

Ảnh hưởng mãn tính của phơi nhiễm Bisphenol A lên cá sọc ngựa (*Danio rerio*) ở giai đoạn Juvenile

Ngô Thị Mai¹, Đoàn Thị Phương Thảo², Võ Thị Ngọc Diễm², Nguyễn Thành Công³, Lê Phi Nga^{4,*}

TÓM TẮT

Giới thiệu: Bisphenol A (BPA) là chất gây rối loạn nội tiết tố, vì vậy một vài quốc gia cấm sử dụng chất này trong bao bì nhựa đựng thực phẩm và đồ chơi nhựa cho trẻ em. BPA được tìm thấy trong nước mặt ở nồng độ đo được từ ng/L- $\mu\text{g/L}$. Tuy nhiên các dữ liệu độc học về phơi nhiễm mãn tính động vật thủy sinh với BPA ở dải nồng độ này hiện tại rất ít. **Phương pháp:** Nghiên cứu này sử dụng cá sọc ngựa 30 ngày tuổi, cho phơi nhiễm với BPA 0, 1, 10 và 100 $\mu\text{g/L}$, trong 60 ngày, đây là giai đoạn tăng trưởng mạnh (Juvenile). Kết thúc thí nghiệm, tất cả cá được đo chiều dài, cân trọng lượng, lấy mô gan tươi để đánh giá bệnh học. **Kết quả:** Chiều dài và trọng lượng cá tăng hơn ở nhóm phơi nhiễm với BPA 100 $\mu\text{g/L}$ so với các nhóm khác. Cũng chỉ ở nhóm này quan sát thấy sự thay đổi hình thái tế bào gan như tăng số lượng và kích thước không bào, trương nở nhân và tế bào chất, giảm glycogen và tăng lipid, nhưng không có hiện tượng viêm. Cá trong các nhóm phơi nhiễm với nồng độ BPA < 100 $\mu\text{g/L}$ cho thấy các điểm cuối đáp ứng không có sự khác biệt so với nhóm đối chứng. **Kết luận:** Phơi nhiễm mãn tính với BPA 100 $\mu\text{g/L}$ lên cá sọc ngựa ở giai đoạn Juvenile gây tăng trọng lượng, chiều dài làm thay đổi hình thái tế bào gan, có thể gây hại lên chức năng gan.

Từ khóa: bisphenol A, *Danio rerio*, giai đoạn Juvenile, hình thái tế bào gan, phơi nhiễm mãn tính

¹Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

²Bộ môn Giải phẫu bệnh, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh.

³Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Quốc tế, ĐHQG-HCM.

⁴Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM.

Liên hệ

Lê Phi Nga, Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM.

Email: lephinga@hcmut.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 07-12-2018
- Ngày chấp nhận: 14-6-2019
- Ngày đăng: 25-6-2019

DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjsee.v3i1.468>



Bản quyền

© ĐHQG TP.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



GIỚI THIỆU

Bisphenol A (BPA) là một trong số các chất gây rối loạn nội tiết (nhóm chất EDCs) hiện đang được sử dụng rất phổ biến và có thể ảnh hưởng tiêu cực tới môi trường sinh thái và con người. Cơ quan bảo vệ môi trường US- EPA và chương trình độc học Quốc gia (NTP) của Hoa Kỳ đã xếp BPA ở vị trí thứ 3 trong 309 hóa chất có chỉ số ToxPi về ưu tiên độc học được kiểm định dựa trên khả năng tương tác với một số con đường tín hiệu sinh hóa học¹. Gần đây nhất Jone Corrales (2015)² đã có một tổng quan đồ sộ từ 500 nghiên cứu trên thế giới về BPA trong môi trường từ nguồn thải đến nước mặt, chất thải, bùn thải, trầm tích, đất, không khí, động vật hoang dã cho tới con người. BPA được công bố phát hiện ở châu Á, châu Âu và Bắc Mỹ. Nồng độ của BPA trong nước mặt từ 0-35 $\mu\text{g/L}$, trong nước thải đầu ra của các nhà máy xử lý nước thải là từ 0-370 $\mu\text{g/L}$, tuy nhiên hầu hết các kết quả phân tích < 5 $\mu\text{g/L}$. Ở Việt Nam, Tâm và cộng sự (2016)³ cho thấy, nồng độ BPA trong nước mặt khá thấp. Vào mùa khô nồng độ BPA trong các kênh trong thành phố Hồ Chí Minh khoảng 144 ng/L. Vào mùa mưa con số này khoảng 24,8-66,8 ng/L. Có một thực tế trái ngược là, trong khi sự phơi nhiễm với BPA hầu như ở nồng độ ng/L – $\mu\text{g/L}$ ^{4,5} thì các nghiên cứu độc tính của BPA phần lớn lại tập trung ở nồng độ cao, mg/L⁶⁻⁹. Rất

