



Original Article

Evaluation of the Toxicity of Dichlorodiphenyl-trichloroethane (DDT) to the Expression Levels of Three Genes *p53*, *rara1*, *wnt* in the Embryos and Liver of Fish Medaka *Oryzias latipes*

Tran Thi Thu Huong^{1,*}, Nguyen Xuan Tong²

¹Hanoi University of Mining and Geology, Duc Thang, Bac Tu Liem, Hanoi, Vietnam

²Industrial University of Ho Chi Minh, 12 Nguyen Van Bao, Go Vap, Ho Chi Minh, Vietnam

Received 15 May 2021

Revised 02 September 2021; Accepted 22 February 2022

Abstract: Three genes *p53*, *rara1*, *wnt* and liver of Medaka fish tissue were selected to study the toxicity of DDT to fish embryo (8 days old) and adult Medaka fish (3 months old). TEM and real-time PCR methods were used to examine changes in structure of liver tissue and genetic expression. The TEM results recorded a clear difference between the control and the experimental sample. Adult Medaka fish exposed to 1 $\mu\text{g/L}$ DDT for 24 hours has a distorted liver cell nucleus with many hollow lipid particles, and the sinus-shaped meshes are clustered, interrupted; lysosome is not intact with many degenerative bubbles. The results of real-time PCR analysis showed that DDT affects the development, different and proliferation of cells in the embryonic stage and gene expression in adult stage. All three genes *p53*, *rara1* and *wnt* in fish embryos changed strongly and tended to be inhibited when exposing with 1700 $\mu\text{g/L}$ DDT, the values were recorded respectively 0.9; 4.9 and 5.4 times compared to the control sample (1 times). For adult fish, gene expression was lower than fish embryos with real-time PCR analysis values for the three genes *p53*, *rara1* and *wnt* respectively 0.9 and 0.5; 0.36 and 0.09; 0.53 and 0.09 times after exposure to 1500 and 1700 $\mu\text{g/L}$ DDT. These results demonstrated that gene expression is dependent on the developmental stage of the cell as well as on the dose of the chemical exposed. The development, cell differentiation/proliferation in the embryonic and adulthood stages affected differently to the cell gene expression.

Keywords: Medaka fish, DDT, toxicity, gene, liver tissue, real-time PCR.

* Corresponding author.

E-mail address: huonghumg@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5225>

Đánh giá độc tính của Dichlorodiphenyl-trichloroethane (DDT) đến mức độ biểu hiện của ba gen *p53*, *rara1*, *wnt* ở phôi và gan cá Medaka *Oryzias latipes*

Trần Thị Thu Hương^{1,*}, Nguyễn Xuân Tòng²

¹Trường Đại học Mô Địa chất Hà Nội, Đức Thắng, Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh, 12 Nguyễn Văn Bào, Gò Vấp, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nhận ngày 15 tháng 5 năm 2021

Chỉnh sửa ngày 02 tháng 9 năm 2021; Chấp nhận đăng ngày 22 tháng 02 năm 2022

Tóm tắt: Ba gen *p53*, *rara1*, *wnt* và gan cá Medaka được lựa chọn để nghiên cứu độc tính của Dichlorodiphenyl-trichloroethane (DDT) đến phôi cá (08 ngày tuổi) và cá Medaka trưởng thành (03 tháng tuổi). Phương pháp TEM và real-time PCR được sử dụng để kiểm tra sự thay đổi trong cấu trúc mô gan và sự biểu hiện của gen. Kết quả chụp TEM ghi nhận sự khác biệt rõ ràng giữa mẫu đối chứng và mẫu thử nghiệm. Cá Medaka trưởng thành phơi nhiễm với 1 µg/L DDT trong 24 h có nhân tế bào gan méo mó, xuất hiện nhiều hạt lipid rỗng, các tấm lưới hình sin bị co cụm, đứt đoạn; lysosome không còn nguyên vẹn, xuất hiện nhiều bong bóng thoái hóa. Kết quả chạy real-time PCR cho thấy DDT ảnh hưởng đến sự phát triển, biệt hóa và tăng sinh của tế bào ở giai đoạn phôi và biểu hiện gen ở giai đoạn trưởng thành. Cả ba gen *p53*, *rara1* và *wnt* ở phôi cá đã biến đổi mạnh mẽ và có xu hướng bị ức chế khi phơi nhiễm với 1700 µg/L DDT, các giá trị ghi nhận lần lượt là 0,9; 4,9 và 5,4 lần so với mẫu đối chứng (1 lần). Đối với cá trưởng thành, sự biểu hiện của gen thấp hơn so với phôi cá với các giá trị chạy real-time PCR ở ba gen *p53*, *rara1* và *wnt* lần lượt là 0,9 và 0,5; 0,36 và 0,09; 0,53 và 0,09 lần sau khi phơi nhiễm với 1500 và 1700 µg/L DDT. Kết quả này chứng tỏ rằng sự biểu hiện của gen phụ thuộc vào các giai đoạn phát triển của tế bào cũng như liều lượng của hóa chất phơi nhiễm. Sự biệt hóa cũng như phát triển và tăng sinh của tế bào ở giai đoạn phôi và trưởng thành ảnh hưởng khác nhau đến sự biểu hiện gen của tế bào.

Từ khóa: Cá Medaka, DDT, độc tính, gen, mô gan, real-time PCR.

