

SỰ PHÁT TRIỂN XƯƠNG CỦA CÁ MEDAKA (*ORYZIAS LATIPES*) IPhạm Thị Thanh¹, Phạm Văn Cường¹, Trần Đức Long¹, Tô Thanh Thúy^{1*}

TÓM TẮT: *Medaka*, *Oryzias latipes*, một loài cá xương nước ngọt nhỏ có nguồn gốc từ Nhật Bản và các nước Đông Nam Á hiện đang được sử dụng nhiều làm mô hình nghiên cứu y sinh học, trong đó có nghiên cứu về xương và các bệnh xương. Để có cơ sở dữ liệu cho các nghiên cứu về xương, chúng tôi đã phân tích và mô tả sự phát triển xương liên tục từ giai đoạn phôi đến khi cá 2 tháng tuổi. Xương được nhuộm bằng thuốc nhuộm alizarin red và thuốc nhuộm huỳnh quang, sau đó được chụp ảnh hiển vi để phân tích. Kết quả cho thấy xương cá medaka xuất hiện từ những giai đoạn sớm của sự phát triển phôi, bắt đầu bằng sự hình thành các xương đầu, sau đó đến xương cột sống và các xương vây. Trong bài báo phần một này chúng tôi trình bày quá trình phát triển xương từ giai đoạn phôi đến khi cá 10 ngày tuổi. Xương lỗ tai (otoliths - ot) xuất hiện đầu tiên ở phần đầu cá vào ngày tuổi thứ 3 (3 ngày sau khi trứng được thụ tinh). Ở các ngày tiếp theo của sự phát triển, các cấu trúc xương đầu khác dần dần được hình thành. Cột sống của medaka có khoảng 30 đốt sống, được hình thành từ ngày thứ 6 với 5-6 đốt sống đã được khoáng hóa bắt đầu từ đốt thứ 2, đốt thứ nhất hình thành vào ngày thứ 7. Xương vây đuôi xuất hiện khi cá 9 ngày tuổi, các vây lưng, vây ngực, vây hậu môn chưa thấy xuất hiện ở giai đoạn này.

Từ khóa: medaka, phát triển xương, khoáng hóa xương, nhuộm alizarin red.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Medaka, *Oryzias latipes*, một trong những loài cá cảnh yêu thích ở Nhật Bản, là loài cá xương, có kích thước nhỏ, sống tự nhiên ở những vùng nước ngọt của Châu Á và Đông Nam Á, được Jordan and Snyder miêu tả vào năm 1906 [1, 2]. Những công bố của Aida năm 1921 về medaka với nhiều ưu điểm như: dễ nuôi, dễ chăm sóc, kích thước bộ gen nhỏ, thời gian trưởng thành sinh dục ngắn, thụ tinh ngoài, phôi trong suốt, ít tế bào sắc tố,... đã làm nó nhanh chóng trở thành động vật mô hình trong các nghiên cứu di truyền học, sinh học tiến hóa, sinh học phát triển, và gần đây nhất là mô hình cho rất nhiều loại bệnh trên người [1, 3, 4]. Khoảng hơn

chục năm lại đây, medaka cũng là mô hình ưa thích cho những nghiên cứu về xương và các bệnh về xương [4-8]. Việc tạo ra cá đột biến và cá chuyển gen có thể được thực hiện rất dễ dàng nên nhiều dòng cá medaka chuyển gen được tạo ra khẳng định được sự tương đồng đáng kể trong quá trình phát triển và chuyển hóa của mô xương giữa cá và người, nhất là ở mức độ phân tử và tế bào [4, 8]. Do vậy nghiên cứu trên cá đã giúp mang lại cái nhìn mới hơn về sinh học phân tử, sinh học tế bào của sự hình thành, phát triển và tái tạo và cơ chế bệnh sinh của xương [4, 5, 9]. Trong các nghiên cứu đã công bố, sự phát triển xương cá medaka ở một số giai đoạn phát triển đã được phân tích. Để có cơ sở dữ liệu đầy đủ hơn cho các nghiên cứu về xương tiếp theo, chúng tôi mô tả và phân tích sự phát triển xương liên tục từ giai đoạn phôi đến khi cá 2 tháng tuổi thông qua nhuộm các cấu trúc xương đã khoáng hóa bằng thuốc nhuộm alizarin red và thuốc nhuộm huỳnh quang là các chất có ái lực cao với canxi làm cho

¹Trường đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

* Tác giả chịu trách nhiệm chính:

