuất hiện những chỗ lồi rõ hình thành gai và liều 40 mg/kg sau 6 tháng xuất hiện nhiều hồng cầu có gai nhọn.

Hồng cầu hình gai là một quan sát thường thấy trong các phết máu của nhiều loại động vật, có thể là kết quả của sự phết máu trong môi trường ưu trương. Tuy nhiên, nhiều diễn tiến bệnh, như bệnh lý thiếu hụt abetalipoprotein, bệnh lý tuyến giáp hay rối loạn thần kinh và các độc chất được tìm thấy làm thay đổi màng hồng cầu, dẫn đến sự thay đổi hình dạng hồng cầu. Vì vậy, sự có mặt của hồng cầu hình gai trong các phết máu hoặc các xét nghiệm huyết học có thể phản ánh những thay đổi bệnh lý có ý nghĩa về mặt chẩn đoán. Chúng tôi chưa có điều kiện đánh giá sự thay đổi nồng độ abetalipoprotein, cũng như chưa nhận thấy rõ tác động của 3-MCPD trên gan nên chưa thể kết luận được nguyên nhân gây nên sự hình thành hồng cầu hình gai, tuy nhiên có thể nhận định đây là một tác động bất lợi của 3-MCPD trên hình thái hồng cầu.

Bên cạnh tác động gây hiện tượng hồng cầu gai, sau 12 tháng 3-MCPD còn được ghi nhận có tác động gây hồng cầu có nhân kết đặc (NRBC), và đặc biệt gây tạo mảnh vỡ hồng cầu. Điều này cho thấy 3-MCPD gây thay đổi hình thái, từ đó gây tạo mảnh vỡ hồng cầu. Sự thay đổi hình dạng hồng cầu là nguyên nhân dẫn đến thiếu máu nặng hơn do khả năng bắt giữ oxy kém và màng hồng cầu không bền sẽ dẫn đến vỡ hồng cầu khi đi qua nơi mao mạch máu hẹp, nhỏ.

Như vậy, tác động của 3-MCPD lên những thay đổi hình thái hồng cầu được xem như là biểu hiện bệnh lý, và có thể nhận định 3-MCPD, với tác động làm thay đổi số lượng và hình thái hồng cầu, có thể gây ra những ảnh hưởng nhất định lên chức năng của hồng cầu.

Tóm lại, so với những kết quả đã báo cáo của các nghiên cứu trước đây, tác động bất lợi của 3-MCPD trên hình thái hồng cầu, được xem như là một bất thường, một biểu hiện bệnh lý, thu được trong nghiên cứu này là điểm mới về độc tính mạn tính của 3-MCPD xét trên khía cạnh huyết học, bổ sung thêm vào phân độc tính chung của 3-MCPD.

4.2.3. Trên chỉ số tiểu cầu và quá trình đông máu

Trái ngược với nghiên cứu trên khi của Kirton và cộng sự (1970), các kết quả thí nghiệm của chúng tôi cho thấy số lượng tiểu cầu ở các lô uống 3-MCPD đều tăng lên, tuy nhiên thể tích trung bình của tiểu cầu lại giảm. Mặc dù chúng tôi chưa có thử nghiệm đánh giá chức năng tiểu cầu nhưng những thay đổi này có thể làm thay đổi chất lượng và chức năng tiểu cầu. Điều này rất phù hợp với kết quả thí nghiệm quá trình đông máu với thời gian đông-chảy máu ngắn hơn ở các lô dùng 3-MCPD. Tiểu cầu tăng trong những trường hợp: thiếu máu hồng cầu nhỏ do thiếu sắt, hội chứng cận ung thư (paracancersyndrome), hay nhiễm trùng hay viêm nhiễm mạn tính. Kết quả trên dòng tế bào hồng cầu cho thấy phơi nhiễm 3-MCPD lâu