1. Mở đầu

Hóa chất bảo vệ thực vật (BVTV) clor hữu cơ OCPs (organochlorine) là các hợp chất hữu cơ có nhiều hơn 5 nguyên tố clor, được sử dụng để kiểm soát côn trùng gây hại trong nông nghiệp và bảo vệ sức khỏe cộng đồng như phòng trừ sốt rét, chúng tồn lưu lâu hơn trong môi trường so với hóa chất photpho hữu cơ vì rất bền vững đối với hầu hết phân hủy hóa học hoặc sinh học [1]. Trong đó, Dichlorodiphenyl-trichloroethane (DDT) là hoạt chất độc hại nhất

trong nhóm thuốc trừ sâu clo hữu cơ OCPs, được tổng hợp ở dạng kết hợp giữa DDT và dichlorodiphenyldichloro-ethylene (DDE) [2]. DDT là chất gây ô nhiễm bền vững khó phân hủy, có thể tồn tại trong đất sau 30 năm và trong cơ thể sinh vật thủy sinh tới 150 năm [3]. Viện Nghiên cứu Ung thư Quốc tế (IARC) đã phân loại DDT thuộc nhóm 2 B, có thể gây ung thư cho con người do DDT nhanh chóng bị phân hủy theo con đường sinh học thành DDE (dichlorodiphenyldichloroethylene) là chất có độc tính cao hơn cả DDT, gây rối loạn thần kinh ngoại biên, làm tê liệt bộ phận hoặc toàn bộ hệ thần kinh [4]. Ngoài ra, tỷ lệ chất chuyển hóa DDE trên tổng DDT có thể được sử dụng

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: tranthithuhuong@humg.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5225>

để xác định việc sử dụng DDT là gần đây (đang diễn ra) hoặc đã ngừng lại (sử dụng trước đó) [3]. DDTs và các dạng chuyển hóa của nó tan trong mỡ nên được tích lũy trong các mô mỡ như gan và não [5]. Mặc dù đã bị cấm sử dụng ở nhiều nước từ năm 1972, song thực tế DDT vẫn tiếp tục được sử dụng cho mục đích y tế hạn chế ở một số nước như một loại hóa chất BVTV trong việc kiểm soát bệnh sốt rét, sốt phát ban và các vec tơ trypanosomia [5].

Cá Medaka (*Oryzias latipes*) hay cá gạo Nhật Bản, là một loài cá nhỏ có kích thước 3 - 4 cm, chúng là một trong 27 loài thuộc họ cá cơm Adrianichthyidae thường phân bố trong các nơi có dòng chảy chậm, các hồ thủy triều ven biển và các cánh đồng lúa ở các vùng Đông Á và Đông Nam Á [6]. Cá Medaka chịu được một phạm vi nhiệt độ và độ cứng rộng từ 0 đến 27 °C và từ 90 đến 477 ppm, pH trong khoảng 6,5 - 6,8 [7]. Do cá Medaka có thời gian sinh sản ngắn, chịu được lạnh, có hệ gen tương đối nhỏ và phát triển nhanh chóng, thời gian sinh trưởng của chúng là 7 tuần (thay vì 9 tuần ở cá ngựa vằn) và tăng trưởng mạnh hơn ở dải nhiệt độ rộng từ 6 - 40 °C (43 - 104 °F) [7] và có thể được vận chuyển dễ dàng nên chúng thường được sử dụng làm sinh vật mô hình trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu sinh học và độc học. Cho đến nay có rất nhiều nghiên cứu trên thế giới đã ứng dụng các phương pháp thử nghiệm sinh học để đánh giá ngưỡng gây độc của hóa chất BVTV tới các sinh vật thủy sinh [8-10]. Cụ thể Gormley và Teather (2003) đã chứng minh rằng hóa chất BVTV endosulfan có ảnh hưởng đến sinh trưởng, tập tính và khả năng sinh sản của cá Medaka Nhật Bản (*O. latipes*) [8]. Trong nghiên cứu của Bony et al., (2010), các tác giả đã phát hiện ra hóa chất BVTV diuron và azoxystrobine có ảnh hưởng đến ADN và khả năng thu tinh của tinh trùng cá ngựa vằn (*Danio rerio*) [9]. Akcha et al., (2012) cũng đã phát hiện hóa chất BVTV diuron và glyphosate đã ảnh hưởng đến khả năng thu tinh của tinh trùng, sự phát

triển hình thái và ADN của ấu trùng hàu Thái bình dương (*Crassostrea gigas*) dù ở nồng độ thấp (0,05 µg/L) [10].

Công ước Stockholm về các hợp chất khó phân hủy (Persistent Organic Pollutants - POPs) bao gồm việc sử dụng hạn chế DDT đối với việc kiểm soát bệnh sốt rét ở nhiều quốc gia khác nhau do thực tế nó vẫn là hình thức kiểm soát rẻ nhất, dễ nhất và hiệu quả nhất [11]. Vì vậy, ở Việt Nam hiện nay trong số các loại hóa chất BVTV thuộc nhóm hữu cơ khó phân hủy POPs, DDT là nhóm được sử dụng rộng rãi và phổ biến nhất, kế đến là Lindan (gamma 666) và chỉ thấy một số ít các loại hóa chất khác như Aldrin, Dieldrin,... Để khảo sát độc tính của hóa chất BVTV, trong phạm vi bài báo này DDT được lựa chọn để đánh giá ảnh hưởng của hóa chất BVTV đến biến đổi cấu trúc của ba gen *p53*, *rara1*, *wnt* trong phôi và gan cá Medaka *O. latipes* bằng kỹ thuật TEM và Real Time - PCR [11].