Tô Thanh Thúy

Email: tothanhtsuy_sinh@vnu.edu.vn

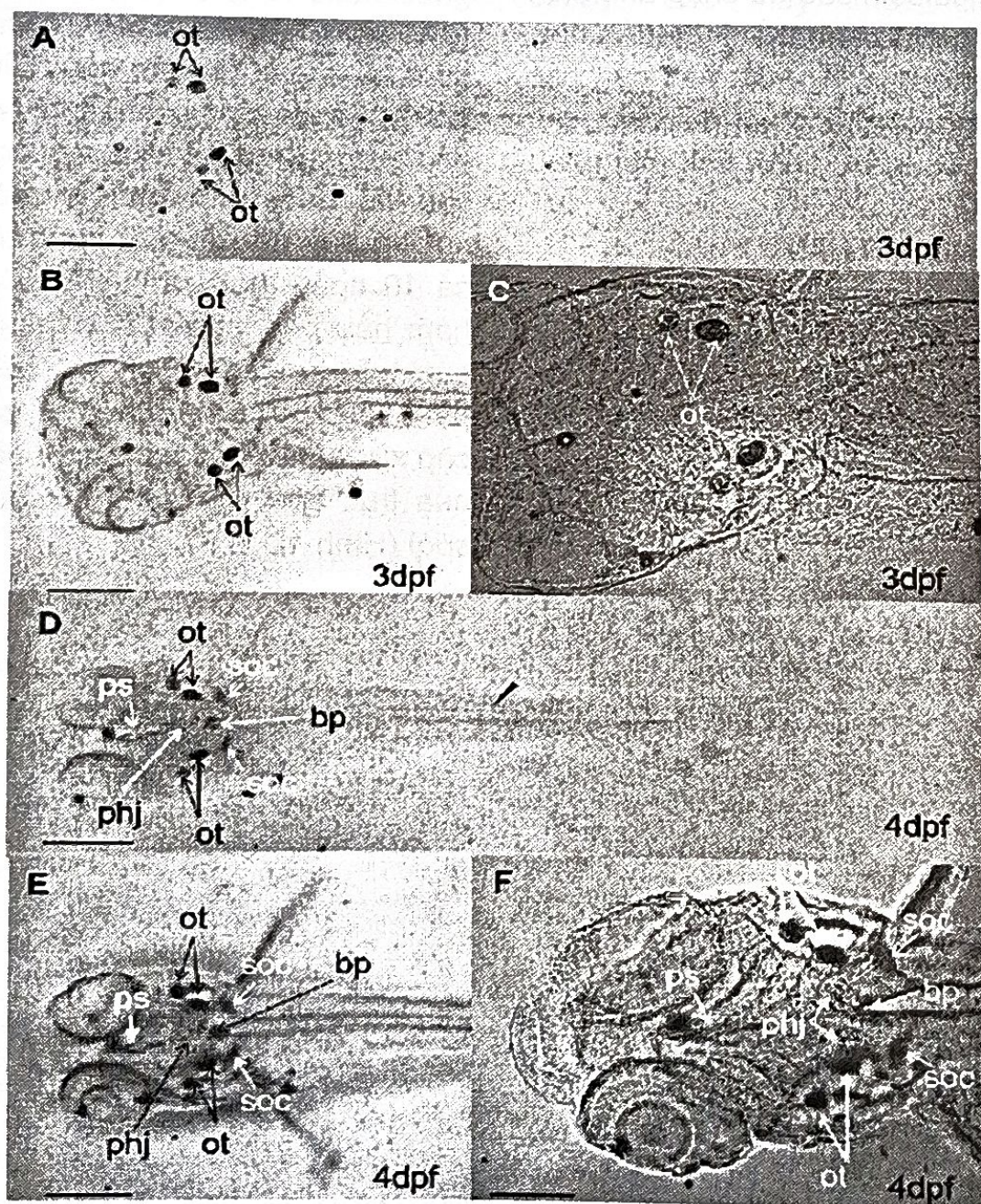
Ngày nhận bài: 10/9/2015

Ngày nhận bài phản biện: 24/9/2015

Ngày chấp nhận đăng: 29/9/2015

mô xương phát triển mới được khoáng hóa chứa canxi bắt màu. Cá nhuộm xương được chụp và phân tích hình ảnh hiển vi. Vì khuôn khổ của bài báo, trong bài này chúng tôi trình bày sự phát triển xương từ giai đoạn phôi đến khi cá 10 ngày tuổi là

giai đoạn mà các cấu trúc xương cơ bản của phần đầu, cột sống và đuôi cá bắt đầu hình thành. Quá trình phát triển xương từ 15 ngày tuổi đến khi cá 2 tháng tuổi sẽ được chúng tôi trình bày trong bài báo tiếp theo.



Hình 1. Sự phát triển của xương cá medaka ở 3 và 4 ngày tuổi

Phôi cá 3 ngày tuổi (3dpf) chỉ có xương otolith (ot) bắt màu thuốc nhuộm xương alizarin red, ảnh chụp với độ phóng đại 2,5x, scale bar (sb) = 0,48mm (A). Hình ảnh xương đầu cá ở hình A được chụp với độ phóng đại 4x, sb = 0,34 mm (B) và độ phóng đại 10x, sb = 0,13mm (C). Ấu trùng cá 4 ngày tuổi chụp ở độ phóng đại 2,5x có thêm xương bên bướm (paraspheroid-ps), xương trên chẩm (supraoccipital-soc), (basilar plate-bp), xương hàm hầu (pharyngeal jaw-phj), sb = 0,45mm (D); Các xương này được nhìn thấy rõ hơn ở ảnh chụp đầu cá với độ phóng đại 4x, sb=0,32mm (E) và độ phóng đại 10x, sb=0,12mm (F).

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng trong nghiên cứu này là cá medaka chủng đại Cab, được cung cấp từ

Đại học Quốc gia Singapore. Quy trình nuôi và chăm sóc cá đã được chúng tôi trình bày trong bài báo trước [10].

