

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA ACETAMINOPHEN LÊN HOẠT ĐỘNG CHỨC NĂNG CỦA PHÔI VÀ ẤU THỂ CÁ NGỰA VẦN (*Danio rerio*)

Dương Thùy Linh¹, Hoàng Thị Mỹ Hạnh¹, Nguyễn Lai Thành^{1*}

TÓM TẮT: Trong nhiều thập kỷ, acetaminophen là chất thuộc nhóm thuốc hạ nhiệt - giảm đau được sử dụng rộng rãi ở nhiều đối tượng kể cả trẻ sơ sinh và phụ nữ mang thai. Tuy nhiên, những nghiên cứu đánh giá độc tính hoặc ảnh hưởng của acetaminophen lên các hoạt động chức năng trong quá trình phát triển của phôi thai đều đã được thực hiện từ lâu. Với sự phát triển của khoa học và các kỹ thuật nghiên cứu ngày càng nhanh chóng và có tính chuẩn xác cao, việc đánh giá lại độc tính của các hóa chất, dược phẩm là hết sức cần thiết, đặc biệt là với những dược phẩm, hóa chất có biểu hiện những tác dụng không mong muốn với tác động có tính tiêu cực mạnh. Trong nghiên cứu này, mô hình phát triển phôi cá ngựa vằn từ đầu giai đoạn phát triển phôi tới giai đoạn ấu thể được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của acetaminophen lên chức năng của cơ quan thông qua nhịp tim và hành vi của ấu thể. Sau 48 giờ phơi nhiễm ở nồng độ 240mg/l acetaminophen cho thấy nhịp tim của ấu thể đã bị giảm so với mẫu đối chứng. Bên cạnh đó, những khảo sát về hành vi cho thấy acetaminophen không gây ảnh hưởng lên chuyển động tự phát của phôi nhưng có tác động mạnh lên hệ thần kinh thông qua việc tăng chuyển động của ấu thể. Từ những kết quả này cho thấy, acetaminophen gây ảnh hưởng nhất định đến các hoạt động chức năng của cá ngựa vằn ở giai đoạn sớm trong quá trình phát triển.

Từ khóa: acetaminophen; độc tính; cá ngựa vằn; hành vi.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Acetaminophen là thành phần chính của đa số loại thuốc giảm đau - hạ sốt thương mại đang được sử dụng. Theo số liệu năm 2008 của tổ chức FDA, Mỹ, khoảng 24,6 tỉ liều acetaminophen được sử dụng mỗi năm và có xu hướng tăng [5]. Loại thuốc này được sử dụng phổ biến cho cả trẻ sơ sinh và phụ nữ mang thai. Tuy nhiên, ảnh hưởng của acetaminophen lên sự phát triển phôi thai chưa được nghiên cứu rõ ràng, gặp nhiều thách thức cũng như hiệu quả của những nghiên cứu đó [2].

Mô hình thử độc tính trên động vật có vú bậc cao (chuột, thỏ, gà...) là giải pháp

đã và đang được sử dụng hiệu quả nhưng vấp phải những hạn chế bởi các vấn đề về đạo đức trong nghiên cứu. Cá ngựa vằn là một sinh vật mô hình trong nhiều nghiên cứu do chúng có đặc điểm sinh sản nhanh, dễ nuôi trong phòng thí nghiệm, 85% hệ gen tương đồng với hệ gen người và đặc biệt quá trình phát triển phôi tương tự như ở động vật bậc cao [6]. Năm 2013, đánh giá độc tính trên phôi cá ngựa vằn (Zebrafish embryo toxicity test-ZFET) đã được Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (OECD) phê duyệt cùng với chỉ dẫn từ OECD (OECD guidelines) để đánh giá độc tính của các hóa chất thay thế cho các mô hình động vật có vú [7].