dài gây thiếu máu nên số lượng tiểu cầu gia tăng trong nghiên cứu này có thể giải thích được là do thiếu máu. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Kirton và cộng sự về khía cạnh 3-MCPD gây thiếu máu, nhưng lại trái ngược về số lượng tiểu cầu. So sánh 2 quy trình nghiên cứu để làm rõ sự khác nhau cho thấy: về thời gian, nghiên cứu của Kirton diễn ra trong 6 tuần so với nghiên cứu của chúng tôi lần lượt là 3 tháng, 6 tháng, và 12 tháng; về thú vật thử nghiệm, nghiên cứu của Kirton sử dụng khỉ, so với chuột nhắt trong nghiên cứu của chúng tôi. Như vậy, sự khác biệt này có thể giải thích được do thời gian nghiên cứu khác nhau, và có thể phần nào là do thú vật thử nghiệm khác nhau. Nghiên cứu của Kirton và cộng sự thực hiện trong 6 tuần phơi nhiễm 3-MCPD nên có thể tác động trên tiểu cầu chưa rõ rệt, sự giảm tiểu cầu có thể do tác động của 3-MCPD trên tủy xương gây ảnh hưởng đến quá trình sinh máu, và thực chất sự suy tủy cũng được đề cập trong nghiên cứu của Kirton. Trong nghiên cứu dài hơn của chúng tôi, kết quả có thể phản ánh rõ nét hơn tác động chuyên biệt của 3-MCPD trên từng dòng tế bào máu và cho thấy có sự phù hợp giữa việc 3-MCPD gây thiếu máu và làm tăng số lượng tiểu cầu.

Với kết quả thu được về sự gia tăng số lượng tiểu cầu, chúng tôi thực hiện khảo sát đánh giá ảnh hưởng của tác động này của 3-MCPD đến quá trình đông cầm máu. Có nhiều xét nghiệm để đánh giá quá trình đông cầm máu bao gồm các xét nghiệm thăm dò giai đoạn cầm máu ban đầu hay giai đoạn đông máu huyết tương (đông máu ngoại sinh hay nội sinh). Trong nghiên cứu của chúng tôi, với điều kiện thực tế còn hạn chế, chúng tôi chỉ thực hiện đánh giá tác động của 3-MCPD lên quá trình đông cầm máu ở giai đoạn cầm máu ban đầu thông qua khảo sát thời gian chảy máu và thời gian đông máu (thực chất là khảo sát giai đoạn đông máu nội sinh), và được tiến hành trong thời gian 3 tháng, 6 tháng và 12 tháng. Sự giảm thời gian chảy máu và thời gian đông máu thu được phần nào phản ánh được tác động của 3-

MCPD lên quá trình đông cầm máu, và tác động này có thể khởi nguồn từ sự gia tăng tiểu cầu, từ đó có thể làm gia tăng nguy cơ tăng đông.

Như vậy, với những khác biệt và sự phù hợp đã được phân tích của nghiên cứu này với những nghiên cứu đã nêu, chúng tôi có những ý kiến về độc tính của 3-MCPD trên huyết học như sau:

- Phơi nhiễm mạn tính 3-MCPD (12 tháng) gây rối loạn tăng sinh và biệt hóa bạch cầu, làm giảm tổng lượng bạch cầu do gây giảm bạch cầu trung tính, gây thay đổi số lượng bạch cầu lympho và làm tăng bạch cầu đơn nhân. Điều này có thể do 3-MCPD gây tác động trên tủy xương, làm rối loạn sản xuất các dòng bạch cầu. Mặt khác, 3-MCPD làm thay đổi hình thái của bạch cầu lympho, tạo ra những tế bào lympho có hình thái đa hình và những lympho bào bất thường và có thể là một yếu tố nguy cơ gây bệnh lý ung thư của hệ tạo máu.
- Phơi nhiễm mạn tính 3-MCPD có nguy cơ gây thiếu máu thể hiện qua sự giảm số lượng hồng cầu, giảm lượng Hb, giảm tỉ lệ Hct, làm thay đổi hình thái hồng cầu, kích thước hồng cầu nhỏ lại và hồng cầu bị phân mảnh. Những tác động này có thể làm giảm chức năng sinh lý của hồng cầu (vận chuyển oxy, mềm dẻo và linh động khi lưu thông qua các mạch máu nhỏ mà không bị vỡ hồng cầu). Nguyên nhân có thể do 3-MCPD gây tác động bất lợi lên màng hồng cầu, làm thay đổi cấu trúc màng hồng cầu, từ đó dẫn đến những biến đổi về hình thái và chất lượng các thành phần của hồng cầu.
- Phơi nhiễm 3-MCPD mạn tính làm tăng tiểu cầu, rút ngắn thời gian đông máu và chảy máu. Điều này gây các tác động bất lợi trên quá trình đông cầm máu, và với tác động làm biến đổi hình thái hồng cầu, máu dễ bị đông hơn bình thường (thực tế có những mẫu máu bị đông ngay cả khi chứa trong ống chống đông có EDTA).

