

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

TÓM TẮT: Tiếp theo bài báo phần I đã đăng trong Tạp chí Sinh lý học tập 19 số 3 năm 2015 công bố kết quả nghiên cứu về sự phát triển xương của cá medaka từ 0-10 ngày tuổi, bài báo phần II này miêu tả và phân tích sự phát triển xương cá ở giai đoạn tiếp theo, khi cá từ 15 ngày đến 2 tháng tuổi. Đầu cá có các cấu trúc đầu tiên của xương hộp sọ bắt đầu hình thành. Cột sống của cá cũng hoàn thiện hơn với các đốt sống có đủ các cấu trúc cơ bản gồm thân đốt sống và các cung thần kinh và cung mạch máu kín. Đặc biệt là sự xuất hiện mới và phát triển của các xương vây, tiếp theo vây đuôi là vây ngực, vây hậu môn, vây lưng được hóa xương. Trong khi các vây đã hóa xương khá hoàn thiện, tới 60 ngày tuổi xương vây lưng mới bắt đầu được khoáng hóa và vây bụng vẫn chưa xuất hiện.

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

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Như đã được tổng quan ở bài báo trước, medaka là loài cá xương nhỏ hiện được dùng ngày càng nhiều làm động vật mô hình cho các nghiên cứu, đặc biệt là các nghiên cứu tìm hiểu bệnh trên người, trong đó có nghiên cứu về xương và các bệnh về xương [1-8]. Để có cơ sở dữ liệu đầy đủ hơn cho các nghiên cứu về xương, chúng tôi mô tả và phân tích sự phát triển xương liên tục của cá medaka từ giai đoạn phôi đến khi cá 2 tháng tuổi. Sự phát triển xương của cá được đánh giá thông các cấu trúc xương đã khoáng hóa được nhuộm bằng thuốc nhuộm alizarin red là chất có ái lực cao với canxi [5,8]. Cá nhuộm xương được chụp và phân tích hình ảnh hiển vi. Ở bài báo trước đăng trong tạp chí Sinh lý học tập 19 số 3 năm 2015, chúng tôi đã công bố kết quả phát triển xương cá ở giai đoạn từ 0-10 ngày tuổi. Trong bài báo này chúng tôi công bố kết quả về sự phát triển

xương của cá ở giai đoạn tiếp theo, khi cá từ 15 ngày đến 2 tháng tuổi.

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 [1].

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 [2, 7]. Tên của các cấu trúc xương cá được gọi dựa vào các công trình đã công bố phân tích giải phẫu của cá [2, 4].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**3.1 Xương đầu, xương cột sống của cá tiếp tục được hoàn thiện**

Ấu trùng cá 15 ngày tuổi: so với ấu trùng cá 10 ngày tuổi (Hình 1A) [2], đầu ấu trùng cá 15 ngày tuổi có thêm một số cấu trúc xương mới: hyosymplectic (hys), ceratobranchial (cb), ceratohyal (ch). Hyosymplectic (hys) nằm bên rìa dưới khu ổ mắt về phía mặt bụng, nối với xương anterior basicranial commissure (abc) (Hình 1B,D). Ceratohyal (ch) dạng hình que thẳng, xuất hiện ở 2 bên của vùng