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị cá và phôi cá

Cá Medaka *O. latipes* có nguồn gốc từ phòng Thủy sản Trung tâm sinh học Tp. HCM, được nuôi duy trì ở điều kiện nhiệt độ 28 °C ± 10 °C, pH: 6,5, độ cứng tổng: 13 mgCaCO₃/L, Độ kiềm tổng: 0,1 (mgCaCO₃/L) và chu kỳ quang học là 14 giờ sáng: 10 giờ tối. Nước bể nuôi được lọc liên tục để đảm bảo độ sạch. Cá được cho ăn bằng sản phẩm thương mại bobo bán sẵn cho cá cảnh 1-2 lần/ngày. Ngừng cho cá ăn trong khoảng nửa ngày trước khi tiến hành ghép đôi để phối cá. Sau đó, tạo một vách ngăn giữa bể phối để tách riêng cá đực và cá cái theo tỉ lệ 1:1 vào cuối chu kỳ sáng và tháo vách ngăn để cá phối với nhau. Sau 30 phút cho phối, toàn bộ phôi được thu sang cốc thủy tinh 1000 mL và tiến hành loại bỏ các phôi không được thụ tinh. Các phôi tốt được thu nhận vào các đĩa petri thủy tinh sạch có đường kính 35 mm để nuôi phôi. Những phôi nở thành ấu trùng khỏe mạnh sẽ được lựa

chọn nuôi đến 3 tháng tuổi để phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Bố trí thí nghiệm bổ sung Dichlorodiphenyl-trichloroethane

Quy trình thí nghiệm được xây dựng theo hướng dẫn thử nghiệm độc tính hóa chất trên cá và phôi cá của Tổ chức hợp tác và phát triển kinh tế (OECD 236 công bố ngày 26/7/2013) [12]. Nồng độ gốc của DDT là 1235 ppm ($p = 97,8\%$) được pha loãng trong dung môi hữu cơ DMSO (dimethyl sulfoxide) 0,1%. Chọn những phôi cá 8 ngày tuổi và cá 3 tháng tuổi chuyển vào các giếng thí nghiệm có bổ sung 1 $\mu\text{g/L}$ DDT. Mỗi giếng thí nghiệm có 10 phôi hoặc 10 cá con được phơi nhiễm với DDT trong 24 giờ. Sau 24 giờ, cán bộ của Trung tâm sẽ thực hiện vi phẫu nhằm thu nhận ARN và mô gan cá để chụp TEM và chạy Real-time PCR xác định ảnh hưởng của DDT đến gen và cấu trúc bào quan này của cá. Mẫu được bảo quản trong dung dịch OsO_4 1% trong cacodylate 0,1 M do phòng Hiển vi điện tử - Viện vệ sinh dịch tễ TW cung cấp để chuyển về phòng thí nghiệm thực hiện thí nghiệm chụp TEM.

2.3. Các phương pháp đánh giá ảnh hưởng của Dichlorodiphenyl-trichloroethane

i) Phương pháp kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM: transmission electron microscopy) [6]

Phương pháp này có độ phân giải cao dùng để nghiên cứu hình thái, cấu trúc của các bào quan sau khi sinh vật phơi nhiễm với DDT. Gan cá Medaka thu được sẽ mang đi ly tâm (5000 v/p) trong 10 phút để thu sinh khối tế bào. Sinh khối này được xử lý trong dung dịch 2,5% glutaraldehyde/cacodylate 0,1M, pH = 7,2 - 7,4. Tiếp tục rửa mẫu bằng dung dịch cacodylate 0,1 M và cố định lại bằng dung dịch OsO_4 1% trong cacodylate 0,1 M. Sau đó mẫu sẽ được xử lý bằng cách kết tinh trong epoxyrein; cắt lát siêu mỏng ở mức 50 - 100 nm và nhuộm bằng Uranyl Acetate. Kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) có các thông số độ phóng đại $M = 50 - 600,000$, độ phân giải $\delta = 3 \text{ \AA}$, điện áp gia tốc $U = 40 - 100 \text{ kV}$ được sử dụng để ghi nhận các thay đổi của tế bào gan giữa mẫu đối chứng

(không phơi nhiễm với DDT) và mẫu thực nghiệm (có phơi nhiễm với DDT). Các mẫu trong nghiên cứu này được quan sát dưới kính (TEM) JEOL 1010 (JEOL - Nhật Bản) tại Phòng thí nghiệm kính hiển vi điện tử, Viện vệ sinh Dịch Tễ trung ương.

ii) Phương pháp Real-time PCR xác định mức độ biểu hiện gen trong phôi và gan cá Medaka.

Ảnh hưởng của hóa chất BVTV DDT lên hệ gen của cá Medaka trong bài báo này được kiểm tra bằng phương pháp phân tích real-time PCR (LightCycler®96 System- Roche Life Science). Mẫu sau khi phơi nhiễm với DDT lần lượt được phân tách ARN (bằng kit phiên mã ngược của Toyobo, Nhật Bản), tổng hợp cDNA (bằng Sensifast cDNA synthesis kit) và chạy real-time PCR. Quy trình cụ thể được trình bày trong Hình 1 và được thực hiện tại Trung tâm sinh học Tp. HCM.

Để phân tích biểu hiện gen bằng real-time PCR, 4 gen với các cặp mồi xuôi và mồi ngược (Bảng 1) đã được lựa chọn để phân tích sự phiên mã do chúng đại diện cho sự tăng trưởng và biệt hóa tế bào, quy định vòng đời và sự chết của tế bào [14]. Trình tự mã hóa của 4 gen đã chọn (Bảng 1) được lấy từ cơ sở dữ liệu GenBank (PubMed-NCBI) và HGNC (Ensembl, EMBL-EBI). Trình tự của mỗi cặp mồi mã hóa được trình bày theo công bố của Barjhoux và cộng sự [14]. Đối với mỗi gen, các cặp mồi cụ thể được xác định bằng phần mềm LightCycler probe design software (v1.0, Roche, Meylan, France) và được đề cập trong Bảng 1. Cá và phôi cá Medaka được phơi nhiễm với hóa chất BVTV DDT ở nồng độ 1500 và 1700 $\mu\text{g/L}$ trong vòng 24 giờ mà không cho ăn [15]. Sau khi phơi nhiễm, cá và phôi cá sẽ được lưu trữ ở điều kiện $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ cho đến khi chạy Real-time PCR. Phân tích biểu hiện gen được thực hiện trên các mẫu phôi và cá Medaka trưởng thành theo quy trình thời gian và nhiệt độ như Bảng 2.