ít nghiên cứu phơi nhiễm ở nồng độ $\mu\text{g/L}$ ¹⁰. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng cá sọc ngựa làm mô hình nghiên cứu độc tính mãn tính theo chỉ dẫn của OECD¹¹ với khoảng nồng độ phơi nhiễm BPA 1-100 $\mu\text{g/L}$, là khoảng được ghi nhận cao nhất ở một số nơi trong môi trường sinh thái trên thế giới^{3,12}. BPA thuộc ECDs, do đó chúng tôi giả thiết rằng ngoài tác động lên sinh sản như nhiều nghiên cứu cho thấy, chất này cũng có thể tác động đến chuyển hóa sinh hóa bình thường của sinh vật, đặc biệt ở giai đoạn tăng trưởng. Ngô Thị Mai (2017)¹³ đã phơi nhiễm mãn tính cá sọc ngựa giai đoạn tăng trưởng mạnh (Juvenile: 30-90 ngày tuổi) với 1-100 $\mu\text{g/L}$ BPA. Kết quả cho thấy chất này có tác động lên biểu hiện hệ protein gan có vai trò trong chuyển hóa sinh hóa của gan. Nghiên cứu của chúng tôi lặp lại điều kiện thử nghiệm mãn tính như nghiên cứu của Ngô Thị Mai (2017)¹³ với điểm cuối quan sát khác biệt đó là những thay đổi về tăng trưởng của cơ thể (kích thước và trọng lượng) và hình thái tế bào gan cá. Những thay đổi này, nếu xác định được, chính là hệ quả của tác động đã được chỉ ra ở mức protein như đã biết.

Trích dẫn bài báo này: Thị Mai N, Thảo D T P, Ngọc Diễm V T, Thành Công N, Phi Nga L. **Ảnh hưởng mãn tính của phơi nhiễm Bisphenol A lên cá sọc ngựa (*Danio rerio*) ở giai đoạn Juvenile.** *Sci. Tech. Dev. J. - Sci. Earth Environ.*; 3(1):37-45.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng và nguyên vật liệu

Cá sọc ngựa (*Danio rerio*) thu mua từ trại cá giống Thủ Đức, TP. Hồ Chí Minh, được nuôi và cho sinh sản qua ít nhất hai vòng đời trong điều kiện phòng thí nghiệm độc học. Môi trường nước ngọt nhân tạo được pha chế từ nước siêu sạch với các loại muối khoáng và nguyên tố vi lượng có độ tinh sạch >98% (Sigma, Merck). BPA tinh khiết (>99%) là của Sigma Aldrich. Ethanol tinh khiết (>99%) được dùng làm dung môi hòa tan BPA.

Đánh giá ảnh hưởng mãn tính của phơi nhiễm BPA lên sự tăng trưởng

Điều kiện thí nghiệm phơi nhiễm mãn tính với BPA tuân thủ theo OECD TG 234¹¹, bao gồm các lô 1µg/L, 10 µg/L, 100 µg/L và lô đối chứng (0µg/L BPA). Mỗi lô gồm 4 bể hình trụ chứa 2 lít nước. Mỗi bể có 10 con cá 30 ngày tuổi (bắt đầu vào giai đoạn sinh trưởng mạnh- Juvenile). Định kỳ mỗi tuần 2 lần đo các chỉ số ánh sáng, pH, nhiệt độ và oxy hòa tan. Nồng độ BPA được duy trì trong các lô thí nghiệm bằng cách thay 1/3 thể tích môi trường mới chứa BPA mới pha cứ sau mỗi 48 giờ. Số cá chết trong mỗi bể ở lô đối chứng không được vượt quá 1 con khi thí nghiệm kết thúc. Theo nghiên cứu về sự thoái hóa của BPA trong nước tự nhiên¹⁴ thì thời gian bán hủy của BPA là khoảng 28 ngày. Do đó, việc thay nước thí nghiệm sau mỗi 2 ngày vẫn đảm bảo được nồng độ BPA > 80% trong suốt 60 ngày. Kết thúc 60 ngày thí nghiệm, cá từ các lô thí nghiệm được gây mê trong nước đá lạnh rồi nhanh chóng cân trọng lượng và đo chiều dài. Thí nghiệm phơi nhiễm được thực hiện tại Phòng Độc học môi trường, Viện Môi trường và Tài nguyên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.