¹ 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: 14/3/2016

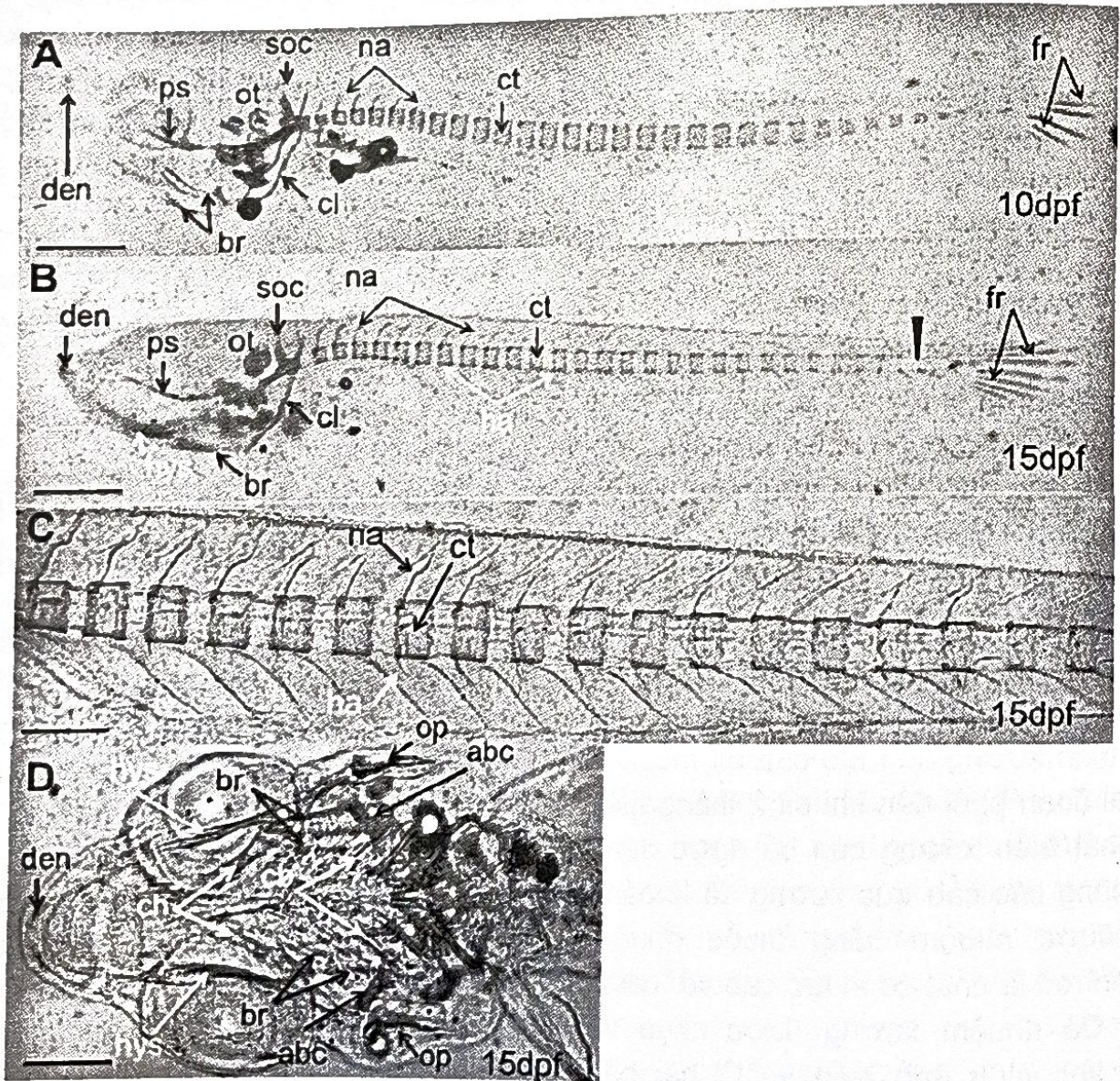
Ngày nhận bài phản biện: 11/6/2016

Ngày chấp nhận đăng: 24/6/2016

hốc má, bắt đầu từ phía sau của mắt kéo tới xương hyosymplectic (hys) (Hình 1D). Cấu trúc xương răng rõ ràng hơn (den, Hình 1B,D).

Cột sống của cá có đốt sống thứ 7-8 bắt đầu xuất hiện các xương cung mạch máu (hemal arch – ha, cấu trúc bao gồm 2

xương mọc từ 2 phía của phần đầu thân của đốt sống về mặt bụng) (Hình 1B,C). Tuy nhiên chúng tôi thấy đến thời điểm này 2-3 đốt sống cuối của cột sống vẫn chưa được hóa xương (đầu mũi tên đen hình 1B).