2.4. Phương pháp thống kê xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ba lần. Số liệu thu nhận sẽ được xử lý ANOVA, Tukey's test và Distribution bằng phần mềm JMP và Sigmaplot 12,5.

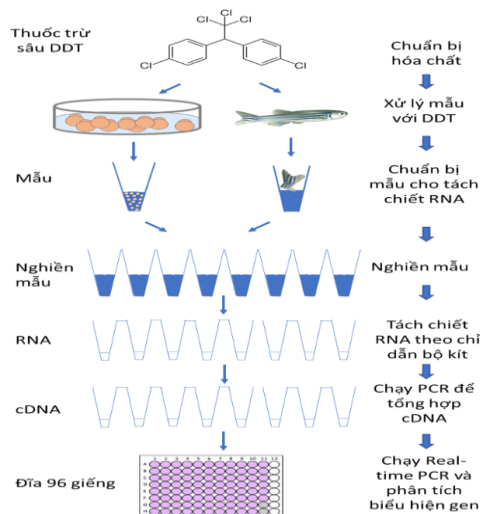
Bảng 1. Các cặp mồi chạy real-time PCR

Gen đích	Mã số cặp (EMBL hoặc GenBank)	Trình tự cặp mồi (5' – 3')	Chức năng
<i>β-actin</i>	S74868	GTGACCCACACAGTGCC ^a GCGACGTAGCACAGCTTC ^b	Gen đối chứng
<i>p53</i>	AF212997	TCTGGCACTGCAAAGTCTGT ^a CCTCGTTTTGGTGGTGGG ^b	Điều hòa chu kỳ tế bào
<i>rara1</i>	EF546452	GCATCATCAAGACGGTGGAG ^a GGCGAAAGCGAAAACCAGG ^b	Điều hòa sự tăng trưởng và biệt hóa của tế bào
<i>wnt</i>	AJ243208	CCGCTTTGACGGAGCAT ^a TTGAACCCACGCCACAGC ^b	Tăng sinh tế bào và sinh sản

^a: mồi xuôi ^b: mồi ngược

Bảng 2. Cài đặt quy trình chạy phản ứng Real-time PCR

Thứ tự	Số chu kỳ lặp lại	Nhiệt độ	Thời gian
Bước 1	1X	95 °C	5 phút
Bước 2	40X	94 °C	30 giây
		50 °C	30 giây
		72 °C	30 giây
Bước 3	1X	72 °C	5 phút
Bước 4	81X	65 °C → 95 °C	30 giây



Hình 1. Quy trình tóm tắt chuẩn bị mẫu và chạy real-time PCR.

3. Kết quả và thảo luận

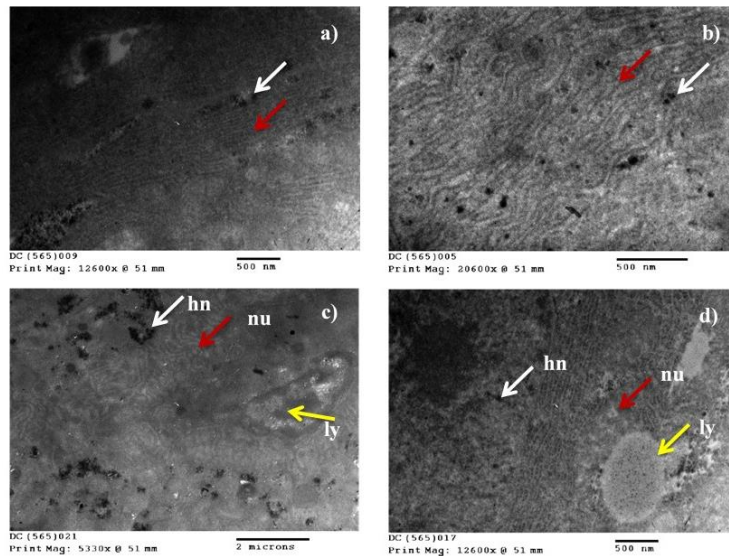
3.1. Ảnh hưởng của Dichlorodiphenyl-trichloroethane đến cấu trúc hình thái gan cá Medaka

Gan là một cơ quan lớn có vai trò rất quan trọng với quá trình trao đổi chất cũng như hệ

thống miễn dịch của cơ thể. Vì vậy, trong nghiên cứu này gan được lựa chọn là bào quan để quan sát sự thay đổi về cấu trúc, hình thái khi cho cá Medaka phơi nhiễm với hóa chất BVTV DDT ở nồng độ 1 µg/L sau 24 giờ. Kết quả chụp TEM mẫu gan cá trước và sau khi phơi nhiễm với DDT thể hiện trong Hình 2 dưới

đây. Ảnh TEM gan cá Medaka trong mẫu đối chứng ở Hình 2 cho thấy, gan có cấu trúc và hình thái điển hình: tĩnh mạch cửa, động mạch gan và ống mật nằm độc lập, các tế bào gan được sắp xếp trong các tấm ngăn cách bởi một lưới hình sin (Hình 2 b, mũi tên đỏ), các hạt lipid, nhân tế bào gan và hạt nhân cũng như các hạt lysosome được nhìn thấy rõ ràng (Hình 2 a, b, c, d mũi tên trắng).