Phân tích mô bệnh học gan cá

Cá được gây mê bằng dung dịch MS222 chứa tricaine methane sulfonate¹⁵ để tách toàn gan và cố định trong dung dịch formalin 10%. Mô gan sau khi cố định bằng paraffin được cắt thành tiêu bản mỏng khoảng 4µm. Để đánh giá được những thay đổi tổng thể, tiêu bản được xử lý và nhuộm bằng hematoxylin và eosin¹⁶. Những tiêu bản đã nhuộm sau đó được soi trên kính hiển vi quang học với độ phóng đại từ 10x - 400x để xác định những thay đổi về mặt bệnh học ở gan.

Các tiêu bản của nhóm phơi nhiễm với BPA được so sánh với nhóm đối chứng dựa trên 6 vấn đề về hình thái học tế bào phổ biến đáp ứng với chất độc trên gan mà không gây u, bao gồm những thay đổi sau¹⁶: (1)

tình trạng không bào theo 3 mức độ: hầu như không có (+/-), có không bào rõ rệt (+) và số lượng không bào nhiều, phân bố khắp tế bào (2+); (2) bào tương tế bào gan bị kiềm hóa; (3) sự trương lên của nhân hoặc bào tương với các hạch nhân nổi rõ; (4) các loại phản ứng viêm như sự thâm nhập của đại thực bào; (5) viêm hạt (granuloma); (6) xơ gan/chai gan (fibrosis và cirrhosis).

Một vài tiêu bản sau đó được chọn ngẫu nhiên để tiến hành nhuộm PAS để có thêm được những bằng chứng về sự mất đi hay suy giảm glycogen¹⁶. Phương pháp này được sử dụng là để khẳng định thêm về tình trạng chuyển hóa của glycogen được chỉ ra trong nghiên cứu của Ngô Thị Mai, 2017¹³ trong gan theo ba xu hướng: hoặc là vẫn duy trì bình thường (khuếch tán dương) hoặc là bị suy giảm (dương tính nhưng xuất hiện cục bộ) hoặc là không có glycogen (âm tính) mà được thay thế bằng các không bào. Phân tích mô gan được thực hiện tại Bộ môn Giải phẫu bệnh, Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đánh giá điều kiện phơi nhiễm mãn tính

Ở Bảng 1 cho thấy các yếu tố môi trường thí nghiệm đã ghi nhận trong suốt 60 ngày thí nghiệm. Chỉ số oxy hòa tan ở môi trường nước nuôi cá ở cả hai nhóm đối chứng ($7,67 \pm 0,44$ mg O₂/L) và nhóm phơi nhiễm ($7,70 \pm 0,46$ mg O₂/L) với BPA tương đương với 90% lượng oxy bão hòa ở nhiệt độ 27 °C. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về điều kiện môi trường thí nghiệm giữa nhóm đối chứng và nhóm bị phơi nhiễm với BPA, kiểm định $t_{test} = -0,22 < t_{17} (0,05) = 2,03$.

Tương tự, nhiệt độ nước trong tất cả các lô thí nghiệm và đối chứng duy trì ở $27,0 \pm 0,3$ (°C). Kiểm định $t_{test} = 0,62 < t_{17} (0,05) = 2,11$ cho thấy nhiệt độ nước trong quá trình thí nghiệm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm đối chứng và nhóm bị phơi nhiễm với BPA.