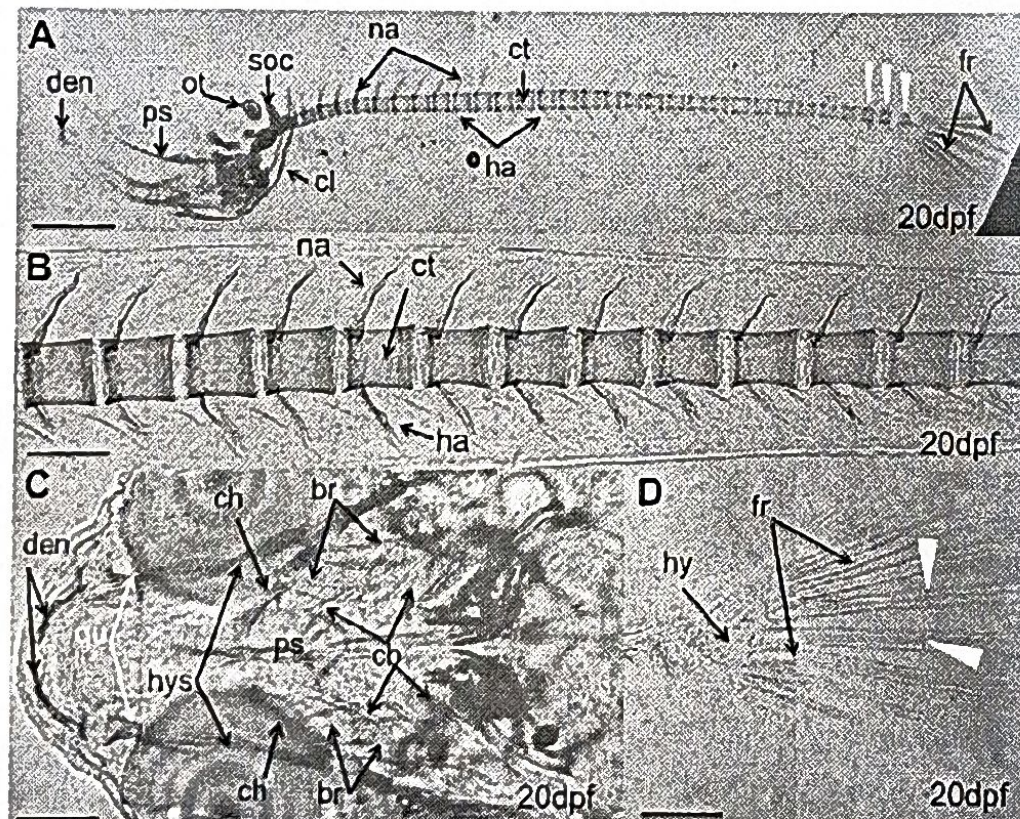
Hình 1. Phát triển xương của ấu trùng cá medaka ở giai đoạn 10 và 15 ngày tuổi
 (A): Hình chụp mặt bên ấu trùng cá 10 ngày tuổi với độ phóng đại 2,5x, sb = 0,31mm. (B): Hình chụp mặt bên ấu trùng cá 15 ngày tuổi với độ phóng đại 2,5x, sb = 0,38mm. (C): Hình ảnh mặt bên cột sống cá 15 ngày tuổi ở độ phóng đại 10x cho thấy ở một số đốt sống đã xuất hiện cung mạch máu (ha), sb = 0,13mm. (D): Hình chụp mặt bụng đầu cá với độ phóng đại 10x cho thấy những cấu trúc xương mới xuất hiện (được chỉ bằng mũi tên màu trắng) so với đầu cá 10 ngày tuổi, sb = 0,12 mm. hyosymplectic (hys), ceratohyal (ch), ceratobranchial (cb), dentary (den), cleithrum (cl), anterior basicranial commissure (abc), branchiostegal rays (br), operculum (op), supraoccipital (soc), neural arch (na), centrum (ct), hemal arch (ha), fin rays (fr).

Cá 20 ngày tuổi có các cấu trúc xương đầu với kích thước tăng hơn so với giai đoạn trước, chỉ xuất hiện thêm xương vuông (quadrate – qu, chỉ bởi mũi

tên trắng Hình 2C). Xương vuông (qu) có dạng mảnh, nằm phía trước và nối với xương hyosymplectic (hys) qua khớp (Hình 2C).

Xương cột sống hoàn thiện hơn với các đốt sống từ đốt thứ 8 về phía đuôi, mỗi đốt đã có đủ thân đốt sống (ct), 2 xương cung thần kinh (na) và 2 xương cung mạch máu (ha) (Hình 2A,B) mọc từ 2 bên của đầu mỗi đốt sống, tương ứng về phía lưng và phía bụng. Về phía đầu

cột sống có 6-7 đốt sống đầu tiên. Các xương cung thần kinh, xương cung mạch máu (Hình 2A,B) ở thời điểm này 2-3 đốt cuối của cột sống đã hóa xương (đầu mũi tên trắng Hình 2A).