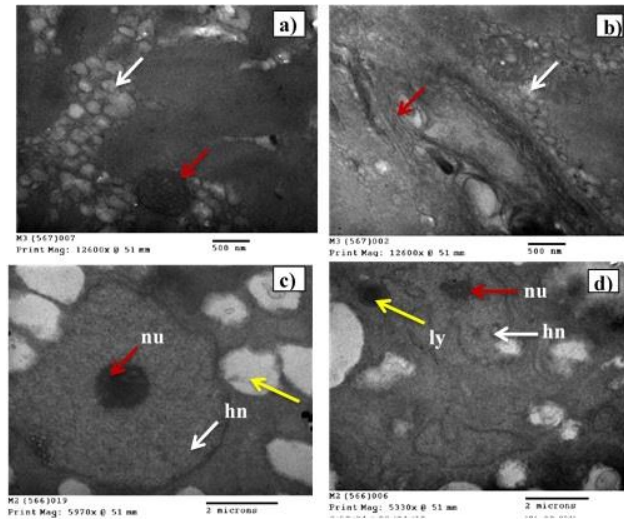
Phân bố của các lipid có thể được nhìn thấy trên toàn bộ gan, tỷ lệ hạt nhân cao so với tế bào chất. Ngược lại, ảnh TEM trong mẫu thử nghiệm ở Hình 3 cho thấy rằng cấu tạo tế bào gan bị ảnh hưởng nghiêm trọng dưới tác động của DDT. Nhân tế bào méo mó, xuất hiện nhiều hạt lipid rộng, các tấm lưới hình sin bị co cụm, đứt đoạn; lysosome không còn nguyên vẹn, xuất hiện nhiều bong bóng thoái hóa.



Hình 2. Cấu trúc tế bào gan cá Medaka đối chứng (không phơi nhiễm với DDT 1 $\mu\text{g/L}$) sau 24 giờ; nu - hạt nhân; hn - nhân hepatocytes; ly - lysosome.

Kết quả chụp TEM gan cá Medaka tương tự như một số dữ liệu đã công bố trước đây [16-19]. Mức độ ảnh hưởng bởi phơi nhiễm với DDT thay đổi đa dạng theo loài và theo vị trí lấy mẫu. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của các hoạt chất hóa chất BTV OCPs và OPPs trong mô và gan của bốn loài cá (*Lateolabrax japonicus*, *Pagrasomus major*, *Miichthys miiuy* và *Epinephalus awoara*) và vẹm xanh *Perna viridis* nuôi ở Hạ Môn, Trung Quốc [16] cho thấy, DDT tích tụ trong gan của tất cả các mẫu cá từ 0,15 đến 2,2 $\mu\text{g/g}$ và trong mô vẹm là 0,05 đến 0,15 $\mu\text{g/g}$ trọng lượng ướt. Ngược lại, trong mô cơ hàm lượng DDT lại thấp hơn và đồng phân p,p'-DDT chiếm tỷ lệ cao nhất (cá 30-45%;

vẹm 40-65%) tùy thuộc vào vị trí lấy lấy mẫu là ngay bên cảng hay cách xa bờ. Sự biến đổi mô gan trong 4 loài cá khảo sát đã cho thấy DDT nguyên nhân chính phá hủy tế bào gan của các loài cá, gây tử vong cho các cá thể trong loài [16]. Hơn nữa, DDT có khả năng chuyển hóa thành DDE thông qua việc loại bỏ hydrochloride. DDE ưa béo hơn DDT và có khả năng tích tụ nhiều trong máu, mỡ của mô cá, gây độc ở gan, não, thận, mô - tuyến thượng thận, hệ thần kinh của cá [16, 17]. Bên cạnh đó, đặc tính sinh học của loài cá thử nghiệm bao gồm kích thước, trọng lượng, tuổi, giới tính và chu kỳ vòng đời cũng ảnh hưởng đến khả năng gây độc tính [18, 19].



Hình 3. Cấu trúc tế bào gan cá Medaka thử nghiệm (phơi nhiễm với DDT 1 µg/L) sau 24 giờ; nu - hạt nhân; hn - nhân hepatocytes; ly - lysosome.

Sự khác biệt giới tính (cá cái lớn hơn cá đực), sự lão hóa và hormone trong cá Medaka có liên quan chặt chẽ đến khả năng sinh dục và tiêu hóa của cá Medaka [19]. Sun và cộng sự [19] đã khảo sát sự phát triển của tuyến sinh dục và tiêu hóa ở cá Medaka *O. latipes* đực (nữ sau 20 ngày) khi được phơi nhiễm với đồng phân DDT là p,p'-DDE từ 1-100 µg/L trong hai tháng. Kết quả cho thấy ở mẫu thực nghiệm chỉ số gan (HSI) và thụ thể estrogen (ER-alpha) trong gan cá đực tăng đáng kể so với cá cái và so với mẫu đối chứng, điều này làm gia tăng tổn thương trong gan cá Medaka. o, p'-DDT cũng tích tụ trong gan cá Medaka đực cao hơn p, p'-DDE, tỷ lệ vitellogenin trong gan tăng đột biến và làm cản trở quá trình sinh sản của cá [20]. David (2008) và Matsumoto (2010) cũng chỉ ra rằng gan cá Medaka không chỉ nhạy cảm và biến đổi bởi hóa chất BVTV OCPs mà còn bị tác động bởi một số độc tố khác như chất béo hoặc chất độc đường mật [21, 22]. Chế độ ăn nhiều chất béo làm tăng lipid máu và tăng đường huyết đã ghi nhận ảnh TEM bào quan gan cá Medaka xuất hiện nhiều bong bóng thoái hóa [21] hay khi phơi nhiễm với chất độc đường mật a-naphthylisothiocyanate (ANIT) trong 6 giờ đã làm sưng tế bào biểu mô tuyến

mật, sau 96 giờ làm đổi màu túi mật, biến đổi nghiêm trọng tế bào gan của cá Medaka [22].