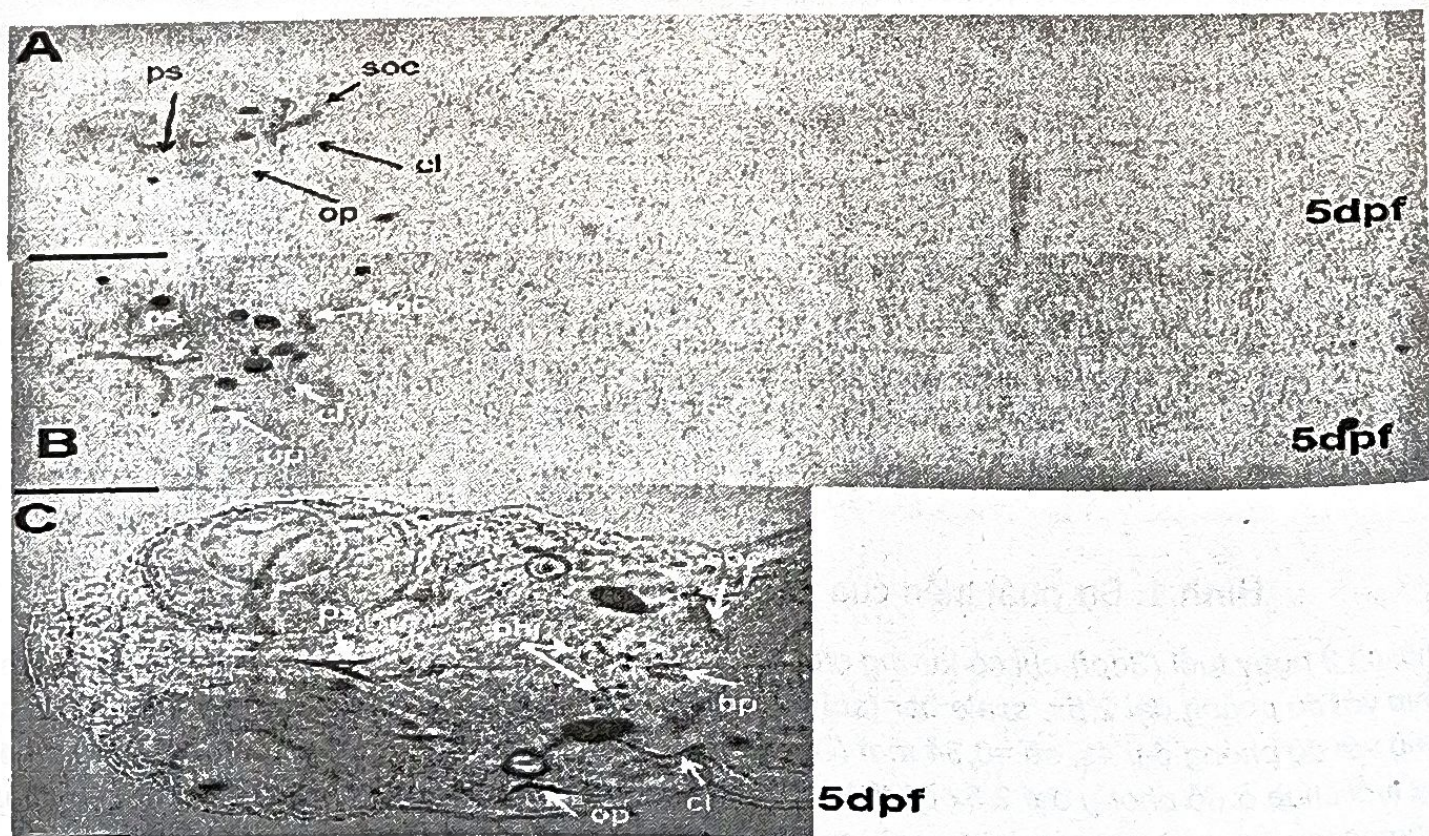
Để phân tích sự phát triển xương cá medaka, chúng tôi nhuộm xương cá bằng thuốc nhuộm alizarin red và thuốc nhuộm huỳnh quang calcein sau đó chụp ảnh hiển vi và phân tích hình ảnh theo qui trình như đã mô tả trước đây [4, 10]. Tên của các cấu trúc xương cá được gọi dựa vào các công trình đã công bố phân tích giải phẫu của cá [5, 11].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Các cấu trúc xương đầu cá hình thành sớm nhất từ lúc cá 3 ngày tuổi

Các cấu trúc xương phần đầu cá medaka hóa xương rất sớm. Ngay từ ngày thứ 3 của sự phát triển phôi (3 ngày sau khi trứng thụ tinh - 3dpf - 3 ngày tuổi) xương lỗ tai (*otoliths* - *ot*) xuất hiện đầu tiên với 2 chấm nhỏ mỗi bên (Hình 1A,B,C). Tiếp đến là xương bên bướm (*paraspheroid-ps*) xuất hiện sớm thứ hai

sau *otoliths* vào lúc cá 3,5 ngày tuổi (dữ liệu không công bố). Đến ngày thứ tư của sự phát triển, xương bên bướm có hình dạng rõ nét hơn với hình thoi đặc trưng (Hình 1D,E,F). Ngoài ra, phần đầu có thêm các xương mới như: xương trên chẩm (*supraoccipital-soc*), *basilar plate* (*bp*), *pharyngeal jaw* (*ph*), các xương này nằm gần nhau ở phần hầu (Hình 1D,E,F). *Basilar plate* được khoáng hóa ở phần gốc gần xương hàm hầu *pharyngeal jaw*, sau đó quá trình khoáng hóa kéo dài xương này tới gần đốt sống thứ nhất khi cá 10 ngày tuổi (Hình 5A). Cung xương hàm hầu *pharyngeal jaw* (*phj*) có một số cấu trúc hình răng nhọn xếp thành lớp, phía sau xương hàm hầu về phía đuôi có cặp xương trên chẩm nằm 2 bên đối xứng qua trục dọc của cơ thể (*supraoccipital-soc*) (Hình 1D,E,F).

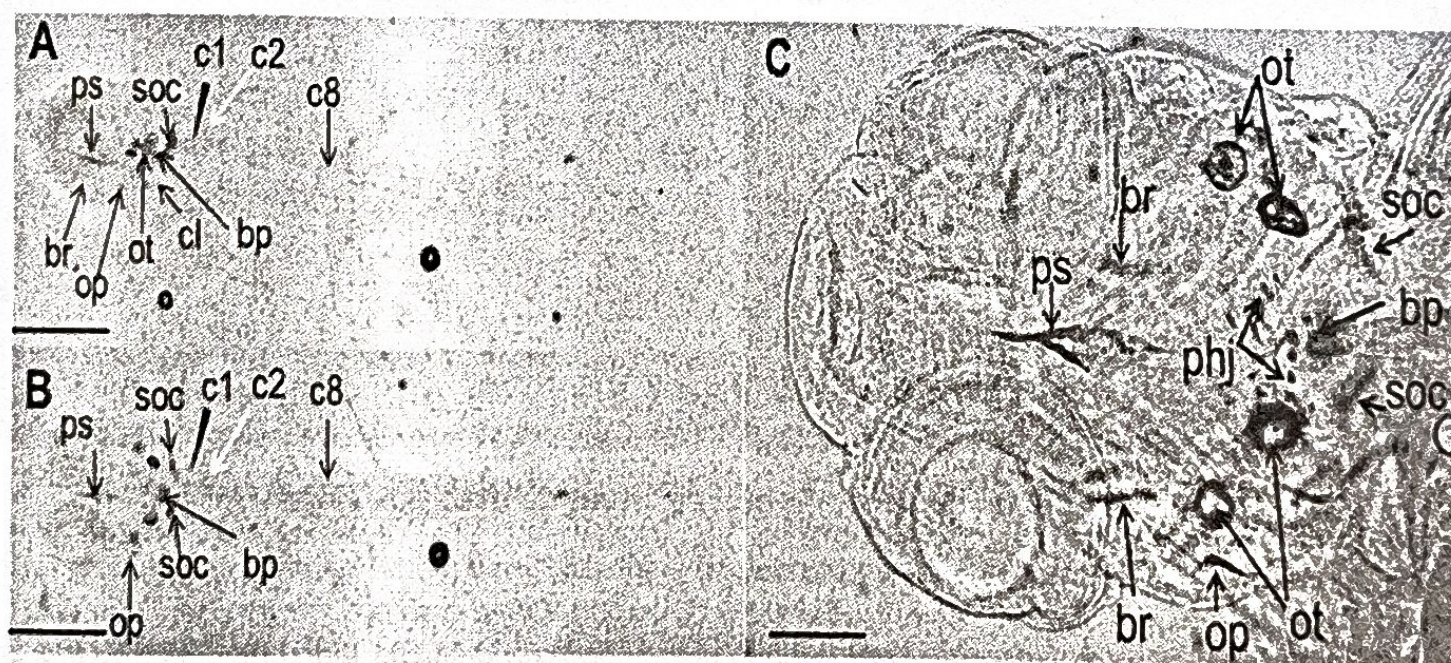


Hình 2. Sự phát triển xương của cá medaka 5 ngày tuổi (5dpf)