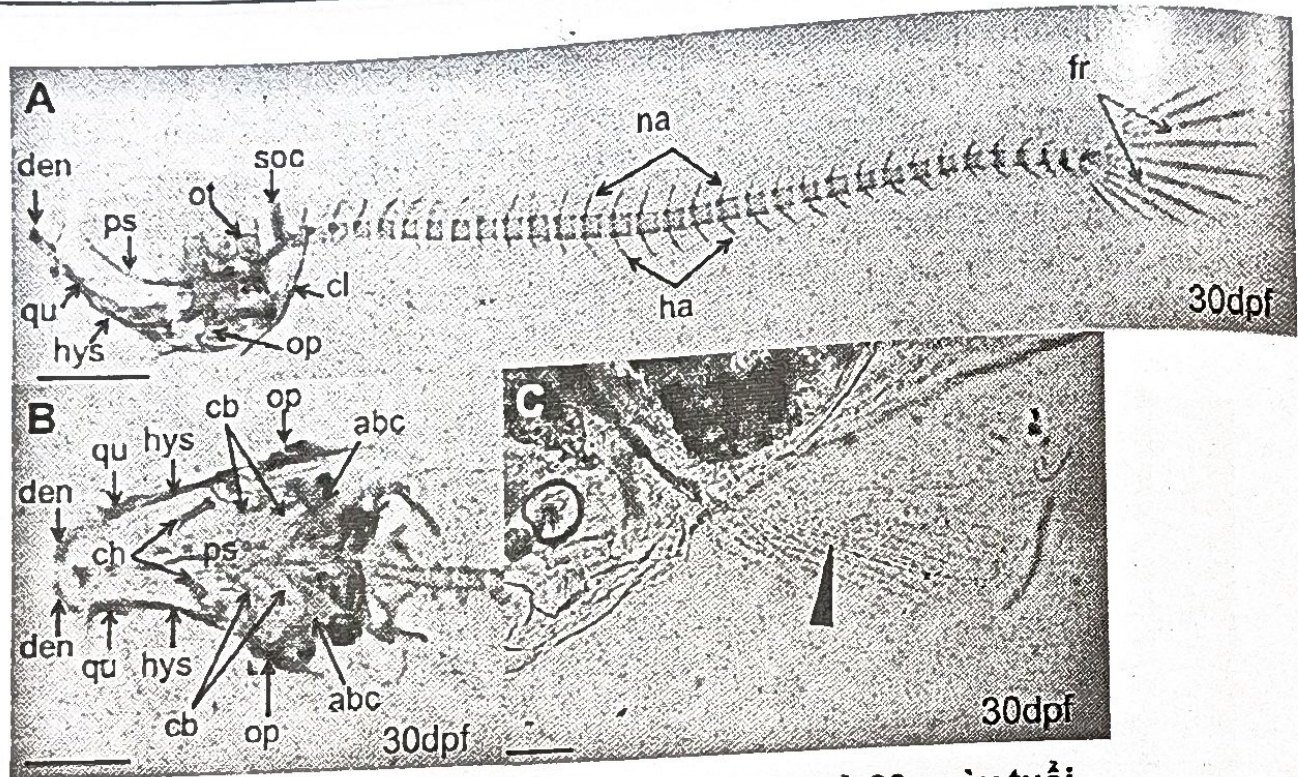
Hình 2. Phát triển xương của cá medaka 20 ngày tuổi

(A): Hình chụp mặt bên đầu trùng cá với độ phóng đại 2,5x, sb = 0,35mm. (B): Hình ảnh cột sống của cá ở độ phóng đại 10x, sb = 0,15mm. (C): Hình ảnh chụp mặt bụng xương đầu cá với độ phóng đại 10x cho thấy các cấu trúc xương phát triển hơn so với giai đoạn trước và xương quadrate (qu) mới xuất hiện (chỉ bởi mũi tên trắng), sb = 0,14mm. (D): Hình ảnh vây đuôi ở độ phóng đại 10x cho thấy các tia vây đuôi đã bắt đầu phân đốt (đầu mũi tên trắng), sb = 0,11mm. quadrate (qu), hyosymplectic (hys), ceratohyal (ch), ceratobranchial (cb), dentary (den), cleithrum (cl), parasphenoid (ps), supraoccipital (soc), neural arch (na), centrum (ct), hermal arch (ha), fin rays (fr).

Cá 30 ngày tuổi có bộ xương với các cấu trúc xương cơ bản đã xuất hiện đầy đủ. **Xương đầu** phát triển và hoàn thiện hơn, đặc biệt là bộ máy mang - cung móng xuất hiện đầy đủ và rõ ràng hơn: xương nắp mang (operculum – op); hyosymplectic – hys; ceratobranchial – cb; ceratohyal – ch (Hình 3A,B).

Cấu trúc cột sống cũng phát triển hơn với các xương cung thần kinh (neural arch – na), xương cung mạch máu

(hermal arch – ha) phát triển, dài hơn trước (Hình 3A). Tuy nhiên ở mỗi đốt sống cặp xương cung thần kinh vẫn tách rời nhau, chưa tạo ra được cung thần kinh tròn kín (số liệu không công bố); Hiện tượng tương tự cũng quan sát được với các cặp xương cung mạch máu của cá ở giai đoạn phát triển này. Vây đuôi đã hoàn thiện hơn, tuy nhiên xương vây ngực (đầu mũi tên đen Hình 3C), vây lưng và vây hậu môn vẫn chưa được hình thành.



Hình 3: Phát triển xương cá medaka ở 30 ngày tuổi

(A): Hình chụp mặt bên ấu trùng cá với độ phóng đại 2,5x, sb= 0,51mm, (B): Hình chụp mặt bụng phần đầu cá ở độ phóng đại 2,5x, sb=0,48mm, (C): Hình chụp phần vây ngực chưa được hóa xương ở độ phóng đại 10x, sb = 0,12mm. dentary (den), operculum (op), cleithrum (cl), supraoccipital (soc), quadrate (qu), hyosymplectic (hys), ceratohyal (ch), parasphenoid (ps), anterior basicranial commissure (abc), neural arch (na), centrum (ct), hemal arch (ha), fin rays (fr)