3.2. Ảnh hưởng của Dichlorodiphenyl-trichloroethane đến gen cá Medaka

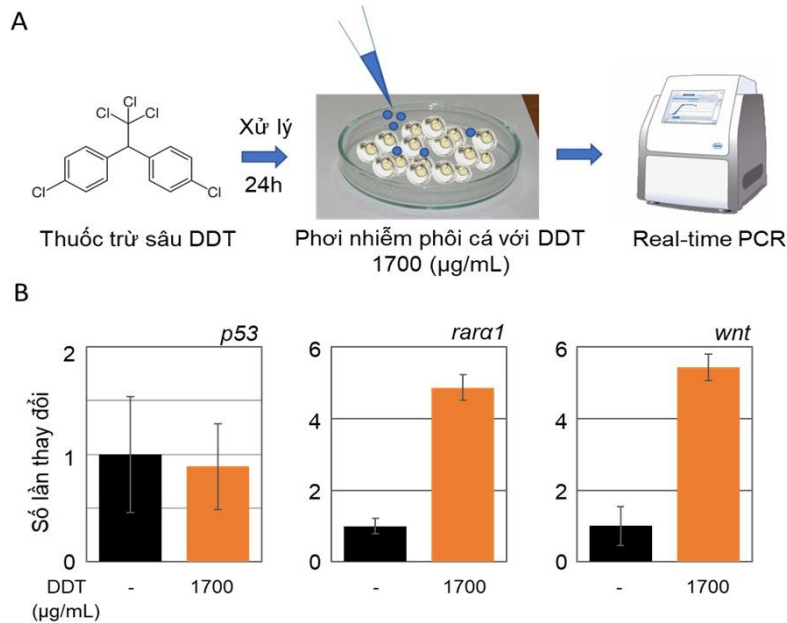
Để có kết quả chính xác về độc tính của DDT đối với cá Medaka, phân tích Real-time PCR xác định những thay đổi về mức độ sinh học phân tử của gen cá trước và sau khi phơi nhiễm với DDT đã được khảo sát. Phôi và cá Medaka trưởng thành được phơi nhiễm với hóa chất BVTV DDT ở nồng độ 1500 và 1700 µg/L trong vòng 24 giờ mà không cho ăn. Kết quả chạy Real-time PCR thể hiện trong các Hình 4, 5 và 6 dưới đây.

Các kết quả về định lượng mức độ biểu hiện gen (so sánh delta-Cq) được thu thập, và mức độ biểu hiện gen được chuẩn hóa đến gen đối chứng β -actin. Theo kết quả của Hình 4 và 5 cho thấy, phân tích Real-time PCR đã hoàn thiện. Sự biểu hiện các gen *rara1* và *wnt* của cá Medaka sau khi phơi nhiễm với DDT 1700 µg/L trong 24 giờ (Hình 4 A) so với mẫu đối chứng (Sự biểu hiện của gen là 1) đã biến đổi mạnh mẽ (lần lượt là 4,9 và 5,4 lần). Sự biểu hiện của gen *p53* có xu hướng bị ức chế

sau khi tiếp xúc với DDT ở phôi cá Medaka (0,9 lần) (Hình 4 B).

Kết quả này chứng minh rằng nồng độ 1700 µg/L DDT có thể ảnh hưởng đến sự phát triển, biệt hóa và tăng sinh của tế bào ở giai đoạn phôi của cá Medaka. Ngoài ra, khác biệt

về sự hình thành và phát triển của tế bào có thể gây rối loạn hình dạng và điều kiện phát triển bình thường của cá Medaka ở giai đoạn ấu trùng và trưởng thành. Do đó, theo dõi ảnh hưởng của DDT ở các giai đoạn sau của phôi cá là cần thiết.



Hình 4. Phân tích biểu hiện gen trên phôi trứng 8 ngày tuổi bằng phương pháp real-time PCR: A) Cách xử lý phôi trứng 8 ngày tuổi sau thụ tinh với hóa chất BVTV DDT để thực hiện chạy real-time PCR; B) Kết quả phân tích biểu hiện của 3 gen *p53*, *rara1* và *wnt* trên phôi cá medaka sau khi phơi nhiễm với 1700 µg/L DDT.

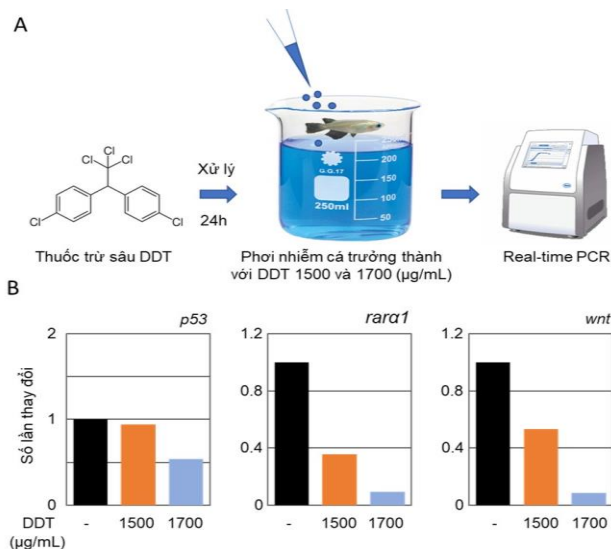
Để đánh giá liệu DDT có ảnh hưởng đến các gen được phân tích ở giai đoạn phôi và giai đoạn trưởng thành hay không, cá Medaka trưởng thành được phơi nhiễm với 1500 và 1700 µg/L DDT trong 24 giờ (Hình 5 A). Kết quả phân tích ở Hình 5B cho thấy, sự biểu hiện của cả 3 gen *p53*, *rara1* và *wnt* đều giảm theo nồng độ được phơi nhiễm. Kết quả này hoàn toàn trái ngược với giai đoạn phôi, sự biểu hiện cả hai gen *rara1* và *wnt* đều giảm đáng kể ở các mẫu thử nghiệm phơi nhiễm với DDT so với mẫu đối chứng không phơi nhiễm với DDT. Cụ thể, đối với gen *p53*, sự biểu hiện của gen này ở cá Medaka trưởng thành giảm lần lượt là 0,9 và 0,5 lần sau khi tiếp xúc với DDT ở nồng độ 1500 và 1700 µg/L so với mẫu đối chứng