Hình chụp mặt nghiêng phôi cá với độ phóng đại 2,5x, sb = 0,36mm (A). Hình chụp mặt bụng phôi cá với độ phóng đại 2,5x, sb = 0,39mm (B). Hình chụp cấu trúc xương đầu cá ở độ phóng đại 10x, sb = 0,12mm (C). *operculum* (*op*), *cleithrum* (*cl*), *pharyngeal jaw* (*phj*), *parasphenoid* (*ps*), *basilar plate* (*bp*).

Khi phôi cá 5 ngày tuổi (5dpf), ngoài các xương đã có tiếp tục phát triển lớn hơn còn xuất hiện thêm các xương mới: xương đỡ nắp mang *cleithrum* (cl) và xương nắp mang *operculum* (op) (Hình 2A,B,C). Ở thời điểm này hai xương này rất khó phân biệt vì chúng có hình dạng gần giống nhau và nằm gần nhau. Tuy nhiên, *cleithrum* thường mảnh và dài hơn, nằm về phía sau so với op, soc và ot (Hình 2A,B,C); Xương *basilar plate* (bp) cũng bắt đầu xuất hiện (Hình 2C).

Khi phôi cá 6 ngày tuổi các xương phần đầu đã xuất hiện ở giai đoạn trước tiếp tục phát triển và lớn dần, chỉ xuất hiện thêm xương *branchiostegal rays* (br) nằm ở phía trước và nằm dưới về phía mặt bụng của xương *operculum* (Hình 3A,B). Lúc này mới chỉ có 1-2 *branchiostegal rays* bắt đầu được khoáng hóa có hình như những tia xương ngắn (Hình 3A,C).



Hình 3. Các cấu trúc xương được khoáng hóa của ấu trùng cá medaka 6 ngày tuổi

Hình chụp mặt bên ấu trùng cá ở độ phóng đại 2,5x, sb = 0,42mm (A). Hình chụp mặt bụng của cá medaka ở độ phóng đại 2,5x, sb = 0,45mm (B). Hình ảnh xương đầu cá chụp ở độ phóng đại 10x, sb = 0,11 mm (C). operculum (op), cleithrum (cl), parasphenoid (ps), branchiostegal rays (br), supraoccipital (soc), basilar plate (bp), pharyngeal jaw (phj), otolith (ot).

Các cấu trúc xương đầu đã có tiếp tục phát triển khi cá đến 7 ngày tuổi (Hình 4A,B). Đến khi cá 10 ngày tuổi phần đầu của cá xuất hiện thêm xương răng miệng (den, Hình 5A,B), *cleithrum* khoáng hóa kéo dài từ mặt lưng đến mặt bụng thành hình vòng cung phía 2 bên mang cá (Hình 5A,B), *branchiostegal rays* cũng được khoáng hóa dài hơn thành các tia xương ở 2 bên phía trước của xương nắp mang (Hình 5A,B). Thời điểm này xuất hiện thêm

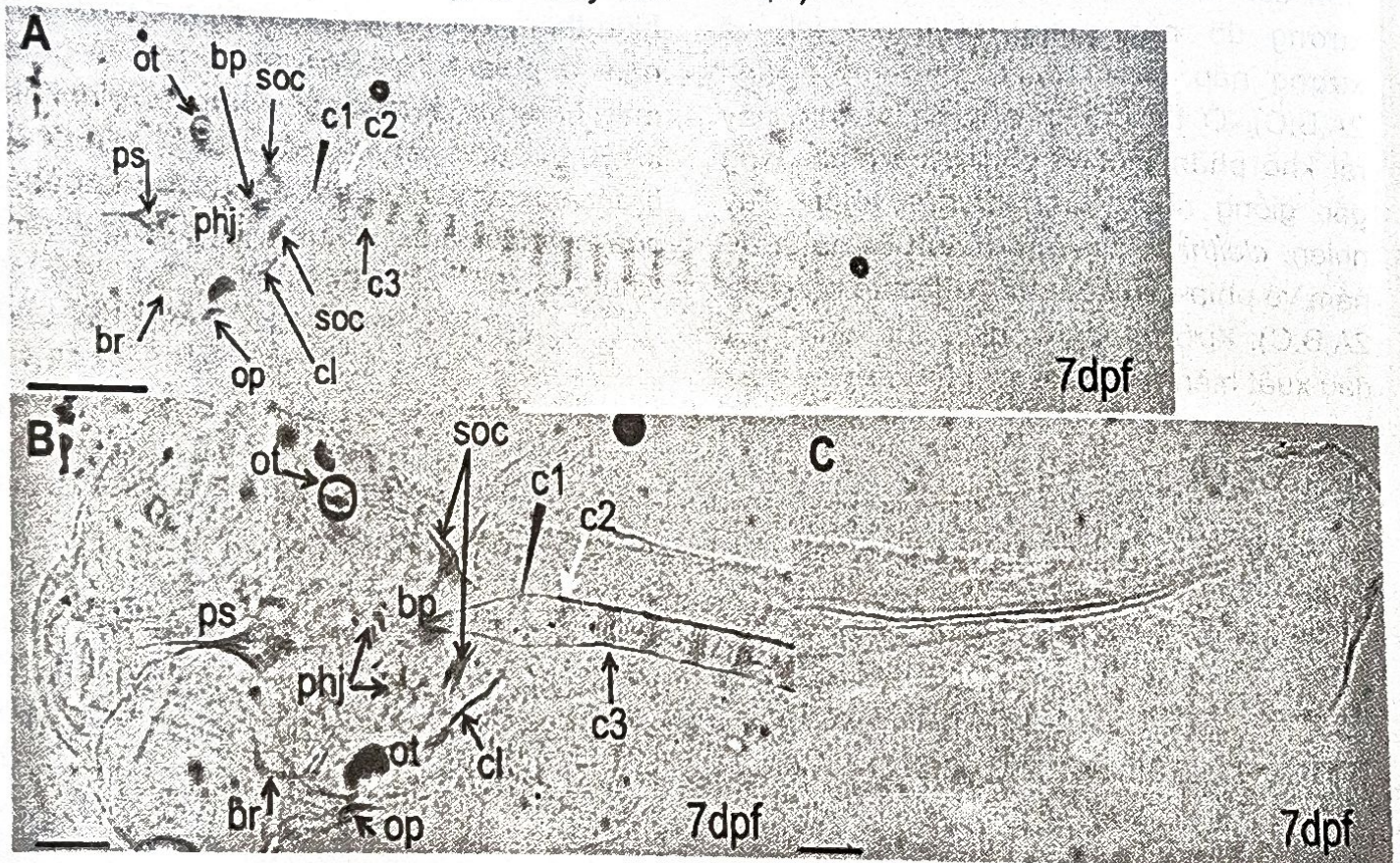
xương *anterior basicranial commissure* (abc).