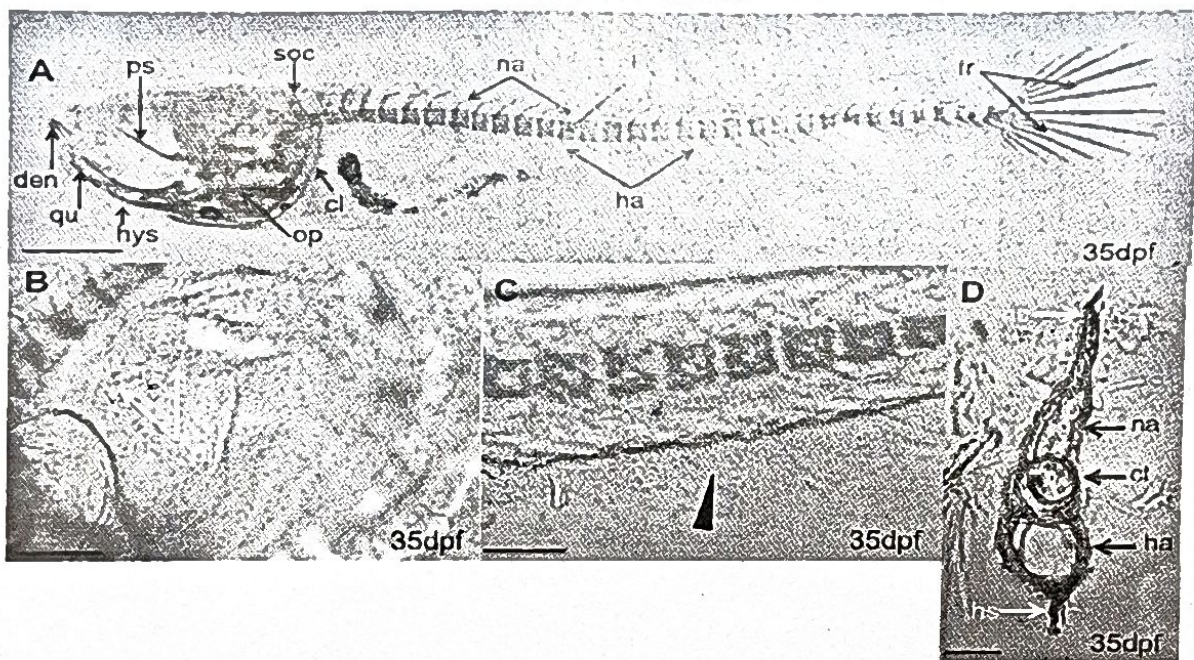
Từ 35-60 ngày tuổi các cấu trúc xương đầu đã có tiếp tục phát triển và hoàn thiện hơn. Từ khi cá 50 ngày tuổi có thêm xương ổ mắt (orbital – orb, Hình 6A) xuất hiện.

Trong giai đoạn này cột sống của cá cũng tiếp tục hoàn thiện, đặc biệt cặp xương cung thần kinh ở mặt lưng về phía 2 bên của mỗi đốt sống hợp lại tạo thành một cung tròn kín (na, Hình 4D) để chứa và bảo vệ tủy sống bên trong, trên cung này có cấu trúc xương nhọn là gai thần kinh (neural spine – ns, Hình 4D); Đồng thời, 2 xương cung mạch máu ở mặt bụng về phía 2 bên của mỗi đốt sống hợp lại tạo thành cung mạch máu kín là cung xương chứa và bảo vệ các mạch máu chứa trong đó (ha, Hình 4D). Nối với cung này về phía mặt bụng là gai mạch máu nhọn (hemal spine – hs), hình que hướng chéo ra phía đuôi (Hình 4D).

3.2 Phát triển xương vây

Cá medaka có vây chẵn (vây ngực, vây bụng) và vây lẻ (vây lưng, vây hậu môn, vây đuôi). Vây đuôi phát triển sớm nhất với sự xuất hiện một số tia vây ở 9 ngày tuổi và phát triển hơn vào ngày thứ 10 và 15, các tia vây đuôi đã được hóa xương nhiều hơn nên có thể thấy rất rõ ([2], Hình 1A,B). Đến 20 ngày tuổi, số lượng tia vây đuôi được hóa xương tăng hơn trước và tia vây bắt đầu phân đốt (Hình 2A,D). Lúc này, các xương hypural (hy) mỏng dẹt cũng bắt đầu xuất hiện nối với các tia vây đuôi (Hình 2D). Đến ngày thứ 30, vây đuôi đã khá hoàn thiện (Hình 3A).

Ấu trùng cá 35 ngày tuổi (Hình 4) có vây ngực mới bắt đầu được hóa xương ở một số (2-3) tia vây (plf, Hình 4B); vây lưng và vây hậu môn vẫn chưa được hóa xương (đầu mũi tên đen Hình 4C).

