

Nghiên cứu áp dụng quy trình tạo vi nhân trên tế bào hồng cầu phôi gà đánh giá tính gây đột biến

Trần Văn Khoa*

TÓM TẮT

Test vi nhân (MN) được sử dụng rộng rãi để đánh giá độc tính đối với vật chất di truyền. Thử nghiệm vi nhân là phương pháp đơn giản, nhanh chóng để đánh giá tổn thương cấu trúc hoặc số lượng nhiễm sắc thể (NST). Nghiên cứu tiến hành trên trứng gà ấp 11 ngày, đánh giá khả năng tạo vi nhân với tác nhân thử nghiệm là acrylamide và ethilium bromide. Dàn và nhuộm máu phôi gà bằng phương pháp May-Grünwald-Giemsa có cải biên. Phân tích tiêu bản trên kính hiển vi quang học. Kết quả nghiên cứu: đã xây dựng được quy trình thử nghiệm vi nhân. Tần số vi nhân ở nhóm thử nghiệm cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng, cho thấy khả năng sử dụng một phương pháp đơn giản, rẻ và nhanh để đánh giá tính gây đột biến của nhiều loại tác nhân khác nhau.

* Từ khóa: Vi nhân; Hồng cầu; Phôi gà.

Study on application of micronuclei induction in chick embryo's erythrocytes for mutagenecity asesment

SUMMARY

The formation of micronuclei MN is a widely used and accepted endpoint of genotoxicity testing. The micronucleus assay provides a simple and rapid indirect measure of the induction of structural or numerical chromosome aberrations. Subjects and methods: The study was conducted on hen's eggs, incubated for 11 days, for micronucleus induction by using acrylamide and ethilium bromide. The obtained blood smears from embryos were stained by a modified May-Grünwald-Giemsa procedure and scored microscopically. Results: The HET-MN assay procedure was established. MN frequencies on HET erythrocytes exposed to tested agents were higher than that in comparison with the control and the HET-MN test (the hen's egg test for micronucleus induction), as an ex vivo assay, is a simple, inexpensive, and rapid assay system for genotoxicity testing.

* Key words: Micronuclei; Erythrocytes; Chick embryo.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Để đánh giá tính gây đột biến gen của các tác nhân lý, hóa có nhiều thử nghiệm khác nhau. Mỗi thử nghiệm có những ưu

điểm và nhược điểm riêng. Tùy từng loại tác nhân, tùy từng con đường tác động của tác nhân và điều kiện cụ thể mà lựa chọn thử nghiệm thích hợp theo hướng dẫn của tổ chức hợp tác và phát triển-OECD [1, 2].

* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Hoàng Văn Long

Về đánh giá tính an toàn thuốc cũng như khả năng gây đột biến của các tác nhân ở

nước ta hiện nay chưa phát triển và chưa thành hệ thống, chính vì vậy, việc phát triển

các hệ thống thử nghiệm và đưa vào áp dụng trong thực tế là điều hết sức cần thiết. Những thử nghiệm này được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực: y, dược, môi trường.v.v. Thử nghiệm vi nhân có thể tiến hành trên nhiều đối tượng khác nhau. Tuy nhiên, phôi trứng gà là một đối tượng nhạy cảm với tác nhân hơn so với các giai đoạn phát triển hậu phôi. Mặt khác, đây cũng là đối tượng thử nghiệm trên tế bào động vật, gần hơn so với người [3]. Thử nghiệm này lại ít tốn kém, không cần nhiều công sức cho việc nuôi dưỡng động vật như thử nghiệm trên chuột mà vẫn mang tính chất in vivo. Do vậy, việc nghiên cứu xây dựng quy trình tạo vi nhân trên phôi trứng gà sẽ có giá trị ứng dụng thực tiễn cao.

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

36 trứng gà từ các gà Cobb-500, Mỹ, 25 - 60 tuần tuổi đã tuyển chọn có phôi (sau ấp 7 ngày), chia làm 6 lô, gồm 2 lô thí nghiệm, 2 lô chứng dương và 2 lô chứng âm.

2. Hoá chất và vật liệu.

Hoá chất thử: arylamide, ethilium bromide.

Hoá chất làm tiêu bản: cồn tuyệt đối, đệm PBS pH 5,8, PBS pH 6,8, thuốc nhuộm nhân tế bào Giemsa và May-Grünwald.