4.3. Độc tính của 3-MCPD trên nhiễm sắc thể

Các liều 3-MCPD 1 mg/kg, 10 mg/kg sau 24 giờ cũng như sau 2

tuần chưa có tác động đến sự hình thành vi nhân trên tế bào hồng cầu. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Stephen Robjohns và cộng sự (2003), khi khảo sát thử nghiệm vi nhân trên tế bào hồng cầu non ở tủy xương với các liều 15 mg/kg, 30 mg/kg và 60 mg/kg sau 24 giờ, cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các lô thử nghiệm với lô chứng. Khảo sát liều 100 mg/kg chúng tôi nhận thấy chỉ trong 24 giờ, hồng cầu có vi nhân đã xuất hiện và tăng lên sau 48 giờ và 72 giờ.

Sau 3 tháng và 6 tháng, 3-MCPD liều 1, 10, 20 và 40 mg/kg đều gây sự hình thành vi nhân rõ rệt. Sau 12 tháng, sự hình thành vi nhân trong hồng cầu cũng thể hiện khá rõ, với tỉ lệ hồng cầu có vi nhân xuất hiện cao hơn nhiều so với pha 6 tháng và mức độ xuất hiện tăng theo liều lượng phơi nhiễm. Kết quả này củng cố lại những kết quả thu được trong thời gian ngắn hơn và vì vậy chúng tôi có thể kết luận 3-MCPD gây ra sự hình thành vi nhân trong hồng cầu máu ngoại vi, lệ thuộc vào thời gian phơi nhiễm và liều lượng sử dụng. Tác động này phản ánh nguy cơ phá vỡ nhiễm sắc thể của 3-MCPD lên các tế bào máu và cũng có thể ảnh hưởng đến các tế bào khác.

Nguyên nhân gây ra sự xuất hiện vi nhân trong hồng cầu do tổn thương nhiễm sắc thể sẽ được đánh giá chính xác hơn nếu khảo sát hiện tượng này với xét nghiệm hồng cầu lưới và tế bào tủy xương cho kết quả bất thường. Chúng tôi hy vọng trong những nghiên cứu tiếp theo, khi có điều kiện thực hiện, chúng tôi sẽ có kết quả đánh giá chính xác hơn sự tác động gây tổn thương nhiễm sắc thể của 3-MCPD.

Tóm lại, sau 12 tháng, chúng tôi ghi nhận được 3-MCPD gây nên sự hình thành vi nhân trong hồng cầu máu ngoại vi. Đây là những kết quả mới so với tài liệu chúng tôi tìm thấy được, có thể là do những nghiên cứu trước đây tiến hành trong thời gian ngắn (ít hơn 6 tháng) nên chưa ghi nhận được các biến đổi này.