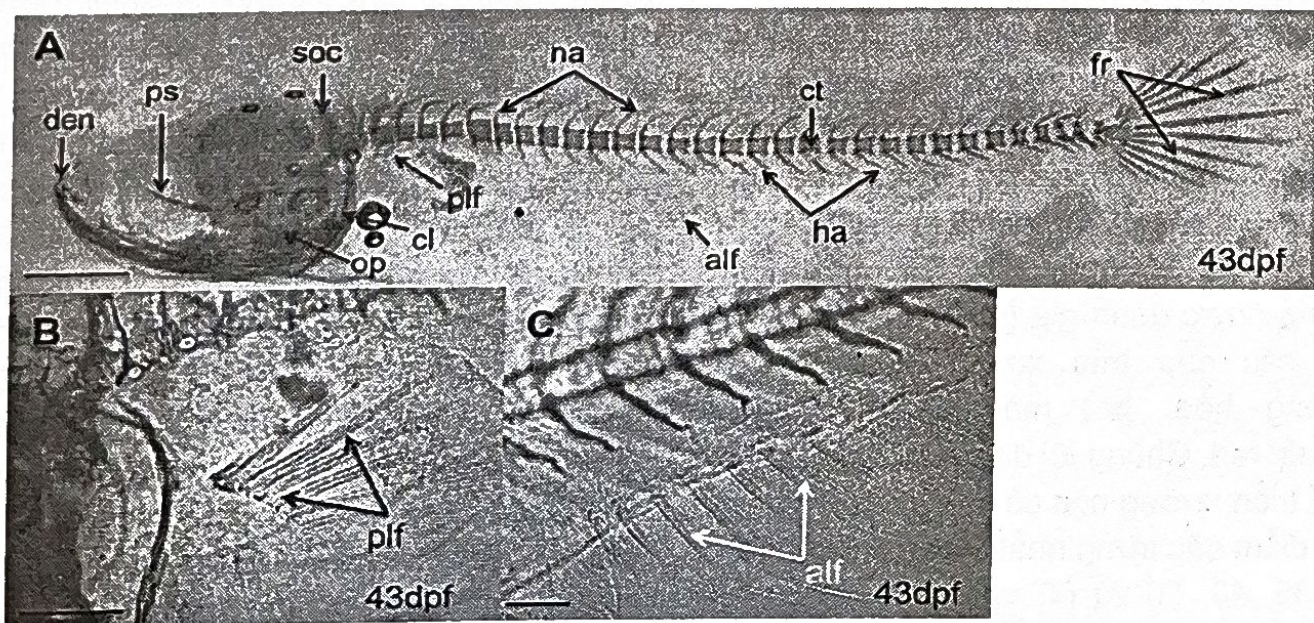


Hình 4. Phát triển xương cá medaka ở 35 ngày tuổi

(A): Hình chụp mặt bên ấu trùng cá với độ phóng đại 2,5x, sb= 0,67mm, (B): Hình chụp phần vây ngực đã hóa xương ở độ phóng đại 10x, sb = 0,13mm. (C): Hình chụp phần vây hậu môn chưa được hóa xương ở độ phóng đại 10x, sb = 0,12mm. (D) Hình ảnh đốt sống của cá medaka đã tạo thành gai thần kinh và gai mạch máu ở độ phóng đại 10x, sb = 0,10mm. dentary (den), operculum (op), cleithrum (cl), parasphenoid (ps), supraoccipital (soc), quadrate (qu), hyosymplectic (hys), neural arch (na), centrum (ct), neural spine (ns), hemal spine (hs), hemal arch (ha), pectoral fin (plf), anal fin (alf), dorsal fin (dlf), fin rays (fr)

Cá medaka giai đoạn 43 ngày tuổi (Hình 5) có số tia vây ngực được hóa xương nhiều hơn và dài hơn (Hình 5B);

Một số tia vây hậu môn (4-6 tia) cũng bắt đầu được hóa xương (Hình 5C).