3. Phương pháp tạo vi nhân trên phôi trứng gà.

* Ủ trứng:

Trứng gà thụ tinh (có trống) được lựa chọn và ấp trong lò ấp quay tự động 3 giờ/lần tại cơ sở ấp trứng thuộc Công ty Cổ phần Chăn nuôi Hòa Bình, xã Tân Thành, Lương Sơn, Hòa Bình. Điều kiện ấp: nhiệt độ $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $62,5 \pm 7,5\%$.

Ngày thứ nhất-d1 được tính sau khi bắt đầu ấp 24 giờ.

* Phương pháp xử lý:

Ngày thứ 8, tiêm hóa chất hoặc dược chất tùy theo liều tính toán vào buồng khí với liều định sẵn cho các lô thí nghiệm. Sau khi tiêm vào buồng khí, phủ kín lỗ thủng lại bằng parafin để ủ tiếp, bảo đảm phôi vẫn có thể tiếp tục phát triển.

Đối với lô chứng, nước cất được dùng để thay thế với thể tích tương đương.

Tính toán liều các tác nhân khác nhau được lựa chọn cho thử nghiệm, trên cơ sở trọng lượng trung bình của trứng là $65 \pm 5\text{g}$.

Cụ thể: 24 giờ trước khi xử lý, để dựng đứng trứng quay đầu có buồng khí lên trên, đưa trực tiếp tác nhân vào buồng khí bằng kim tiêm theo liều đã định.

* Lấy mẫu:

Đưa kim trực tiếp vào mạch màng đệm túi niệu lấy máu và dàn mẫu trên lam kính sạch theo phương pháp quét. Lấy mẫu từ ngày thứ 11 sau khi ấp [7, 8].

* Phương pháp phân tích vi nhân:

Phân tích tiêu bản trên kính hiển vi quang học thường với độ phóng đại 40X. x 10X. 400X. Các chỉ tiêu phân tích theo Schmid W (1975) [7], bao gồm:

- Tỷ lệ chết phôi (%) là % phôi chết trên tổng số trứng ấp tính từ thời điểm ngày thứ 8 trước khi xử lý.

- Tần số vi nhân/1.000 tế bào. Mỗi mẫu phân tích 10.000 tế bào.

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

Chú ý:

- Các vi nhân là những nhân nhỏ dạng tròn hoặc ô van tách khỏi nhân chính, đường kính nhỏ hơn hoặc bằng 2/3 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 hoặc có phần nhô ra hình múi dạng nảy chồi.

- PCE (Polychromatic erythrocytes): là hồng cầu non, bao gồm: nguyên hồng cầu, tiền nguyên hồng cầu; NCE (Normochromatic erythrocytes): là các hồng cầu trưởng thành.

- Đánh giá vi nhân trên hồng cầu non.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Xây dựng quy trình tạo vi nhân trên phôi gà.

Các bước áp, xử lý và thu mẫu tiến hành theo quy trình thông thường được các tác giả áp dụng. Kỹ thuật nhuộm tiêu bản cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm của chúng tôi để thu được tiêu bản có chất lượng, đảm bảo cho việc phân tích.

* Quy trình được tiến hành theo các bước sau:

- Để tiêu bản khô tự nhiên tại nhiệt độ phòng.
- Cố định tiêu bản trong cồn tuyệt đối (cải biên).
- Nhuộm tiêu bản theo phương pháp nhuộm kép: nhuộm May-Grünwald trong 3 phút.
- Rửa tiêu bản bằng dung dịch đệm pH 5,8.
- Nhuộm tiêu bản trong dung dịch Giemsa 30% trong đệm (thể tích/thể tích) trong 20 phút.

2. Đánh giá tính gây đột biến của acrylamide, ethilium bromide.

- Biệt hóa tiêu bản trong đệm phosphate pH 5,8 trong 5 phút (cải biên).

- Để tiêu bản khô tự nhiên.

- Phân tích tiêu bản.

Bảng 1: So sánh quy trình cũ và quy trình cải biên.

