Nghiên cứu tạo vi nhân trên tế bào hồng cầu cá để đánh giá tính gây đột biến

*Trần Văn Khoa**

TÓM TẮT

Test vi nhân (VN) được sử dụng rộng rãi để đánh giá độc tính đối với vật chất di truyền. Thử nghiệm VN là phương pháp đơn giản, nhanh chóng để đánh giá tổn thương cấu trúc hoặc số lượng nhiễm sắc thể. Nghiên cứu tạo VN trên cá rô đồng bằng cách cho cá phơi nhiễm với cyclophosphamide ở 3 liều khác nhau theo 2 cách: cho uống và cho trực tiếp vào môi trường nước. Lấy máu từ đuôi cá, sau đó dàn và nhuộm Giemsa. Phân tích tiêu bản trên kính hiển vi quang học. Kết quả: đã xây dựng được quy trình thử nghiệm VN. Tần số VN ở nhóm cá thử nghiệm cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng, test VN trên cá là thử nghiệm ex vivo đơn giản, rẻ và nhanh để đánh giá tính gây đột biến của nhiều loại tác nhân khác nhau.

* Từ khóa: Cá; Vi nhân; Hồng cầu; Gây đột biến.

Study on application of micronuclei induction in fish's erythrocytes for mutagenecity asessment

SUMMARY

Micronuclei test (MN test) is a widely used and accepted endpoint of genotoxicity testing. The micronucleus test provides a simple and rapid indirect measure of the induction of structural or numerical chromosome aberrations. The study were conducted in Anabas testudineus. Micronucleus induction by using fishes were exposed to cyclophosphamide at three different doses by two ways, namely directly exposed in water and drinking. The obtained blood smears from fish tails were stained Giemsa and scored microscopically. Results: the Fish-MN assay procedure was established. MN frequencies on fishes exposured to tested agents were higher than that in comparison with the control and the Fish-MN test, as an ex vivo assay, is a simple, inexpensive and rapid assay system for genotoxicity testing induced by different agents.

** Key words: Fish; Micronuclei (MN), Erythocytes; Mutagenecity.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Có nhiều phương pháp đánh giá tính gây đột biến gen của các tác nhân khác nhau. Mỗi phương pháp có ưu điểm và nhược điểm riêng. Theo khuyến cáo của Tổ chức Hợp tác và phát triển (OECD), tùy từng loại tác nhân, con đường tác động của tác nhân và điều kiện cụ thể mà lựa chọn phương pháp thích hợp [4].

* *Học viện Quân y*

Phản biện khoa học: TS. Lê Văn Đông

Lĩnh vực đánh giá tính an toàn thuốc cũng như đánh giá khả năng gây đột biến

của các tác nhân ở nước ta hiện nay chưa phát triển và chưa thành hệ thống, vì vậy việc phát triển hệ thống thử nghiệm và đưa vào áp dụng trong thực tế là điều hết sức cần thiết. Ngoài ra, thử nghiệm đánh giá tính gây đột biến còn được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực môi trường.

Cá là loài sinh vật sống trong môi trường nước, vì vậy, có thể cho cá phơi nhiễm với các tác nhân bằng nhiều đường khác nhau, đặc biệt là những tác nhân trong môi trường nước. Mặt khác, đây cũng là đối tượng thử nghiệm in vivo trên tế bào động vật, gần với người hơn các đối tượng khác hay thử nghiệm in vitro [1, 2, 3]. Do vậy, việc nghiên cứu xây dựng quy trình tạo VN trên cá sẽ có giá trị ứng dụng thực tiễn cao và khả năng áp dụng rộng rãi.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

80 cá rô đồng (*Anabas testudineus*), trọng lượng từ 25 - 30 g.

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Phơi nhiễm với các tác nhân độc hại:*

Cá được nuôi trong bể chứa 1 tuần cho quen với môi trường mới và thải loại các yếu tố độc hại. Điều kiện nuôi: nước máy, bể chứa có sục khí, thức ăn tổng hợp. Chia thành 8 lô, mỗi lô gồm 10 cá, cụ thể:

- Lô đối chứng âm: nuôi thả bình thường.

- Lô đối chứng dương: xử lý bằng cách chiếu tia UV liên tục 1 ngày.