4.4. Tác động của 3-MCPD trên gan

Kết quả thu được trong nghiên cứu của chúng tôi, trên các lô chuột uống 3-MCPD liên tục trong thời gian 6 tháng ở tất cả các liều (1, 10 và 20 mg/kg) không thấy xuất hiện bất thường bệnh lý trên gan. Kết quả này khá phù hợp với nghiên cứu của Cho và cộng sự trên chuột nhắt (2008). Theo đó, 3-MCPD ở liều cao nhất 76,79 mg/kg/ngày uống liên tục trong 13 tuần cũng không gây gia tăng hoạt tính các enzym gan, và không gây ra bất thường bệnh lý nào trên gan. Một nghiên cứu khác của Kluwe (1983) thực hiện trong thời gian ngắn (từ 24 giờ đến 90 ngày), cho thấy một số tác động nhất định của 3-MCPD trên gan, nhưng các kết quả cũng không khẳng định rõ ràng các độc tính của 3-MCPD trên gan, dù về mặt vi thể, nghiên cứu của Kluwe có báo cáo xung quanh tĩnh mạch cửa gan, bào tương tế bào gan bị căng phồng ở nhiều mức độ khác nhau.

Tác động của 3-MCPD ở pha mạn tính 12 tháng cho thấy ở liều 3-MCPD 10 mg/kg tần xuất nghịch sản tế bào gan có xu hướng tăng lên. Kết quả này dù chưa thể kết luận cụ thể độc tính của 3-MCPD trên gan nhưng góp phần cảnh báo về khả năng gây độc của 3-MCPD trên gan nếu bị phơi nhiễm trong thời gian dài (12-24 tháng). Trong nghiên cứu của Sunahara (24 tháng) không thấy đề cập đến độc tính của 3-MCPD trên gan, có thể là dù đánh giá thiết kế trong thời gian dài nhưng sự khảo sát mô học gan về mặt vi thể chưa được thực hiện, nên chưa phát hiện được tác động trên gan của 3-MCPD.

4.5. Khảo sát tác động của 3-MCPD trên não dựa trên biểu hiện c-fos và phương pháp nhuộm màu bằng cresyl violet

Chúng tôi chọn phương pháp hóa mô miễn dịch để khảo sát sự biểu hiện c-fos, và đánh giá thoái hóa tế bào thần kinh bằng phương pháp nhuộm cresyl violet, khác với trong nghiên cứu của Cavanagh và cộng sự (1993), phương pháp chụp cắt lớp não được áp dụng để quan sát tác động của 3-MCPD trên thần kinh. C-fos là một gen tiền ung thư, mã hóa cho các protein giúp điều hòa sự tăng trưởng và biệt

hóa của tế bào. Sự tăng sao chép và tăng biểu hiện c-fos xảy ra khi có sự kích thích của các yếu tố tăng trưởng. Vì vậy, khi có hóa chất tác động trên thần kinh, có thể quan sát được sự biểu hiện c-fos trong thời gian thích hợp (24 giờ). Trong thử nghiệm này, sự biểu hiện của c-fos chỉ được ghi nhận ở liều 3-MCPD rất cao (100 mg/kg) và chỉ ở 2 thời điểm là 48 giờ và 72 giờ. Vì thế có thể xem đây là tác động của 3-MCPD trên tế bào thần kinh. C-fos là một protein nội bào nên biểu hiện kết quả chính xác hơn nếu kháng thể xâm nhập được vào trong bào tương hoặc phá vỡ màng tế bào. Kỹ thuật western blot sẽ giúp xác định sự biểu hiện protein rõ hơn và việc xử lý tính thấm qua màng của kháng thể bằng thuốc thử triton cũng làm tăng độ phản ứng kháng nguyên - kháng thể. Chúng tôi đã tiến hành xử lý mẫu mô não với các chất tăng thấm nhưng chưa có được điều kiện tiến hành western blot, vì vậy sự hạn chế về kết quả là chưa thể tránh khỏi.

Đối với phương pháp nhuộm màu bằng cresyl violet, kết quả chưa thật sự cho thấy có những điểm khác biệt rõ rệt giữa lô chúng và các lô sử dụng 3-MCPD, thậm chí cả ở liều cao. Ngoài ra, do kết luận chủ yếu dựa trên mật độ tính vì chúng tôi chưa có phần mềm xác định số lượng thân tế bào bắt màu nên rất khó có nhận định chính xác các hiện tượng xảy ra. Có thể, đối với phương pháp này chúng tôi cần phải thử nghiệm trong một thời gian dài (6-12 tháng) mới có thể có những kết quả cho thấy sự khác biệt (nếu có xảy ra).