BƯỚC	NỘI DUNG	QUY TRÌNH CŨ T. WOLF VÀ CS (2002) [8]	QUY TRÌNH CẢI TIẾN
1	Để tiêu bản khô tự nhiên	Có	Có
2	Cố định tiêu bản trong cồn tuyệt đối	Không	Có
3	Nhuộm tiêu bản theo phương pháp nhuộm kép: May-Grünwald	3 phút	3 phút
4	Rửa tiêu bản	Bằng nước cất	Bằng đệm
5	Nhuộm tiêu bản trong dung dịch Giemsa 30% trong đệm (thể tích/ thể tích) trong 20 phút.	Có	Có
6	Rửa tiêu bản bằng nước	Có	Không
7	Biệt hóa tiêu bản trong đệm phosphate pH 6,8 trong 5 phút.	Không	Có

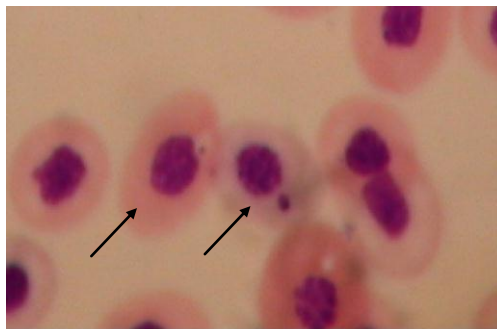
Bằng quy trình cải biên, chất lượng tiêu bản đạt được các tiêu chí cần thiết cho việc phân tích như quy trình cũ. Mặt khác, do có thêm bước cố định trong cồn tuyệt đối, tế bào gắn tốt hơn lên tiêu bản, bắt màu tốt hơn, bào tương mịn và tiêu bản có thể lưu trữ dài ngày.

Về thời điểm lấy máu: tỷ lệ hồng cầu được tạo ra ở túi noãn hoàng chiếm khoảng 30% so với tổng số hồng cầu vào ngày thứ 10, thời điểm sau đó, hồng cầu được tạo ra nhiều từ tủy xương [5, 7]. Vì vậy, thời điểm lấy máu phù hợp nhất là ngày thứ 11.

Bảng 2: Các lô thí nghiệm tiêm ethidium bromide và acrylamide.

LIỀU XỬ LÝ	ETHILIUM BROMIDE	ACRYLAMIDE	NƯỚC CẮT
0,05 mg/trứng (200 µl)	6	6	6
0,075 mg/trứng (200 µl)	6	6	6

Sau đó tiến hành thí nghiệm theo quy trình vi nhân gà như trình bày ở phần trên, kết quả thu được như sau:



Hồng cầu đơn sắc (mũi tên bên trái),
hồng cầu đa sắc có một vi nhân (mũi tên bên phải).

Bảng 3: Ảnh hưởng của ethidium bromide và acrylamide lên phôi gà và tần số vi nhân trên tế bào hồng cầu.

HOÁ CHẤT	LIỀU (mg/trứng)	PHÔI CHẾT	SỐ TẾ BÀO PHÂN TÍCH (n)	TẦN SỐ TRUNG BÌNH CÓ NHÂN BẤT THƯỜNG (%) ± SD	TẦN SỐ VI NHÂN (%) ± SD
Chứng dương (cyclophosphamide)	0,05 mg (C)	0/6	5.000	0,00	25,4 ± 10,2
Acrylamide	0,05 (1)	0/6	5.000	1,58 ± 0,21	17,1 ± 2,4
	0,075 (2)	1/6	5.000	1,05 ± 0,01	11,8 ± 1,7
Ethidium bromide	0,05 (3)	0/6	5.000	1,20 ± 0,21	13,1 ± 2,4
	0,075 (4)	1/6	5.000	0,86 ± 0,08	10,9 ± 1,4
Chứng âm (nước cất)	200µl (0)	0/6	5.000	0,00	0,3 ± 0,1
p				(C-0) < 0,01 (1, 2 - 0) < 0,01 (3, 4 - 0) < 0,01	(C-0) < 0,01 (1, 2 - 0) < 0,01 (3, 4 - 0) < 0,01

Đối với chứng dương có tác nhân cyclophosphamide, là chất thuộc nhóm alkyl hóa mạnh, gây ức chế phân bào, tính gây đột biến cao, đã gây được tần số vi nhân cao trên tế bào hồng cầu phôi gà, thể hiện sự thành công của kỹ thuật, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) về tần số tế bào có nhân bất thường, tần số vi nhân giữa các nhóm: chứng âm-chứng dương; nhóm xử lý acrylamide-chứng âm; nhóm xử lý ethidium bromide-chứng cũng như các nhóm có cùng tác nhân nhưng liều lượng khác nhau.

Bảng 2 cho thấy liều lượng tác nhân ảnh hưởng đến tần số vi nhân. Trong đó, liều lượng tác nhân sử dụng đều thấp hơn liều LD₅₀. Tuy nhiên, acrylamide và ethidium bromide liều 0,075 mg/trứng có tần số vi nhân cũng như nhân bất thường thấp hơn liều 0,05 mg/ trứng. Điều này có thể do sự ức chế phân bào, giảm tỷ lệ hồng cầu non và tần số vi nhân đánh giá trên tế bào hồng cầu non.