- Lô uống cyclophosphamide, liều 20 mg/kg thể trọng.

- Lô uống cyclophosphamide, liều 30 mg/kg thể trọng.

- Lô uống cyclophosphamide, liều 40 mg/kg thể trọng.

- Lô hòa cyclophosphamide vào môi trường thả cá, liều 5 mg/l.

- Lô hòa cyclophosphamide vào môi trường thả cá, liều 10 mg/l.

- Lô hòa cyclophosphamide vào môi trường thả cá, liều 20 mg/l.

Tỷ lệ cá chết là % cá chết/tổng số cá tính từ thời điểm xử lý cá với tác nhân.

** Cách làm tiêu bản:*

Quy trình được tiến hành theo Kabil A. và CS (1995) có cải biên [7, 8].

- Cắt đuôi cá, dàn máu cá lên lam kính để thu tế bào hồng cầu.

- Để tiêu bản khô tự nhiên.

- Cố định tiêu bản bằng methanol trong 15 phút.

- Để tiêu bản khô, sau đó nhuộm màu bằng Giemsa 10% trong 7 phút.

- Rửa tiêu bản bằng nước cất.

- Để tiêu bản khô tự nhiên, sau đó phân tích.

** Phương pháp phân tích VN:*

Phân tích tiêu bản trên kính hiển vi quang học với độ phóng đại 40X. x 10X. = 400X. Các chỉ tiêu phân tích, theo Schmid W. (1975) [5, 9], bao gồm:

- Tần số VN/1.000 tế bào hồng cầu. Mỗi mẫu phân tích 1.500 tế bào.

- Tần số tế bào có nhân bất thường/ 1.000 tế bào.

Trong đó:

+ VN là những nhân nhỏ, dạng tròn hoặc

ô van, tách khỏi nhân chính, đường kính ≤ 1/3 đường kính nhân chính, có dạng cấu trúc đa chiều, độ bắt màu tương đương với nhân chính.

+ Nhân bất thường là những nhân không có dạng ô van, lồi lõm hoặc có phần nhô ra, hình múi, dạng nảy chồi.

** Xử lý số liệu:* bằng phần mềm xử lý thống kê chuyên dụng dùng trong sinh học IRRISTAT.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả hoàn thiện quy trình tạo VN trên tế bào hồng cầu cá.

Sử dụng tác nhân thử nghiệm tia UV và cyclophosphamide, là những tác nhân được đánh giá có tác dụng gây đột biến tạo VN.

Bảng 1: Tần số VN.

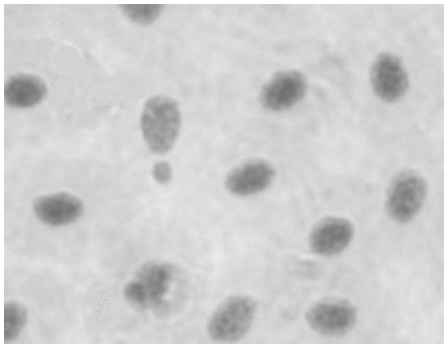
LÔ THÍ NGHIỆM (n = 10)	LIỀU LƯỢNG	TẦN SỐ VN (‰ ± SD)	P (so với chứng âm)
Đối chứng âm	Nước cất	1,005 ± 0,583	
Đối chứng dương	Tia UV	5,889 ± 2,960	< 0,001
Cyclophosphamide hòa môi trường	5 mg/l	1,010 ± 0,333	> 0,05
	10 mg/l	1,014 ± 0,192	> 0,05
	20 mg/l	2,095 ± 0,810	< 0,01
Cyclophosphamide cho uống	20 mg/kg thể trọng	1,015 ± 0,695	> 0,05
	30 mg/kg thể trọng	1,016 ± 0,794	> 0,05
	40 mg/kg thể trọng	3,466 ± 1,380	< 0,01

Ở lô đối chứng dương và các lô xử lý cyclophosphamide hòa vào môi trường nuôi cá (nồng độ 20 mg/l nước) và cyclophosphamide cho uống (liều 40 mg/kg thể trọng) đã có tác dụng tạo VN với tần số cao hơn nhóm chứng âm. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, với $p < 0,001$ và $p < 0,01$.