2. Cột sống của cá được khoáng hóa bắt đầu từ 6 ngày tuổi

Cột sống của medaka xuất hiện trước khi phôi cá nở. Khi cá 6 ngày tuổi, 5-6 đốt sống đầu tiên xuất hiện, với mỗi đốt sống sự khoáng hóa được hình thành từ mặt lưng kéo dài xuống mặt bụng (Hình 3A,B). Điều thú vị là sự hóa xương bắt đầu từ đốt thứ 2 (mũi tên trắng Hình 3A,B). Đến ngày thứ 7, cũng thường là ngày nở đầu

tiên của phôi cá medaka, cột sống có các thân đốt sống được khoáng hóa kéo dài tới đốt thứ 15-17 (Hình 4A), lúc này đốt

sống thứ nhất (c1) mới bắt đầu hóa xương (đầu mũi tên màu đen chỉ c1 Hình 4A,B).



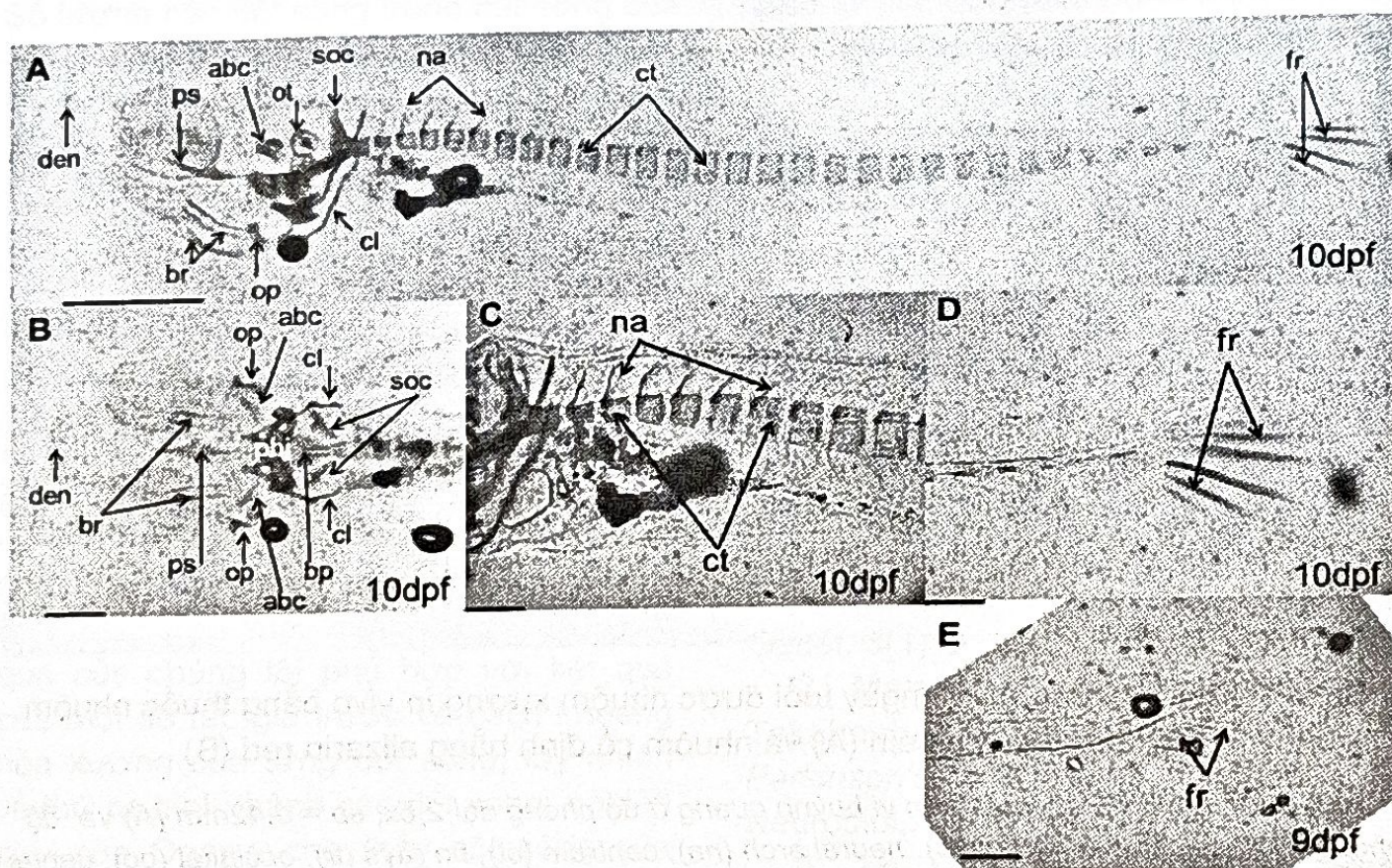
Hình 4. Sự khoáng hóa xương của ấu trùng cá medaka 7 ngày tuổi.