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cá ngựa vằn (*Danio rerio*) trưởng thành được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ Tế bào Động vật, Trung tâm Nghiên cứu Khoa học sự sống,

¹Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

*Tác giả chịu trách nhiệm chính:

Nguyễn Lai Thành

Email: thannl@vnu.edu.vn

Ngày nhận bài: 4/3/2016

Ngày nhận bài phản biện: 14/6/2016

Ngày chấp nhận đăng: 24/6/2016

khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Cá được nuôi trong điều kiện $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 14 giờ sáng/10 giờ tối, pH 7,0 – 7,2. Acetaminophen (> 99%, Sigma) được pha trong nước RO.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Dựa theo hướng dẫn thử nghiệm độc tính trên phôi cá ngựa vằn của tổ chức hợp tác và phát triển kinh tế OECD 236 năm 2013 [7]. Chúng tôi tiến hành thí nghiệm thử độc tính, đánh giá tác động của acetaminophen lên chức năng của phôi và hành vi của ấu thể cá ngựa vằn. Các thí nghiệm kiểm tra tác động (limit test) được thực hiện và chúng tôi đã đưa ra được khoảng nồng độ của acetaminophen không gây ảnh hưởng đến hình thái của phôi cũng như ấu thể cá ngựa vằn. Các nồng độ acetaminophen trong từng thử nghiệm (đánh giá nhịp tim với nồng độ 240 mg/l; đánh giá chuyển động tự phát 500 mg/l; đánh giá chuyển động tích cực 200 mg/l) được hòa tan trong nước RO.

2.2.1. Phương pháp đánh giá nhịp tim

Những phôi phát triển bình thường ở khoảng 2 giờ sau thu tinh được lựa chọn và phơi nhiễm với nồng độ 240 mg/l acetaminophen trong 48 giờ. Sau 48 giờ, phôi được loại bỏ hóa chất và rửa bằng nước RO, giữ ổn định trong nước 30 phút trước khi xác định nhịp tim. Dữ liệu được xử lý và quy số liệu về nhịp tim/phút. Thuật toán t-test được sử dụng để đánh giá sự khác biệt có tính thống kê với độ tin cậy 95%.

2.2.2. Phương pháp đánh giá hành vi

Để đánh giá hành vi của phôi cá ngựa vằn, chúng tôi tiến hành đánh giá thông qua hai tiêu chí là chuyển động tự phát và chuyển động tích cực của ấu thể. Đối với chuyển động tự phát, phôi cá ngựa vằn được phơi nhiễm cấp ở nồng độ 500 mg/l acetaminophen trong 24 giờ. Sau đó, 20 phôi phát triển bình thường, có chuyển

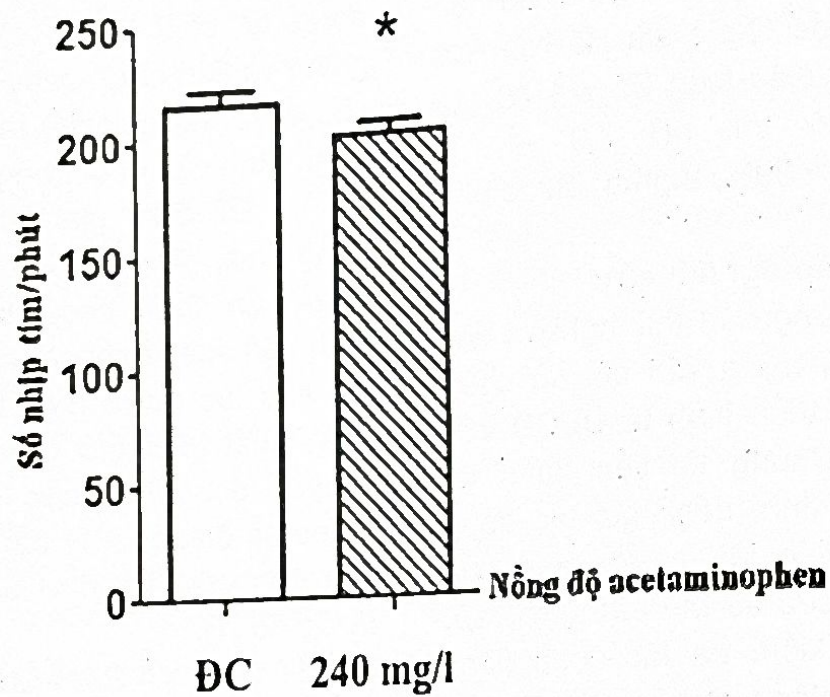
động tự phát được chuyển vào đĩa 6 giếng và tiến hành quay trong 2 phút. Các chuyển động quy đổi ra số chuyển động trung bình của phôi trong 1 phút.