Chỉ số pH của nước trong thí nghiệm của các bể lô đối chứng duy trì ở $7,2 \pm 0,2$ và lô phơi nhiễm với BPA duy trì ở $7,3 \pm 0,2$. Kiểm định cho thấy $t_{test} = -0,34 < t_{17} (0,05) = 2,11$, chỉ số pH của nước trong quá trình thí nghiệm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm đối chứng và nhóm phơi nhiễm.

Như vậy, các thông số môi trường trong thí nghiệm được duy trì ổn định suốt 60 ngày thí nghiệm, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm thí nghiệm với nhau và so với đối chứng. Yếu tố môi trường thí nghiệm hoàn toàn phù hợp với chuẩn OECD TG234¹¹.

Bảng 1: Các yếu tố môi trường trong suốt 60 ngày phơi nhiễm

Thông số	DO (mg O ₂ /L)		Nhiệt độ nước (°C)		pH	
	ĐC	BPA	ĐC	BPA	ĐC	BPA
Mean ±SD	7,67±0,44	7,70±0,46	27,11±0,27	27,08±0,21	7,23±0,19	7,30±0,15

Ghi chú: Mean ±SD: Trung bình ± Độ lệch chuẩn; ĐC: Nhóm đối chứng; BPA: Nhóm phơi nhiễm với BPA

Ảnh hưởng của BPA lên sự tăng trưởng

Sự tăng trưởng của cá (kích thước và trọng lượng) được khảo sát trước phơi nhiễm (30 ngày tuổi) và sau phơi nhiễm (90 ngày tuổi). Kết quả Bảng 2 cho thấy trọng lượng từng lô cá phơi nhiễm với 1µg/L và 10µg/L BPA so lần lượt với lô đối chứng đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Chỉ có lô cá phơi nhiễm với BPA 100µg/L là có trọng lượng khác biệt đáng kể với $p < 0,05$ so với lô đối chứng và so với hai lô phơi nhiễm kia. Ngoài ra, quan sát trong quá trình mổ cá lấy gan thí nghiệm cho thấy, cá bị phơi nhiễm với BPA ở nồng độ 100µg/L thường có lượng mỡ khoang bụng nhiều hơn cá đối chứng cũng như các lô phơi nhiễm nồng độ thấp (mức độ ghi nhận, chưa có dữ liệu định lượng). Đây có thể là nguyên nhân làm cho trọng lượng của cá bị phơi nhiễm với BPA 100µg/L cao hơn đáng kể.

Tương tự như kết quả phân tích về trọng lượng cá thí nghiệm ở trên, chiều dài từng nhóm cá phơi nhiễm với BPA 1µg/L và BPA 10µg/L so lần lượt với nhóm đối chứng đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Chỉ có nhóm cá phơi nhiễm với BPA 100 µg/L so với nhóm đối chứng thì chiều dài cá có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Chiều dài và trọng lượng cơ thể cá trước và sau thí nghiệm được chuyển sang tỷ số BMI (bằng cân nặng (g) chia cho bình phương chiều dài (cm²). Chỉ số này được dùng để đánh giá trình trạng béo phì ở chuột¹⁷, chim¹⁸ và rùa¹⁹. Chỉ số này tuy nhiên không cho thấy có sự khác biệt đáng kể giữa các lô cá phơi nhiễm với BPA với nhau và so với đối chứng (Bảng 2).

Ảnh hưởng của BPA lên hình thái mô gan

Gan cá phơi nhiễm với BPA có sự thay đổi về mô học so với các mẫu mô ở lô đối chứng, nhưng không quan sát thấy các phản ứng viêm. Các tế bào gan có xu hướng xuất hiện với mật độ dày hơn. Trên trường kính xuất hiện nhiều không bào, điều này cho thấy đã có sự thay đổi trong mô để đáp ứng với sự tăng lên/giảm đi hoặc của lipid hoặc của glycogen, hoặc tăng lên của cả lipid và glycogen²⁰. Đặc biệt quan sát thấy rõ rệt ở lô phơi nhiễm BPA 100µg/L. Ngoài ra, mẫu mô phơi nhiễm BPA 100µg/L còn quan sát thấy được cả sự kiềm hóa trong bào tương, sự trương lên của nhân tế bào và bào tương, hạch nhân nổi rõ. Đối

với các phản ứng viêm (sự thâm nhập của đại thực bào, sự viêm dạng hạt và sự xơ hóa gan/chai gan) đều không quan sát thấy ở cả hai nhóm phơi nhiễm với BPA và nhóm đối chứng. Kết quả đánh giá về mô bệnh học trên gan cá sau thí nghiệm được thể hiện tại Bảng 3 và Hình 1.