Hình ảnh ấu trùng cá được chụp ở độ phóng đại 2,5x, sb = 0,38mm (A). Hình ảnh phần xương đầu và một phần cột sống của ấu trùng được chụp ở độ phóng đại 10x, sb = 0,14mm (B). Thân đốt sống thứ nhất (c1- đầu mũi tên màu đen) bắt đầu được hóa xương (A,B); thân các đốt sống thứ 2 (c2), thứ 3 (c3) và các đốt sống phần sau đã được khoáng hóa thành hình vòng bao quanh dây sống (A,B). Hình ảnh đuôi cá 7 ngày tuổi ở độ phóng đại 10x, sb = 0,13mm cho thấy chưa có xương nào được khoáng hóa (C). operculum (op), cleithrum (cl), parasphenoid (ps), branchiostegal rays (br), otolith (ot), supraoccipital (soc), basilar plate (bp), pharyngeal jaw (phj).

Khi cá 10 ngày tuổi, hình ảnh nhuộm xương cho thấy cột sống của cá có các đốt sống được khoáng hóa gần hết, bao gồm từ 29-30 thân đốt sống (Hình 5A). Tuy nhiên cung thần kinh (*neural arch-na*, một cấu trúc của xương đốt sống về phía mặt lưng) mới xuất hiện ở 6-7 đốt sống đầu tiên (Hình 5A,C) nhưng cung mạch máu (cấu trúc xương nằm phía mặt bụng của đốt sống) chưa xuất hiện (Hình 5A,C).

3.3 Xương vây đuôi của cá được khoáng hóa bắt đầu từ khi cá 9 ngày tuổi

Khi ấu trùng cá đạt 9 ngày tuổi, chúng tôi quan sát thấy bắt đầu có sự khoáng hóa nhẹ của 4-6 tia vây đuôi của cá (Hình 5E). Đến khi cá 10 ngày tuổi, các tia vây đuôi này được khoáng hóa nhiều hơn bắt màu tím đỏ đậm của thuốc nhuộm alizarin red (Hình 5A,D). Tuy nhiên, chúng tôi chưa thấy các cấu trúc xương của các vây khác như vây ngực, vây bụng, vây lưng và vây hậu môn xuất hiện tại thời điểm này (Hình 5A,D).



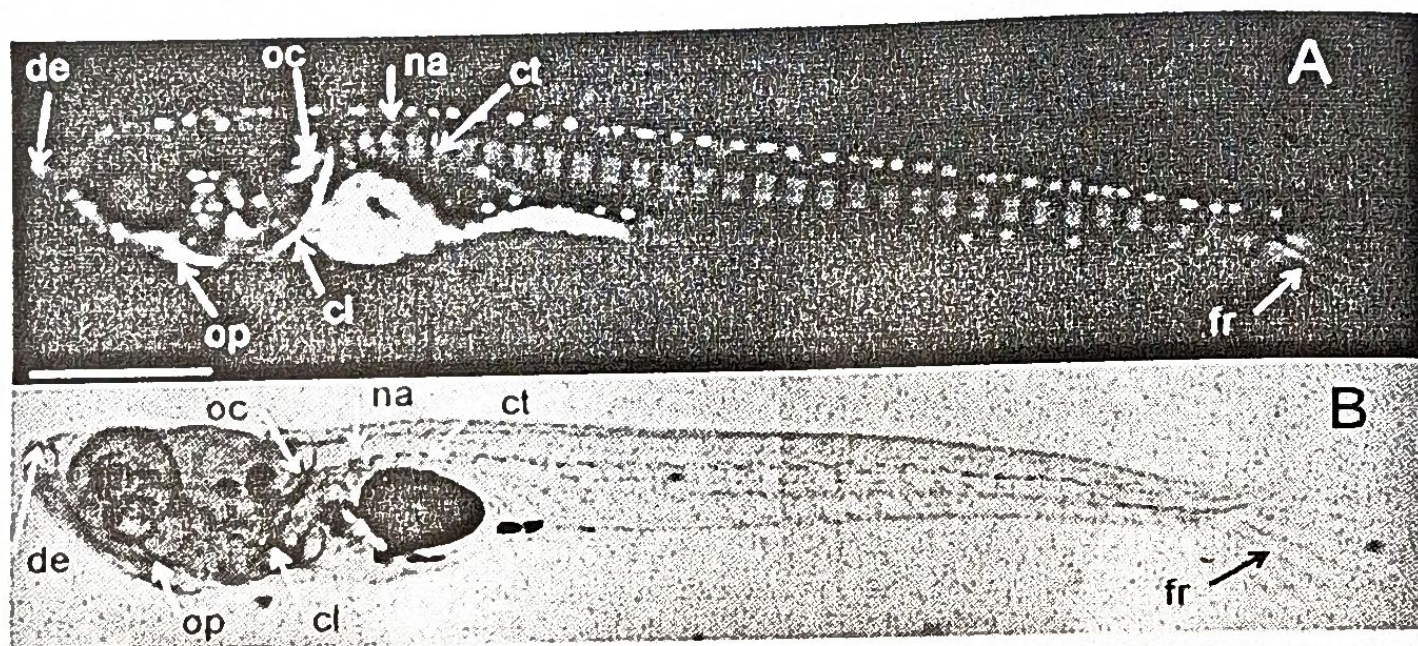
Hình 5. Sự khoáng hóa xương ở cá medaka 9 – 10 ngày tuổi

Hình ảnh mặt bên của ấu trùng medaka 9 và 10 ngày tuổi được nhuộm xương và chụp ảnh ở độ phóng đại 2,5x, sb = 0,49mm (A). Hình phần đầu cá ở độ phóng đại 2,5x, sb = 0,22mm (B). Hình ảnh cột sống được chụp ở độ phóng đại 10x, sb = 0,11mm, các đốt sống ở phần đầu của cột sống bao gồm thân đốt sống (ct) và cung thần kinh (na), chưa có đốt sống nào có cung mạch máu (C). Hình ảnh vây đuôi ở độ phóng đại 10x, sb = 0,12mm (D). Hình ảnh vây đuôi cá ở 9 ngày tuổi ở độ phóng đại 10x, sb = 0,11mm (E); operculum (op), cleithrum (cl), parasphenoid (ps), otolith (ot), basilar plate (bp), branchiostegal rays (br), supraoccipital (soc), anterior basicranial commissure (abc), neural arch (na), centrum (ct), fin rays (fr).