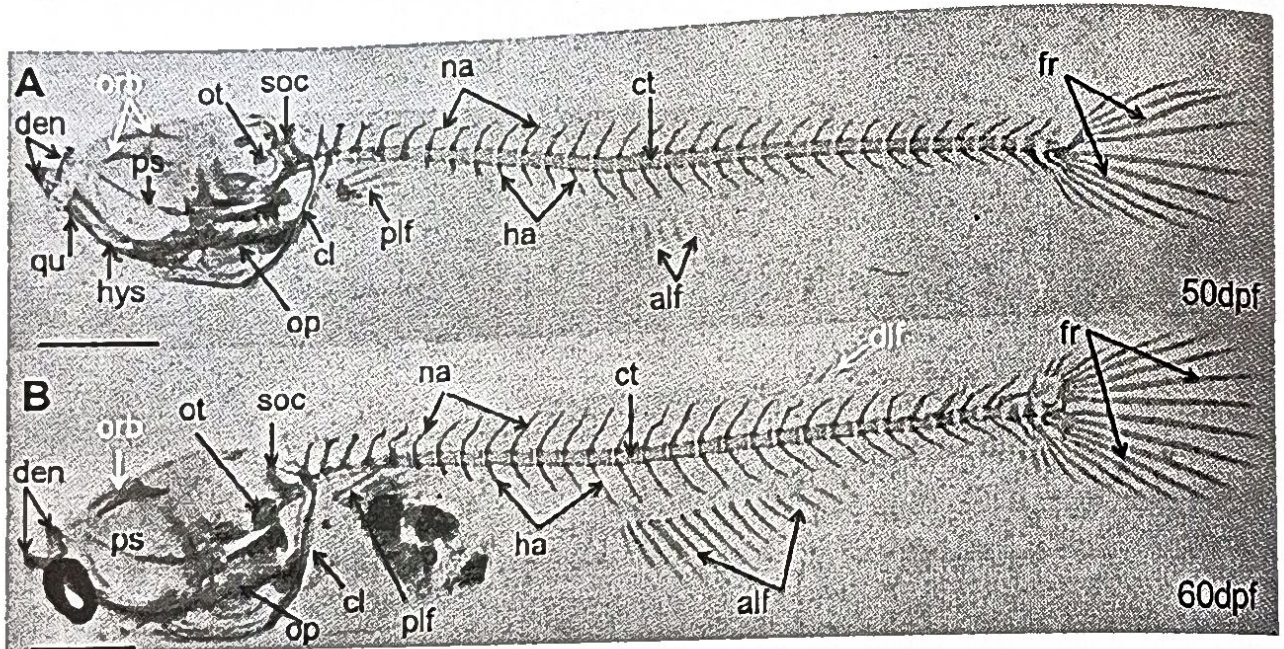


Hình 5. Phát triển xương ở cá medaka 43 ngày tuổi

(A): Hình chụp mặt bên ấu trùng cá với độ phóng đại 2,5x, sb= 0,73mm, (B): Hình chụp phần vây ngực đã hóa xương ở độ phóng đại 10x, sb = 0,12mm. (C): Hình chụp phần vây hậu môn đã hóa xương ở độ phóng đại 10x, sb = 0,12mm. operculum (op), parasphenoid (ps), supraoccipital (soc), dentary (den), cleithrum (cl), neural arch (na), centrum (ct), hemal arch (ha), pectoral fin (plf), anal fin (alf), fin rays (fr)

Cá ở giai đoạn 50-60 ngày tuổi (Hình 6) sự hóa xương vây ngực và vây hậu môn vẫn tiếp tục (Hình 6A,B), trong khi tới 60 ngày mới có một số tia vây thuộc vây lưng được hóa xương (dlf, Hình 6B) và ở

thời điểm này vây bụng còn hoàn toàn chưa xuất hiện. Quá trình hóa xương vẫn còn tiếp tục trong suốt giai đoạn phát triển của cá.



Hình 6. Phát triển xương cá medaka ở 50 và 60 ngày tuổi

(A): Hình chụp mặt bên ấu trùng cá ở 50 ngày tuổi với độ phóng đại 2,5x, sb = 0,77mm, (B): Hình chụp mặt bên ấu trùng cá ở 60 ngày tuổi với độ phóng đại 2,5x cho thấy cấu trúc xương đầu (orb) và xương vây lưng (dlf) mới xuất hiện, sb = 0,73mm. operculum (op), cleithrum (cl), parasphenoid (ps), supraoccipital (soc), dentary (den), orbital (orb), quadrate (qu), hyosymplectic (hys), neural arch (na), centrum (ct), hemal arch (ha), pectoral fin (plf), anal fin (alif), dorsal fin (dlf), fin rays (fr).

4. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu về sự phát triển xương cá medaka phần II này chúng tôi đã theo dõi và miêu tả quá trình hình thành và phát triển xương của cá medaka *Oryzias latipes* chủng đại Cab từ 15 ngày đến khi cá 60 ngày tuổi. Sự phát triển xương được đánh giá bằng sự xuất hiện của các cấu trúc xương đang được khoáng hóa, bắt màu thuốc nhuộm alizarin red. Chúng tôi đã miêu tả được sự phát triển xương của cá medaka ở những thời điểm đặc trưng nhất khi cá đạt 15, 20, 30, 35, 43, 50 và 60 ngày tuổi. Các kết quả cho thấy trong giai đoạn này cá có các cấu trúc xương đầu và xương cột sống tiếp tục phát triển, cùng với sự xuất hiện của các cấu trúc xương mới ở phần đầu như các xương hyosymplectic