KẾT LUẬN

Qua thời gian thực hiện đề tài nghiên cứu, theo các mục tiêu đã đề ra, chúng tôi đã thu được một số kết quả sau đây:

1. Tác động của 3-MCPD trên huyết học:

- Trên bạch cầu: sau 6 tháng, 3-MCPD gây giảm bạch cầu trung tính và gây tăng bạch cầu lympho ở liều 3-MCPD ≥ 10 mg/kg. Sau 12 tháng, hiện tượng giảm bạch cầu trung tính thể hiện rõ rệt hơn, đặc

biệt bạch cầu lympho lúc này cũng giảm mạnh. Trên lympho bào có sự thay đổi về hình thái và sự xuất hiện của các lympho bào bất thường.

- Trên hồng cầu: sau 6 tháng, 3-MCPD chưa gây tác động đến hồng cầu ngoại trừ hiện tượng hồng cầu tăng sắc. Sau 12 tháng, 3-MCPD gây ra hiện tượng thiếu máu với việc giảm số lượng hồng cầu, giảm hematocrit và giảm hemoglobin ở các lô uống 3-MCPD đặc biệt là lô 3-MCPD 10 mg/kg. Ngoài ra, 3-MCPD còn gây phân mảnh hồng cầu và làm thay đổi hình thái của hồng cầu, có thể tác động lên chức năng của hồng cầu.

- Trên tiểu cầu và quá trình đông máu: 3-MCPD gây tăng số lượng tiểu cầu khá rõ rệt và làm giảm thể tích tiểu cầu. Kết quả khảo sát quá trình đông cầm máu cho thấy có sự rút ngắn thời gian đông máu và chảy máu.

2. Tác động của 3-MCPD trên nhiễm sắc thể:

Kết quả thu được về sự hình thành vi nhân trên hồng cầu và hiện tượng hồng cầu có nhân kết đặc cho thấy 3-MCPD có nguy cơ gây phá vỡ cấu trúc nhiễm sắc thể, thể hiện độc tính trên gen.

3. Tác động của 3-MCPD trên gan:

Sau 6 tháng, 3-MCPD liều cao nhất đến 20 mg/kg thể trọng/ngày không gây ra những bất thường bệnh lý trên gan chuột nhắt. Sau 12 tháng, ở liều 10 mg/kg, 3-MCPD có khuynh hướng làm tăng tỉ lệ nghịch sản tế bào gan cao hơn 4 lần so với lô chứng. Tuy sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê nhưng nó cũng cho thấy khuynh hướng gây loạn sản tế bào gan khi sử dụng 3-MCPD với liều trên 10 mg/kg trong thời gian kéo dài.

4. Tác động của 3-MCPD trên thần kinh:

Chỉ có 3-MCPD liều 100 mg/kg mới gây biểu hiện c-fos và sự biểu hiện này được quan sát rõ nhất ở thời điểm 48 giờ phơi nhiễm, ít hơn ở thời điểm 72 giờ, phù hợp với đặc tính của gen c-fos là chỉ biểu hiện thoáng qua và biến mất. 3-MCPD ở các liều lượng và thời điểm

khảo sát như mô tả trong thực nghiệm chưa phản ánh tình trạng thoái hóa thần kinh ở vùng quan sát là hồi hải mã.

Với quá trình thử nghiệm độc tính của 3-MCPD thu được những kết quả nhất định như trên, cùng với việc tham khảo các tài liệu liên quan, chúng tôi đề xuất có thể sử dụng thiết kế phương pháp trong nghiên cứu của chúng tôi để đánh giá độc tính của một số độc chất trên khía cạnh sinh học:

- Đánh giá độc tính trên nhiễm sắc thể ở các pha cấp tính, bán cấp tính và mạn tính qua phương pháp vi nhân trên hồng cầu.
- Đánh giá độc tính trên huyết học, đặc biệt là đánh giá hình thái bất thường của hồng cầu, bạch cầu.
- Đánh giá độc tính mạn tính trên gan bằng quan sát mô học, đặc biệt là quan sát vi thể.
- Quy trình hóa mô miễn dịch và nhuộm màu cresyl violet để đánh giá độc tính trên thần kinh.