Bảng 2: Tần số tế bào có nhân bất thường.

LÔ THÍ NGHIỆM	LIỀU LƯỢNG	TẦN SỐ TẾ BÀO CÓ NHÂN BẤT THƯỜNG (‰ ± SD)	p
Đối chứng âm		0,200 ± 0,163	
Đối chứng dương		1,003 ± 0,154	< 0,001
Cyclophosphamide hòa môi trường	5 mg/lít	0,200 ± 0,133	> 0,05
	10 mg/lít	0,202 ± 0,145	> 0,05
	20 mg/lít	0,265 ± 0,156	< 0,05
Cyclophosphamide cho uống	20 mg/kg thể trọng	0,202 ± 0,125	> 0,05
	30 mg/kg thể trọng	0,205 ± 0,165	> 0,05
	40 mg/kg thể trọng	0,325 ± 0,155	< 0,05

Ở lô đối chứng dương và các lô xử lý cyclophosphamide hòa vào môi trường nuôi cá (nồng độ 20 mg/l nước) và cyclophosphamide cho uống (liều 40 mg/kg thể trọng), ngoài tác dụng tạo VN, còn có tác dụng gây bất thường nhân với các dạng khác nhau như: nhân méo mó, lồi lõm với tần số sai khác có ý nghĩa thống kê.



Hình 1: Hình ảnh VN trên tế bào hồng cầu cá (mũi tên).

Tần số VN thu được ở nghiên cứu này thấp hơn so với một số tác giả khác cũng sử dụng đối tượng là một loài cá rô địa phương với cyclophosphamide theo đường tiêm và liều tương đương. Tần số VN khác nhau có thể liên quan đến đường phơi nhiễm và loài cá do sự nhạy cảm của chúng khác nhau [3, 4].

2. Đối tượng và cách thức tạo VN.

** Về loài cá dùng để thử nghiệm:*

Mỗi loài cá chịu ảnh hưởng của các tác nhân gây đột biến khác nhau, phụ thuộc vào nhiều yếu tố: đặc điểm di truyền, tính nhạy cảm... [4]. Trong nghiên cứu này, đối tượng cá rô đồng, là một loài cá phổ biến ở ao hồ, sông ngòi, kênh rạch, đồng ruộng Việt Nam. Chúng có thể được dùng làm chỉ thị nhạy cảm sinh học. Tuy nhiên, có thể sử dụng các loài cá khác như: cá rô cờ, cá vàng với tính nhạy cảm cảm cao hơn. Một số tác giả sử dụng loài cá nước ngọt hoặc cá nước mặn để đánh giá ô nhiễm ở những môi trường nước khác nhau, tùy mục đích nghiên cứu [1, 6].

** Về liều lượng, đường và thời gian phơi nhiễm:*

Về nguyên tắc, liều lượng tác nhân phải đạt mức độ nhất định mới đủ nhạy để đánh giá, song cũng không thể > liều LD_{50}. Liều lượng này tùy thuộc vào loài cá, tính nhạy cảm của chúng đối với tác nhân. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng liều < LD_{50}, nên không thấy xuất hiện hiện tượng cá bị chết trong thời gian thử nghiệm. Điều này cũng tránh được yếu tố gây nhiễu của hiện tượng cá chết không phải do tác nhân thử nghiệm mà do điều kiện nuôi.

Đối với cá, có thể sử dụng 3 đường phơi nhiễm: uống, tiếp xúc trực tiếp với môi trường nước (cá vừa tự uống vừa tiếp xúc trực tiếp với môi trường) và tiêm vào ổ bụng. Như vậy, tùy từng loại tác nhân mà có thể áp dụng cách phơi nhiễm khác nhau. Đường uống có thể áp dụng cho hầu hết các loại chất khác nhau: hòa tan hay không hòa tan, vô khuẩn hay không vô khuẩn. Đường tiếp xúc với môi trường nước áp dụng cho những chất có khả năng hòa tan tốt trong nước. Đường tiêm áp dụng cho những chất, chế phẩm bào chế có thể dùng đường tiêm (đảm bảo vô khuẩn, không gây kích ứng viêm…). Thông thường, hiện tượng cá bị chết do cảm ứng thuốc sẽ xảy ra trong 1 - 4 ngày [4]. Tùy loại chất thử nghiệm và loài sinh vật mà sử dụng đường phơi nhiễm khác nhau [4].