Tế bào gan cá phơi nhiễm với BPA 100 µg/L được chọn ngẫu nhiên cho thí nghiệm nhuộm PAS để xác nhận lại sự tồn tại của không bào, qua đó củng cố thêm về giả thiết về khả năng bị suy giảm glycogen gan. Tế bào hoàn toàn không bắt màu đỏ tươi cho thấy không có sự tồn tại của nhiều glycogen trong gan (Hình 2). Như vậy, đã có sự suy giảm glycogen gan ở cá bị phơi nhiễm với BPA 100µg/L. Rất tiếc là do gan cá sọc ngựa quá nhỏ, để vỡ trong quá trình cắt lát mô, nên nghiên cứu này đã không đủ mẫu của nhóm đối chứng, để có thể kết luận chắc chắn hơn về sự suy giảm glycogen gây bởi BPA.

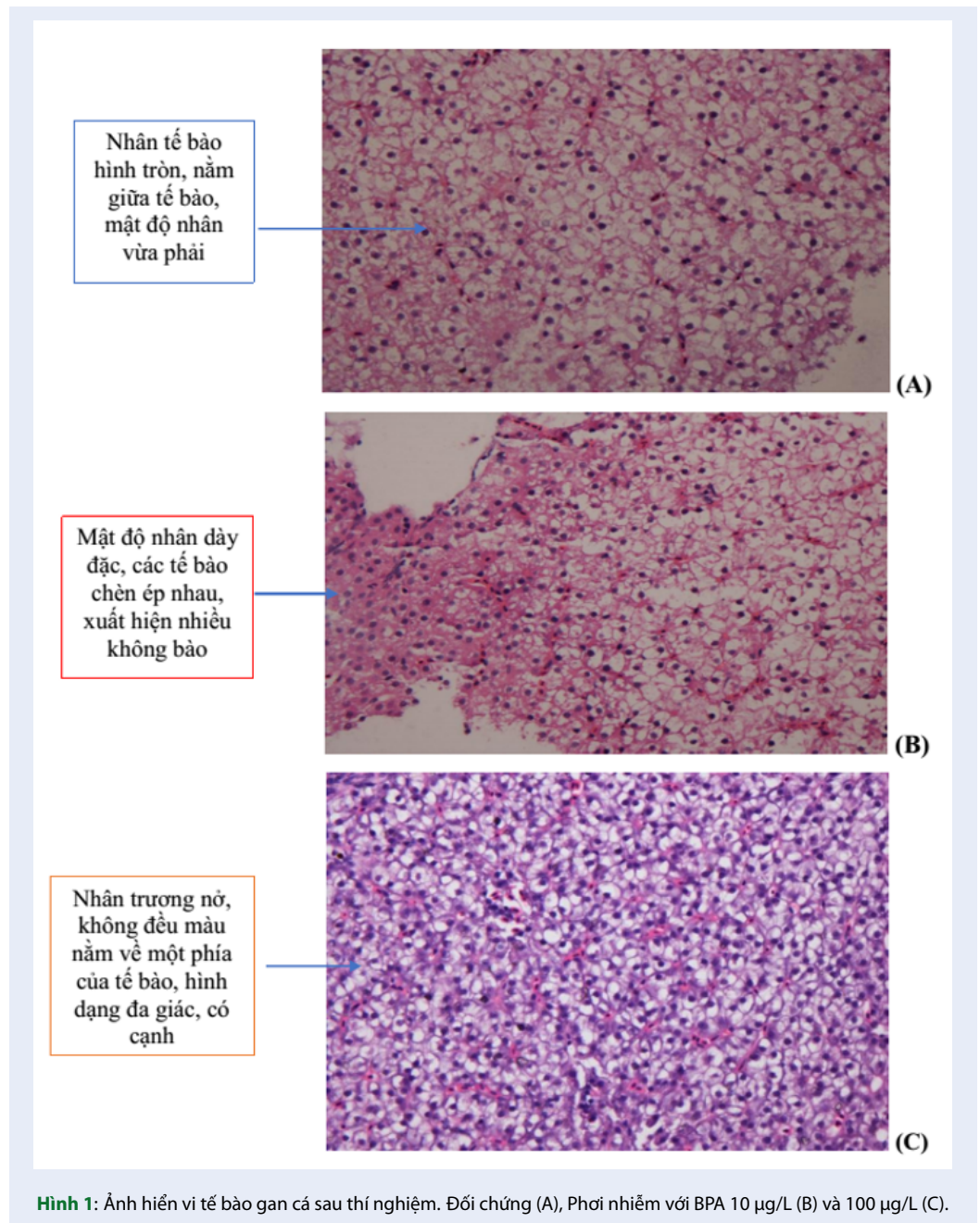