(1 lần). Tương tự, sự biểu hiện của gen *rara1* và *wnt* cũng giảm so với mẫu đối chứng sau khi tiếp xúc với DDT ở nồng độ 1500 và 1700 µg/L lần lượt là 0,36 và 0,09; 0,53 và 0,09 lần. Điều này cho thấy sự ảnh hưởng của gen biểu hiện phụ thuộc vào các giai đoạn phát triển của tế bào cũng như liều lượng của hóa chất được phơi nhiễm [13]. Ngoài ra sự biệt hóa cũng như sự phát triển và tăng sinh của tế bào ở giai đoạn phôi và trưởng thành khác nhau cũng ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen của tế bào [23].

DDT là một chất độc tiếp xúc, làm tê liệt và ảnh hưởng đến hệ thần kinh, nhưng có sự khác biệt lớn về độ nhạy cảm của các loài cá khác nhau đối với hóa chất này [24, 25]. Cá là sinh vật có cơ chế điều hòa thẩm thấu ion khá tốt và

do đó có thể giữ một thành phần tương đối ổn định của các ion vô cơ trong cơ thể của chúng, ngay cả khi điều kiện môi trường xung quanh thay đổi [26]. Nhiều quá trình sinh lý như chức năng cơ và thần kinh rất nhạy cảm với sự thay

đổi trong thành phần ion tương đối của các chất trong cơ thể. Do đó, sự thẩm thấu ion bị xáo trộn có thể làm giảm nghiêm trọng khả năng của sinh vật để duy trì các chức năng quan trọng để tồn tại trong tự nhiên.



Hình 5. Phân tích biểu hiện gen trên cá 03 tháng tuổi bằng phương pháp Real-time PCR. A) Cách xử lý cá medaka trưởng thành (3 tháng tuổi) với hóa chất BTVT DDT để thực hiện chạy Real-time PCR; B) Kết quả phân tích biểu hiện của 3 gen *p53*, *rara1* và *wnt* trên phôi cá medaka sau khi phơi nhiễm với 1500 và 1700 µg/L DDT.

Các chất gây ô nhiễm môi trường khác nhau, như một số hydrocarbon clor hóa và kim loại nặng, đã được Haux và cộng sự [25] chứng minh là có ảnh hưởng đến sự cân bằng ion vô cơ ở động vật thủy sản. DDT gây ra sự giảm đáng kể nồng độ clorua và magiê, cho thấy khả năng suy yếu để duy trì cân bằng nội môi ion và gây ra sự giảm nồng độ trong huyết tương của clorua và magiê [15]. Mặt khác, thói quen chăm sóc, khả năng tiêu hóa, lượng thức ăn, tính chất hóa lý của nước, tốc độ trao đổi chất của động vật và độc tính của các chất ô nhiễm cũng ảnh hưởng không nhỏ đến khả năng chống chịu của sinh vật trong môi trường có chứa độc tố [27, 28].

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã đánh giá độc tính của DDT đến quá trình biểu hiện của ba gen là *p53*,

rara1 và *wnt* trong phôi và gan cá Medaka

O. latipes bằng các kỹ thuật phân tích TEM, real-time PCR. Nghiên cứu chỉ ra rằng biểu hiện của gen phụ thuộc vào các giai đoạn phát triển của tế bào cũng như liều lượng của hóa chất phơi nhiễm. Gan cá phơi nhiễm với 1 µg/L DDT có nhân tế bào gan méo mó, xuất hiện nhiều hạt lipid rỗng, các tấm lưới hình sin bị co cụm, đứt đoạn; lysosome không còn nguyên vẹn, xuất hiện nhiều bong bóng thoái hóa. Phân tích real-time PCR đã ghi nhận cả ba gen *p53*, *rara1* và *wnt* ở phôi cá đã bị ức chế với giá trị là lần lượt là 0,9; 4,9 và 5,4 lần so với mẫu đối chứng (1 lần) khi phơi nhiễm với 1700 µg/L DDT. Kết quả real-time PCR của ba gen ở cá trưởng thành thấp hơn so với phôi cá với giá trị ghi nhận là 0,9 và 0,5; 0,36 và 0,09; 0,53 và 0,09 lần sau khi phơi nhiễm với 1500 và 1700 µg/L DDT.