Như đã được trình bày ở trên, VN được hình thành bởi sự ngưng tụ các đoạn đứt không tâm nhiễm sắc thể hay toàn bộ nhiễm sắc thể không được bao gồm trong hạt nhân chính sau kỳ sau của quá trình phân bào. Do không thể quan sát được VN cho đến chu trình tế bào đầu tiên, tần số của VN trong một quần thể tế bào được đánh giá phụ thuộc vào động học của tế bào. Tỷ lệ phân bào có thể rất khác nhau, phụ thuộc vào từng loài sinh vật, loại mô đích (máu ngoại vi, tuỷ xương, gan, lách thận…) [4, 6] và điều kiện môi trường (nhiệt độ, hàm lượng oxy… trong nước). Vì vậy, các nhà nghiên cứu không thể đưa ra thông số thời gian cố định để thu được hiệu suất tối ưu của tần số VN sau khi phơi nhiễm với tác nhân. Điều này chỉ có thể có được thông qua thử nghiệm chuẩn hóa quy trình. Sự hình thành VN cũng xảy ra một cách tự nhiên trong tế bào cá, nhưng tần số VN tự phát ở cá dường như thấp hơn nhiều so với các sinh vật khác, như động vật gặm nhấm [3, 8, 9]. Điều này có lợi cho nghiên cứu VN trên cá. Trong nghiên cứu này, sử dụng đối tượng cá là hợp lý vì có nhiều ưu điểm để đánh giá những loại tác nhân khác nhau. Thời gian phơi nhiễm 4 ngày đủ cho việc hoàn thành một số chu trình phân bào, qua đó hồng cầu mới có VN có thể quan sát được. Nếu sớm quá, hồng cầu mới có khả năng bị đột biến, chưa được tạo ra; nếu muộn quá, hồng cầu mang đột biến có VN có thể không còn nữa và ảnh hưởng đến hiệu quả đánh giá VN.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu thử nghiệm tạo VN trên tế bào hồng cầu của 80 cá rô đồng với 8 lô thí nghiệm khác nhau, bao gồm: chứng dương, chứng âm, cyclophosphamide hòa vào nước và cyclophosphamide cho uống với 3 liều khác nhau, chúng tôi rút ra kết luận sau:

Đã hoàn thiện được quy trình tạo VN trên tế bào hồng cá rô đồng Việt Nam với 2 đường phơi nhiễm: hòa cyclophosphamide vào môi trường (liều 20 mg/l) và đường uống (liều 40 mg/kg cân nặng), thời gian phơi nhiễm 4 ngày.

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục tiến hành thử nghiệm tạo VN với các đối tượng khác: cá rô cờ, cá vàng.

2. Đưa kỹ thuật VN trên tế bào hồng cầu cá vào đánh giá tính an toàn của thuốc.

3. Nghiên cứu chọn một số loài cá phổ biến ở Việt Nam làm marker sinh học theo dõi và đánh giá ô nhiễm môi trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abul Farah M, Bushra A, M. Niamat Ali, Waseem Ahmad. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish Channa punctatus. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2003, 54, pp.25-29.

2. Claudia B, Emanuela P, Paola R, Daniela M.P, Andrea S. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. Aquatic Toxicology. 2006, 78, pp.93-98.

3. Cesar K.G. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. Mutation Research. 2002, 518, pp.145-150.

4. Guosheng Chen, Paul A. White. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. Mutation Research. 2004, 567, pp.151-225.

5. Heddle J.A, Cimino M.C, Hayashi M, et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. Environ Mol Mutagen. 1991, 18, pp.277-291.

6. Janina B, Veronika D, Aleksandras R, Laura A, Odd K.A. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. Aquatic Toxicology. 2006, 78, pp.99-104.

7. Kabil AI-Sabti, Chris D. Metcalfe. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutation Research. 1995, 343, pp.121-135.

8. Sabti Al, C.D. Metcalfe. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutat Res. 1995, 343, pp.121-135.

9. Schmid W. The micronucleus test. Mutation Res. 1975, 31, pp.9-15.