3.4 Phương pháp nhuộm xương bằng thuốc nhuộm huỳnh quang calcein trên ấu trùng cá sống khẳng định kết quả nhuộm xương bằng alizarin red trên cá cố định.

Để khẳng định các kết quả của phương pháp nhuộm xương bằng thuốc nhuộm alizarin red được chúng tôi dùng cho nghiên cứu này để đánh giá sự phát triển của xương cá, chúng tôi dùng thêm phương pháp nhuộm xương bằng thuốc nhuộm huỳnh quang calcein. Vì thuốc nhuộm calcein có thể nhuộm xương cá sống *in vivo* và alizarin red nhuộm cá đã cố định nên với cùng một cá thể cá chúng tôi đã nhuộm xương bằng hai phương

pháp. Chúng tôi chọn cá 10 ngày tuổi để thực hiện thí nghiệm này. Đầu tiên chúng tôi nhuộm xương những ấu trùng cá này bằng thuốc nhuộm calcein sau đó cố định chúng bằng PFA 4% và nhuộm lại xương chúng bằng thuốc nhuộm alizarin red. Kết quả chụp ảnh hiển vi huỳnh quang và hiển vi thường trên những cá này cho thấy trên cùng một cá thể cá, các cấu trúc xương (neural arch (na), centrum (ct), fin rays (fr), occipital (oc), dentary (de), operculum (op), hypural (hy), supraoccipital (soc)) được nhuộm bằng alizarin red có màu đỏ tím thì cũng phát quang calcein màu xanh lá (Hình 6A,B).



Hình 6. Một ấu trùng cá 10 ngày tuổi được nhuộm xương *in vivo* bằng thuốc nhuộm huỳnh quang calcein (A) và nhuộm cố định bằng alizarin red (B)

Ảnh được chụp bằng kính hiển vi huỳnh quang ở độ phóng đại 2,5x, sb = 0,42mm (A) và độ phóng đại 2,5x, sb = 0,44mm (B). neural arch (na), centrum (ct), fin rays (fr), occipital (oc), dentary (de), operculum (op).

Kết quả này khẳng định các kết quả phân tích sự phát triển xương của cá medaka thông qua đánh giá sự khoáng hóa xương bằng thuốc nhuộm alizarin red chúng tôi trình bày ở phần trên, chứng tỏ những dữ liệu về sự khoáng hóa và phát triển của xương cá chúng tôi thu được ở nghiên cứu này là đáng tin cậy.

4. BÀN LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi đã theo dõi, phân tích và miêu tả quá trình hình thành và khoáng hóa xương của cá medaka *Oryzias latipes* chủng đại Cab từ giai đoạn phôi đến khi cá 10 ngày tuổi. Sự phát triển xương được đánh giá bằng sự xuất hiện của các cấu trúc xương đã được khoáng hóa, bắt màu tím đỏ với thuốc nhuộm alizarin red và màu xanh lá với thuốc nhuộm huỳnh quang calcein. Chúng tôi đã miêu tả được sự phát triển và khoáng hóa xương của cá medaka ở những thời điểm khi cá đạt 3, 4, 5, 6, 7, 10 ngày tuổi. Kết quả cho thấy sự khoáng hóa xương của cá medaka được bắt đầu từ các cấu trúc xương đầu, tiếp theo là xương cột sống và xương vây. Xương lỗ tai otolith (ot)

trong cấu trúc xương đầu được hóa xương đầu tiên khi cá 3 ngày tuổi. Các cấu trúc xương đầu thuộc sọ não và sọ tạng: xương bên bướm (*paraspheroid-ops*), xương trên chẩm (*supraoccipital-soc*), xương đỡ nắp mang *cleithrum*, xương nắp mang (*operculum*), xương basilar plate (*bp*), xương hàm hầu (*pharyngeal jaw-phi*) xuất hiện vào giai đoạn cá từ 4 đến 7 ngày tuổi. Tuy nhiên, từ khi ấu trùng nở vào ngày tuổi thứ 7 đến ngày thứ 10, các cấu trúc xương của xương đầu cá medaka không xuất hiện thêm nhiều mà các xương đã có tiếp tục được khoáng hóa và tăng về kích thước. Cũng như ở người và động vật có xương sống, quá trình tạo xương cá medaka có 2 dạng là tạo xương trực tiếp, mô xương được khoáng hóa và hình thành trực tiếp, không qua giai đoạn sụn (*intramembraneous ossification*) và dạng tạo xương qua giai đoạn sụn (*chondral ossification*) [8]. Các xương ở phần đầu khoáng hóa xuất hiện ở giai đoạn sớm là các xương được tạo thành theo dạng tạo xương trực tiếp. Kết quả này của chúng tôi phù hợp với kết quả của một số tác giả trước đây [5, 8].

Số lượng các đốt sống trong cột sống của các động vật có xương sống là một chỉ số dao động, đặc biệt đối với cá, số lượng đốt sống còn có thể bị phụ thuộc vào nhiệt độ môi trường sống [6, 12], thậm chí các dòng cá khác nhau trong cùng một loài cá cũng có số đốt sống và số lượng các đốt sống trong từng vùng cấu trúc của cột sống khác nhau [12]. Cột sống của cá medaka chủng Cab trong nghiên cứu này được bắt đầu khoáng hóa khi phôi cá 6 ngày tuổi từ các thân của khoảng 5-6 đốt sống kể từ đốt sống thứ 2 về phía đuôi, mỗi thân đốt sống được khoáng hóa từ mặt lưng đến mặt bụng (Hình 3A); Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả của một số tác giả trước về cách khoáng hóa xương của từng đốt sống, tuy nhiên về thứ tự hình thành các đốt sống, nghiên cứu của Ogawa cho thấy cột sống của medaka được khoáng hóa bắt đầu từ đốt thứ 4 -5 sau đó mở rộng về hai phía đầu và đuôi [13]. Điều này có thể giải thích cho sự đa dạng về sự phát triển xương cột sống ở cá, có thể là dòng cá chủng đại chúng tôi dùng cho nghiên cứu này (dòng Cab) không phải là dòng dùng cho các nghiên cứu trước. Cột sống của cá medaka được khoáng hóa gần hết ở các thân đốt sống và một số cung thần kinh của các đốt sống phía đầu khi cá 10 ngày tuổi, tuy chưa có sự xuất hiện của cung mạch máu. Chúng tôi cũng nhận thấy vào khoảng ngày tuổi thứ 9-10 khi cột sống chưa hóa xương hết thì một số tia vây đuôi đã được khoáng hóa. Như vậy trong 10 ngày phát triển đầu tiên, bộ xương của cá medaka với các cấu trúc xương cơ bản ở phần đầu, cột sống và đuôi đã được khoáng hóa. Các kết quả nghiên cứu này sẽ rất có ý nghĩa, là nguồn dữ liệu cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo của chúng tôi và của các nhóm nghiên cứu về xương khác có sử dụng mô hình cá.

5. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã nghiên cứu, mô tả quá trình hình thành và khoáng hóa xương của cá medaka *Oryzias latipes* chủng đại

Cab từ giai đoạn phôi đến khi cá 10 ngày tuổi. Dữ liệu này sẽ là cơ sở quan trọng cho các nghiên cứu về xương và các bệnh về xương, một hướng nghiên cứu đang rất được quan tâm trên mô hình cá medaka.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Naruse, K., Tanaka M., and Takeda H. (2011), *A Model for Organogenesis Human Disease and Evolution.*, Japan: Springer.
2. Wittbrodt, J., A. Shima, and M. Schartl (2002), *Medaka--a model organism from the far East.* Nat Rev Genet. 3(1): p. 53-64.
3. Matsui, H., R. Gavinio, and R. Takahashi (2012), *Medaka fish Parkinson's disease model.* Exp Neurol. 21(3): p. 94-100.
4. To, T.T., et al. (2012), *Rankl-induced osteoclastogenesis leads to loss of mineralization in a medaka osteoporosis model.* Development. 139(1): p. 141-50.
5. Inohaya, K., Y. Takano, and A. Kudo (2007), *The teleost intervertebral region acts as a growth center of the centrum: in vivo visualization of osteoblasts and their progenitors in transgenic fish.* Dev Dyn., 236(11): p. 3031-46.
6. Kimura, T., M. Shinya, and K. Naruse, (2012), *Genetic analysis of vertebral regionalization and number in medaka (Oryzias latipes) inbred lines.* G3 (Bethesda), 2(11): p. 1317-23.
7. Renn, J., et al. (2013), *A col10a1:nGFP transgenic line displays putative osteoblast precursors at the medaka notochordal sheath prior to mineralization.* Dev Biol., 381(1): p. 134-43.
8. Renn, J. and C. Winkler (2009), *Osterix-mCherry transgenic medaka for in vivo imaging of bone formation.* Dev Dyn. 238(1): p. 241-8.
9. Takeyama, K., et al. (2014), *In-vivo imaging of the fracture healing in medaka*

revealed two types of osteoclasts before and after the callus formation by osteoblasts. *Dev Biol.*, 394(2): p. 292-304.

10. Lại Thị Nguyệt, P.T.T., Phạm Văn Cường, Trần Đức Long, Tô Thanh Thúy (2015), Tính ổn định của gen chuyển rankl ở dòng cá medaka chuyển gen rankl:HSE:CFP làm mô hình bệnh loãng xương. *Tạp chí Sinh lý học Việt Nam*. tập 19 (số 2): p. 10-16.

11. Hall, R.M.L.a.B.K. (1987), *Development of the Head Skeleton of the Japanese Medaka, Oryzias latipes (Teleostei)*. *Journal of Morphology*, 193(2): p. 135-158.

12. Hubbs, C.L. (1922), *Variations in the number of vertebrae and other meristic characters of fishes correlated with the temperature of water during development*. *The American Naturalist*, (645).

13. Ogawa, N.M. (1965), *A phenogenetic study of the vertebral fused*

(f) in the medaka *Oryzias latipes*. *EMBRYOLOGIA*, 9(1): p. 13-33.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin cảm ơn PGS. TS Nguyễn Lai Thành, PGS. TS. Hoàng Thị Mỹ Nhung, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội và các thành viên trong nhóm nghiên cứu của hai PGS về những giúp đỡ trong quá trình nuôi cá và sử dụng các thiết bị hiển vi, chụp ảnh. Cá medaka chủng đại Cab được giáo sư Christoph Winkler Đại học Quốc gia Singapore tặng.

Nghiên cứu này được thực hiện một phần nhờ kinh phí từ đề tài QG.14.21 của Đại học Quốc gia Hà Nội.

SUMMARY

BONE MINERALIZATION DEVELOPMENT IN MEDAKA (ORYZIAS LATIPES) I

Phạm Thị Thanh¹, Trần Đức Long¹, Tô Thanh Thúy¹
¹Faculty of Biology, VNU University of Science

Medaka, *Oryzias latipes*, a small fresh water teleost fish originated from Japan and southeast Asia has been widely used as an experimental model for research in biomedicine, especially in bone biology and diseases. To obtain better data for bone research, we analyzed the process of bone mineralization in medaka, from the embryonic stage until the fish reached 2 months of age. Bone mineralization was visualized by alizarin red staining that was also confirmed by green fluorescent calcein staining. The results showed that bone mineralization in medaka began from early embryonic stages with the formation of some head bone structures that followed by the formation of vertebral column and the fin rays. Here we describe bone mineralization in medaka from early development up to 10 days of age. Otoliths are the head bone structures that were mineralized first when the embryo was at 3 days post fertilization (3dpf). During the following stages of development (4-7dpf), other head bone structures were formed, such as parasphenoid, supraoccipital, basilar plate, pharyngeal jaw... The vertebral column consisting of about 30 vertebrae at adult stage was mineralized first in 5-6 anterior vertebrae, from the 2nd vertebra onwards at 6dpf. Interestingly the first vertebra was formed latter, at 7dpf. At 9dpf, mineralization of some caudal fin rays were visualized while that of other fin rays such as pectoral, pelvic, dorsal, anal fins was not yet appeared until the fish reached 10 days of age.

Keywords: medaka, bone development, bone mineralization, alizarin red staining