Để đánh giá hành vi do tác động trong thời gian dài của thuốc, phôi cá ngựa vằn được phơi nhiễm với nồng độ 200 mg/l acetaminophen trong 4 ngày, ấu thể tiếp tục được nuôi trong RO cho tới ngày phát triển thứ 6 và tiến hành quay chuyển động tích cực của các ấu thể. Video sẽ được xử lý bằng hệ thống phân tích đánh giá hành vi đã được công bố trước đó [1].

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Acetaminophen làm giảm nhịp tim

Tim là cơ quan hoạt động sớm nhất trong quá trình phát triển của phôi. Do đó, nhịp tim được chọn là tiêu chí đánh giá sự ảnh hưởng của acetaminophen trong giai đoạn phát triển sớm của phôi cá ngựa vằn. Từ việc xây dựng đường hồi quy đáp ứng liều acetaminophen sau 48 giờ phơi nhiễm, chúng tôi tính được EC₁₀ (48 giờ) là 240 mg/l. Nồng độ này được chọn để đánh giá mức độ ảnh hưởng của acetaminophen tới nhịp tim. Kết quả thể hiện ở hình 1 cho thấy lô đối chứng cho kết quả nhịp tim là 216 nhịp/phút nhưng nhịp tim ở lô thí nghiệm giảm còn 200 nhịp/phút. Trong những nghiên cứu của David và cộng sự cho thấy, khi bị phơi nhiễm với acetaminophen, hệ tuần hoàn của phôi cá ngựa vằn bị ảnh hưởng thể hiện ở dị dạng như phù màng bao tim [3]. Chúng tôi tiến hành phơi nhiễm phôi cá ngựa vằn ở nồng độ 240 mg/l là nồng độ không xuất hiện bất kỳ dị dạng hình thái. Điều đó chứng tỏ, chức năng của phôi cá ngựa vằn thể hiện ở nhịp tim bị ảnh hưởng bởi tác động của acetaminophen có thể xảy ra sớm ở mức độ phân tử. Do đó, chúng tôi kết luận rằng acetaminophen không những ảnh hưởng tới sự phát triển của hệ tuần hoàn mà còn ảnh hưởng tới chức năng của hệ tuần hoàn.



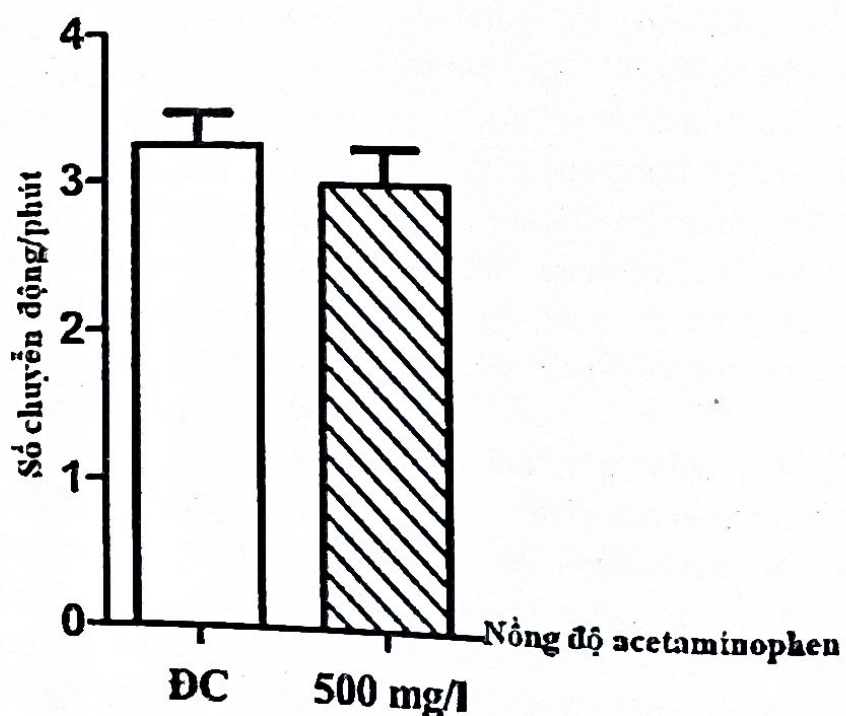
Hình 1. Biểu đồ thể hiện số nhịp tim trung bình/phút của phôi cá ngựa vằn sau 48 giờ phơi nhiễm với acetaminophen 240mg/l