KIẾN NGHỊ

1. Nghiên cứu sâu hơn tác động của 3-MCPD trên chức năng hồng cầu, đặc biệt ý nghĩa bệnh học của sự hình thành hồng cầu gai.
2. Khảo sát sự tạo thành vi nhân trong hồng cầu với xét nghiệm hồng cầu lưới và tế bào tủy xương để đánh giá chính xác hơn nguyên nhân gây ra sự xuất hiện vi nhân.
3. Nghiên cứu độc tính dài hạn hơn (2 năm) của 3-MCPD nhằm xác định nguy cơ gây ung thư của 3-MCPD, đặc biệt trên các loại bệnh lý ung thư của hệ tạo máu.
4. Hoàn thiện quy trình nhuộm hóa mô miễn dịch và nghiên cứu ảnh hưởng của 3-MCPD lên não bộ với thời gian dài hơn để có thể phát hiện các tổn thương thần kinh bằng các kháng thể chuyên biệt khác.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. Ngô Kiến Đức, Trần Đình Duy, Trần Mạnh Hùng (2009), “Khảo sát độc tính mạn tính của 3-Monochloropropan-1,2-diol (3-MCPD) trên gan chuột nhắt”, *Tạp chí Y học Thực hành*, Bộ Y Tế, Số (682 + 683), tr. 716-720.
Hội nghị khoa học công nghệ toàn quốc – Trường Đại học Y Dược Cần Thơ 2009
2. Ngo Kien Duc, Tran Thi Kim Cuc, Nguyen Thi Tuong Vi, Tran Manh Hung (2009), “3-Monochloropropan-1,2-diol (3-MCPD) induced micronucleus formation and morphological alteration in peripheral erythrocytes”, *Pharma Indochina VI*, Proceedings of the sixth Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences, pp. 20-24.
3. Ngô Kiến Đức, Trần Mạnh Hùng (2010), “Nghiên cứu độc tính của 3-Monochloropropan-1,2-diol (3-MCPD) trên hình thái hồng cầu và sự tạo vi nhân”, *Tạp chí Y học*, Đại học Y Dược TPHCM, Tập 14 (1), tr. 47-51.
Hội nghị khoa học công nghệ tuổi trẻ - Đại học Y Dược TPHCM lần thứ 21 – 14/1/2010
4. Ngô Kiến Đức, Lê Phan Xuân Quyên, Nguyễn Văn Thanh, Trần Mạnh Hùng (2011), “Nghiên cứu độc tính của 3-Monochloropropan-1,2-diol (3-MCPD) trên nhiễm sắc thể ở các pha cấp tính, bán mạn tính và mạn tính”, *Tạp chí Y học*, Đại học Y Dược TPHCM, Tập 15 (1), tr. 20-25.
Hội nghị khoa học kỹ thuật – Đại học Y Dược TPHCM lần thứ 28 – 14/1/2011
5. Ngô Kiến Đức, Đặng Thị Trúc Giang, Nguyễn Văn Thanh, Trần Mạnh Hùng (2011), “Nghiên cứu tác động của 3-Monochloropropan-1,2-diol (3-MCPD) trên sự biểu hiện của c-fos”, *Tạp chí Y học*, Đại học Y Dược TPHCM, Tập 15 (1), tr. 318-323.
Hội nghị khoa học kỹ thuật – Đại học Y Dược TPHCM lần thứ 28 – 14/1/2011
6. Ngô Kiến Đức, Trần Mạnh Hùng, Nguyễn Văn Thanh (2011), “Nghiên cứu tác động của 3-Monochloropropan-1,2-diol (3-MCPD) trên quá trình đông máu”, *Tạp chí Dược học*, Bộ Y Tế, Số 424, tr. 33-37.