Kết quả tạo vi nhân ở nhóm chứng âm, chứng dương và nhóm xử lý acrylamide phù hợp với kết quả của một số tác giả khác [4, 9]. Đối với nhóm xử lý ethidium bromide: chúng tôi không có số liệu của các tác giả khác để so sánh. Tuy nhiên, thành công trong việc tạo vi nhân cũng như kỹ thuật nhuộm tế bào cho thấy khả năng của thử nghiệm hoàn toàn có thể thực hiện được và có giá trị trong đánh giá tính gây đột biến. Kết quả thử nghiệm thấy: ở nhóm xử lý hóa chất có những tế bào có nhân bất thường, đó là những tế bào có thể bị chết do ảnh hưởng của tác nhân mà loại tế bào đó không quan sát thấy ở nhóm đối chứng [8, 9]. Đây cũng là một chỉ tiêu có giá trị trong đánh giá.

Thử nghiệm vi nhân trên tế bào phôi trứng gà là thử nghiệm có thể dùng để đánh giá tính gây đột biến của nhiều tác nhân khác nhau, đặc biệt là thử nghiệm đánh giá in vivo và đánh giá giai đoạn phát triển phôi của động vật. Đây là giai đoạn nhạy cảm của tế bào phôi với tác nhân gây đột biến. So với thử nghiệm vi nhân trên tế bào hồng cầu ngoại vi chuột đang được sử dụng, phương pháp này có một số ưu điểm sau: tần số vi nhân trên phôi gà tích tụ theo thời gian do hồng cầu bất thường không bị loại trừ bởi hoạt động của lách như ở chuột và động vật có vú khác [6, 10]. Một đặc điểm nữa là, khi dùng thử nghiệm vi nhân trên tế bào tủy xương, các tác nhân thử nghiệm phải thâm nhập được vào tủy xương, thông qua quá trình chuyển hóa mới gây tác động đến quá trình sinh hồng cầu, thì thử nghiệm vi nhân trên phôi gà thể hiện hiệu quả khi tác nhân tác động vào túi noãn hoàng, là nơi sinh hồng cầu ở phôi gà [9]. Hơn thế nữa, tế bào hồng cầu gà là tế bào có nhân, khác với tế bào hồng cầu chuột, việc quan sát vi nhân trên hồng cầu gà dễ dàng hơn.

KẾT LUẬN

1. Đã xây dựng được quy trình tạo vi nhân trên phôi trứng gà bằng ethidium bromide và acrylamide để đánh giá tác nhân gây đột biến.

2. Test vi nhân trên phôi trứng gà một thử nghiệm đơn giản, rẻ tiền, có hiệu quả để đánh giá khả năng gây đột biến của tác nhân, có thể sử dụng cùng với thử nghiệm khác như đánh giá tác nhân đột biến của môi trường, đánh giá tính an toàn của thuốc, lương thực, thực phẩm và nhiều chế phẩm khác trước khi sử dụng cho con người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Bruns G.A.P, Ingram V.M.* The erythroid cells and haemoglobins of the chick embryo, *Phil Trans R Soc.* 1973, 266. pp.225-305.
2. *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.
3. *Luepke N.P.* Embryotoxicity-testing by HET Hen's egg test. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 319 Suppl. R. 1982, 24.
4. *Novotna B, Jelineck R.* Mutagenic and teratogenic effects of cyclophosphamide on the chick embryo. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1990. pp.341-350.
5. *Lassila O., Martin C, Toivanen P, et al.* Erythropoiesis and lymphopoiesis in the chick yolk-sac-embryo chimeras: Contribution of yolk sac and intraembryonic stem cells. *Blood.* 1982, 59, pp.377-381.
6. *Romanoff A.* The avian embryo, structural and functional development. *McMillan, New York.* 1960.
7. *Schmid W.* The micronucleus test. *Mutation Res.* 1975, 31, pp.9-15.
8. *Thorsten Wolf et al.* Some new methodological aspects of the hen's egg test for micronuclei induction (HET-MN). *Mutation Research.* 2002, pp.59-76.
9. *Thorsten Wolf et al.* The hen's egg test for micronuclei induction (HET-MN): Novel analysis with a series of well-characterized substances support the further evaluation of the test system. *Mutation research.* 2008, pp.150-164.
10. *Wong G.K, Cavey M.J.* Development of the liver in the chicken embryo.