(hys), ceratohyal (ch), ceratobranchial (cb) khi cá 15 ngày tuổi, xương ổ mắt orb khi cá 50 ngày tuổi; ở cột sống như xương cung mạch máu (ha) ở 15 ngày tuổi, các đốt sống cuối khi cá 20 ngày tuổi và đặc biệt là các cung thần kinh, cung mạch máu (ha) và các gai thần kinh (ns), gai mạch máu (hs) khi cá 35 ngày tuổi. Các kết quả của chúng tôi khá tương đồng với những kết quả nghiên cứu trước đây về trật tự hình thành và phát triển khoáng hóa của các xương trên cá medaka [5, 6]. Đặc biệt, sự hình thành các cung thần kinh (na, Hình 4D) và cung mạch máu (ha, Hình 4D) của các đốt sống là rất quan trọng cho việc bảo vệ sự phát triển của tủy sống và mạch máu. Đây là những cung xương luôn được thay đổi đường kính nhờ quá trình tái tạo xương để tạo đủ

không gian cho tủy sống và mạch máu đang phát triển. Điều này cũng đã được chứng minh trong các nghiên cứu trước đây của chúng tôi và một số nhóm khác cho thấy ở các cung xương này có sự phân bố của các tế bào hủy xương cùng với các tế bào tạo xương làm nhiệm vụ tái tạo xương ở các cung xương này qua đó thay đổi đường kính của các cung xương [7,8]. Nghiên cứu mới đây của chúng tôi cũng đã cho thấy khi tế bào hủy xương bị mất chức năng, khoảng không gian trong các cung xương này bị xương lấp đầy, gây ảnh hưởng đến sự phát triển và hình thái của tủy sống, mạch máu, dẫn đến sự biến đổi hình thái và hoạt động sống của cá [7]. Sự phát triển và khoáng hóa của vây xuất hiện muộn nhất, bắt đầu từ vây đuôi (khi cá 9 ngày tuổi) đến vây ngực, vây hậu môn, vây lưng. Đến ngày thứ 60 hầu hết các vây cá đã hóa xương nhưng vây lưng mới được bắt đầu hóa xương ở một số tia vây (Hình 6B). Các kết quả nghiên cứu này của chúng tôi sẽ bổ sung với những kết quả nghiên cứu trước đây [1,2,7,8], tạo ra nguồn cơ sở dữ liệu cho những nghiên cứu về xương trên mô hình cá medaka.

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 15 đến 60 ngày tuổi. Cùng với những dữ liệu đã công bố trước đây về sự phát triển xương cá ở giai đoạn sớm từ 0-10 ngày tuổi, những 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. Lại Thị Nguyệt, Phạm Thị Thanh, 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 19(2): 10-16.

2. Phạm Thị Thanh, Phạm Văn Cường, Trần Đức Long, Tô Thanh Thúy (2015) Sự phát triển xương của cá medaka (*Oryzias latipes*) | Tạp chí sinh lý học Việt Nam 19(3):8-16

3. Chatani M. Takano Y., and Kudo A. (2011) Osteoclasts in bone modeling, as revealed by in vivo imaging, are essential for organogenesis in fish. Dev Biol. 360(1): 96-109.

4. Langille R.M., Hall B.K. (1988) Development of the Head Skeleton of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes* (Teleostei). Journal of Morphology. 193(2): 135-158.

5. Inohaya K., Takano Y., and Kudo A. (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):3031-46

6. Renn J. and Winkler C. (2009) Osterix-mCherry transgenic medaka for in vivo imaging of bone formation. Dev Dyn. 238(1):241-8.

7. ToT.T., P.E. Witten, A. Huysseune, and C. Winkler (2015) An adult osteopetrosis model in medaka reveals the importance of osteoclast function for bone remodeling in teleost fish. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 178:68-75

8. ToT.T., P.E. Witten, J Renn (2012) Rankl-induced osteoclastogenesis leads to loss of mineralization in a medaka osteoporosis model. Development. 139(1): 141-50.

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, ĐHQGHN 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) II

Pham Thi Thanh¹, Pham Van Cuong¹, Tran Duc Long¹, To Thanh Thuy¹
¹Faculty of Biology, VNU University of Science

We have studied chronological bone mineralization development in medaka fish from 1 day to 2 months of age. In the part I paper published in the Vietnam Journal of Physiology Vol.19 No.3 we reported results obtained from the fish of 1 to 10 days of age. This paper describes and analyzes the bone mineralization development of the fish from 15 days to 2 months of age. Hallmarks for bone mineralization during this period are further development of head skeletal bone structures and the formation of first cranial bone structures; the formation of neural and hemal canals by fusing of paired neural arches and of paired hemal arches of each vertebra, respectively; and the mineralization of fins in chronological order including pectoral fins, anal fins, and dorsal fins.

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