3.2. Acetaminophen ảnh hưởng tới hành vi của ấu thể cá ngựa vằn

3.2.1. Ảnh hưởng lên chuyển động tự phát

Chuyển động tự phát của phôi cá ngựa vằn được đánh giá khi cho phôi cá ngựa vằn phơi nhiễm ở nồng độ cấp tính 500 mg/l trong 24 giờ. Kết quả ở hình 2 cho

thấy, chuyển động tự phát trung bình trong 1 phút tại lô đối chứng là 3,2 chuyển động/phút và ở lô phơi nhiễm là 2,97 chuyển động/phút. Kết quả này cho thấy, acetaminophen có thể làm giảm chuyển động tự phát của ấu thể khi phôi bị phơi nhiễm với nồng độ cao.

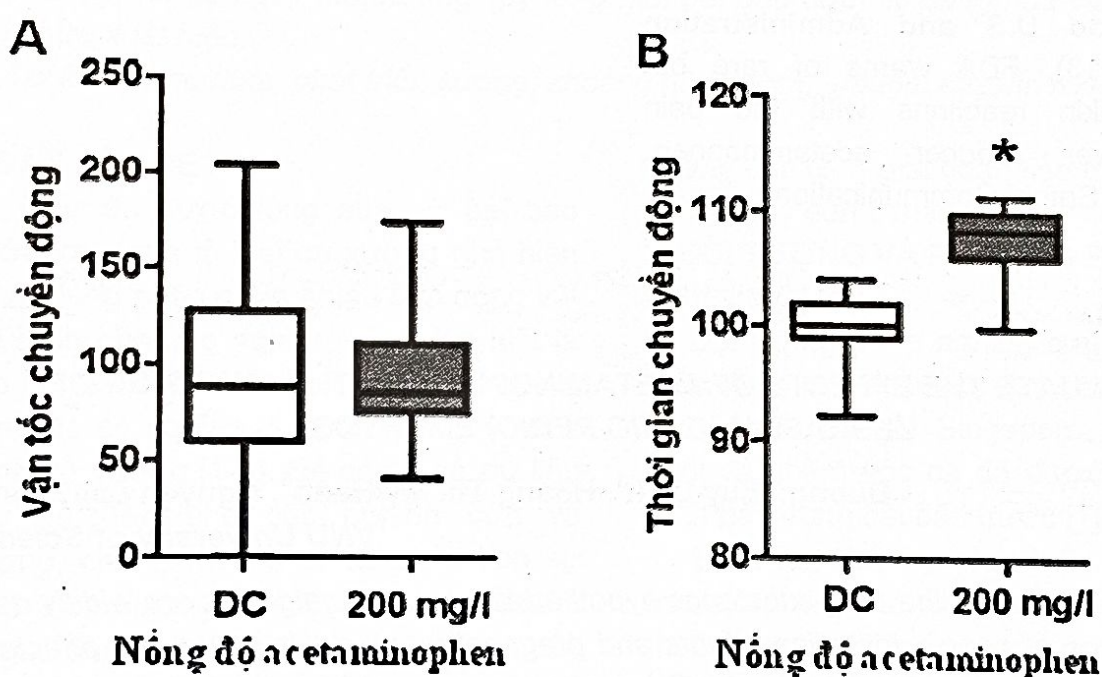


Hình 2. Tần số chuyển động của ấu thể cá ngựa vằn.