Tài liệu tham khảo

- [1] C. Tesar, POPs: What they are, How they are Used; How They are Transported, North, Perspect, Vol. 26, 2000, pp. 1-20.
- [2] D. Donaldson, Pesticide's Industry Sales and Usage 1998-1999 Market Estimates, US Environmental Protection Agency, Washington (DC): Available from: <http://www.epa.gov/oppbead/pesticides/99pestsales/market-estimates.pdf/>, 2002 (accessed on: May 10th, 2021).
- [3] F. Gao, J. Jia, X. Wand, Occurrence and Ordination of Dichlorodiphenyltrichloroethane and Hexachlorocyclohexane in Agricultural Soils from Guangzhou, China, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, Vol. 54, 2008, pp. 155-166.
- [4] IARC, DDT, Lindane, and 2,4-D", IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization, Vol. 113, 2018.
- [5] R. M. Chinelo Chukwumalume, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Organochlorine Pesticide Residues in Selected Marine Fish Species along the Coast of South Africa, Stellenbosch University Press, 2016.
- [6] N. X. Tong, T. T. T. Huong, M. Huong, D. T. Thuy, N. H. T. Vy, The Impact of o, p'- DDT Pesticide Toxicity on the Growth of Medaka Fish Embryo *Oryzias latipes*, Vietnam Journal of Marine Science and Technology, Vol. 20, No. 1, 2020, pp. 73-81.
- [7] T. D. Long, V. T. Thu, T. T. Thuy, Zebrafish and Medaka Fish as Models for Research on Human Diseases, The Conference of Youth Science and Technology in Medicine and Pharmacy 2th, 2015.
- [8] K. Gormley, K. Teather, Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) in Response to Short-term Exposure to Endosulfan, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 54, No. 3, 2003, pp. 330-338.
- [9] S. Bony, I. Gaillard, A. Devaux, Genotoxicity Assessment of Two Vineyard Pesticides in Zebrafish, International Journal of Environmental and Analytical Chemistry, Vol. 90, No. 3+6, 2010, pp. 421-428.
- [10] F. Akcha, C. Spagnol, J. Rouxel, Genotoxicity of Diuron and Glyphosate in Oyster Spermatozoa and Embryos, Aquatic Toxicology, Vol. 106-107, 2012, pp. 104-113.
- [11] R. Bate, T. Richar, DDT Saves Lives in Fight Against Malaria, Advancing Liberty-From the Economy to Ecology, 2006.
- [12] A. Viarengo, D. Lowe, C. Bolognesi, E. Fabbri, A. Koehler, The Use of Biomarkers in Biomonitoring: A 2-tier Approach Assessing the Level of Pollutant-Induced Stress Syndrome in Sentinel Organisms, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, Vol. 146, No. 3, 2007, pp. 281-300.
- [13] Y. Fuse, V. T. Nguyen, M. Kobayashi, Nrf2-Dependent Protection Against Acute Sodium Arsenite Toxicity in Zebrafish, Toxicol Appl Pharmacol, Vol. 305, 2016, pp. 136-142.
- [14] I. Barjhoux, J. Cachot, P. Gonzalez, Transcriptional Responses and Embryotoxic Effects Induced by Pyrene and mMthylpyrene in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Early Life Stages Exposed to Spiked Sediments, Environ Sci Pollut Res, Vol. 21, 2014, pp. 13850-13866.
- [15] D. W. Klumpp, C. Humphrey, H. Huasheng, F. Tao, Toxic Contaminants and Their Biological Effects in Coastal Waters of Xiamen, China. II. Biomarkers and Embryo Malformation Rates as Indicators of Pollution Stress in Fish, Marine Pollution Bulletin, Vol. 44, 2002, pp. 752-760.
- [16] T. Narahashi, Neurophysiological Effects of Insecticides, in Handbook of Pesticide Toxicology, 2010, pp. 799-816.
- [17] G. N. Sreeya, R. Radha, C. N. Radhakrishnan, Studies on Acute Toxicity to Pesticide Stress in a Freshwater Fish *Cirrhinus mrigala*, International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, Vol. 5, No. 4, 2017, pp. 355-358.
- [18] Z. Zhang, J. Hu, Effects of p, p'-DDE Exposure on Gonadal Development and Gene Expression in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*), J Environ Sci (China), Vol. 20, No. 3, 2008, pp. 347-352.
- [19] J. Sun, C. Wang, H. Peng, G. Zheng, S. Zhang, J. Hu, p, p' DDE Induces Gonadal Intersex in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at Environmentally Relevant Concentrations: Comparison with o, p' DDT, Environmental Science and Technology, Vol. 50, No. 1, 2015, pp. 462-469.
- [20] C. V. David, S. W. Kullman, D. L. Howarth, R. C. Hardman, D. E. Hinton, Protective Response of the Ah Receptor to ANIT-Induced Biliary Epithelial Cell Toxicity in See-Through Medaka, Toxicological Sciences, Vol. 102, No. 2, 2008, pp. 262-277.
- [21] T. Matsumoto, S. Terai, T. Oishi, S. Kuwashiro, K. Fujisawa, N. Yamamoto, Y. Fujita, Y. Hamamoto, M. Furutani-Seiki, H. Nishina, I. Sakaida, Medaka as a Model for Human Nonalcoholic Steatohepatitis, Disease Models and Mechanisms, Vol. 3, 2010, pp. 431-440.

- [22] M. Grinstein, H. L. Dingwall, L. D. O'Connor, A Distinct Transition from Cell Growth to Physiological Homeostasis in the Tendon, *Elife*, Vol. 8, 2019, pp. 48689.
- [23] E. W. Surber, Effects of DDT on Fish, *J. Wildl Manage*, Vol. 10, 1946, pp. 183.
- [24] J. L. Gerberding, Toxicological Profile for DDT, DDE and DDD, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, USA Press, 2002.
- [25] C. Haux, Å. Larsson, Effects of DDT on Blood Plasma Electrolytes in the Flounder, *Platichthys Flesus L*, in Hypotonic Brackish Water, *Ambio*, Vol. 8, 2002, pp. 171-173.
- [26] M. Uchida, H. Nakamura, Y. Kagami, T. Kusano, K. Arizono, Estrogenic Effects of o, p'-DDT Exposure in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*), *The Journal of Toxicological Sciences*, Vol. 35, No. 4, 2010, pp. 605-608.
- [27] B. P. Prasanth, Y. Shibata, R. Horiguchi, Exposure to Diethylstilbestrol During Embryonic and Larval Stages of Medaka Fish (*Oryzias latipes*) Leads to Sex Reversal in Genetic Males and Reduced Gonad Weight in Genetic Females, *Endocrinology*, Vol. 152, No. 2, 2011, pp. 707-717.