3.2.2. Ảnh hưởng lên tốc độ, thời gian chuyển động của ấu thể 6 ngày tuổi

Với mục đích đánh giá ảnh hưởng lâu dài của acetaminophen lên chức năng của ấu thể cá ngựa vằn, chúng tôi khảo sát chuyển động của ấu thể 6 ngày tuổi sau khi phơi nhiễm với 200 mg/l acetaminophen. Tại ngày thứ 6, ấu thể được quay hành vi và dữ liệu được xử lý cho các kết quả về vận tốc trung bình và

thời gian chuyển động. Kết quả biểu diễn ở hình 3A cho thấy, vận tốc trung bình của lô phơi nhiễm không chênh lệch so với lô đối chứng. Sử dụng thuật toán t-test với kết quả này cho thấy sự khác biệt này không mang tính thống kê. Như vậy, chúng tôi kết luận vận tốc của ấu thể không thay đổi sau khi phơi nhiễm lâu trong thời kỳ phát triển phôi với acetaminophen liều trung bình.



Hình 3. Ảnh hưởng của acetaminophen lên vận tốc chuyển và thời gian chuyển động.

Tuy nhiên, khi chúng tôi xác định thời gian chuyển động trung bình của ấu thể thì kết quả ở hình 3B cho thấy thời gian chuyển động trung bình của ấu thể tăng đáng kể khi bị phơi nhiễm. Kết quả này mang ý nghĩa thống kê. Như vậy, acetaminophen không làm ảnh hưởng đến vận tốc chuyển động trung bình của ấu thể nhưng kích thích làm tăng thời gian chuyển động của chúng.

4. KẾT LUẬN

Sau 48 h phơi nhiễm với 240 mg/l acetaminophen đã tác động lên hệ tim mạch của ấu thể cá ngựa vằn gây giảm nhịp tim.

Acetaminophen làm giảm tần số chuyển động cũng như vận tốc chuyển

động của ấu thể cá ngựa vằn nhưng lại làm tăng thời gian chuyển động của chúng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đức Hiếu, Đinh Duy Thành, Vũ Anh Tuấn, và cs. (2015) Bước đầu xây dựng hệ thống phân tích và mô hình hóa chuyển động để đánh giá ảnh hưởng của ethanol lên phôi và ấu thể cá ngựa vằn. Tạp chí khoa học đại học quốc gia Hà Nội: Khoa học tự nhiên và công nghệ, 30(6S): 687-695.
2. Brune K, Renner B, and Tiegs G. (2014) Acetaminophen/paracetamol: A history of errors, failures and false decisions. European Journal of Pain, 19(7): 953-965.

3. David A. and Pancharatna K. (2009) Effects of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. Journal of Applied Toxicology, 29(7): 597-602.

4. De Luca E, Zaccaria GM, et al. (2014) ZebraBeat: a flexible platform for the analysis of the cardiac rate in zebrafish embryos. Scientific Reports 4: 4898.

5. Food U.S and Administration Drug (2013), FDA warns of rare but serious skin reactions with the pain reliever/fever reducer acetaminophen. FDA Drug Safety Communication.

6. Howe K, Clark MD, et al. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature, 496(7446): 498-503.

7. OECD Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, 2013.

SUMMARY

EVALUATE THE EFFECTS OF ACETAMINOPHEN ON THE FUNCTION OF ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) EMBRYOS

Duong Thuy Linh¹, Hoang Thi My Hanh¹, Nguyen Lai Thanh¹
¹VNU University of Science

Acetaminophen is the drug substance hypothermia group - analgesics are widely used by all groups of people including infants and pregnant women. However, the effects of acetaminophen on the functional zebrafish embryos were not investigated. In this study, zebrafish embryos are used to identify the effects of acetaminophen from early stage and larvae stage. After 48 hours of 240 mg/l acetaminophen treatment, the heart rate shown reduce compared to the control sample. On the other hands, the behavior results showed that acetaminophen not affects to the spontaneous movement of embryos but significantly impact on the nervous system by increasing the movement of larvae. From these results, we concluded that acetaminophen affect to the function of the zebrafish at the early stage and larvae stage.

Key words: acetaminophen, toxicity, behavior, zebrafish.