THẢO LUẬN

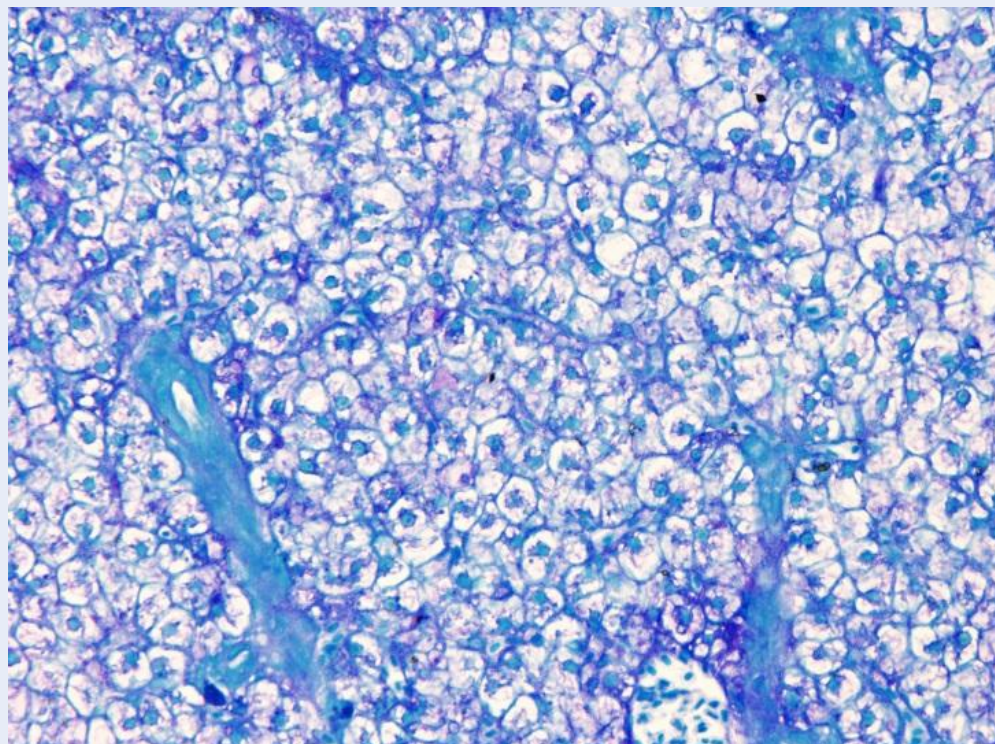
BPA thuộc nhóm gây rối loạn nội tiết tố mà trong giai đoạn tăng trưởng Juvenile vai trò của nội tiết tố tăng trưởng rất quan trọng. Nghiên cứu này cho thấy phơi nhiễm BPA gây ảnh hưởng lên tăng trưởng phụ thuộc nồng độ BPA. Phơi nhiễm BPA 100 µg/L đã gây nên tăng chiều dài và trọng lượng cơ thể so với đối chứng. Không thể kết luận được tăng trưởng mạnh hơn này là có lợi hay có hại cho sức khỏe của cá khi thiếu những bằng chứng trực tiếp hơn. Hiện nay những dữ liệu độc học đã công bố của BPA trên cá phơi nhiễm mãn tính ở dải nồng độ µg/L rất ít ỏi. Nhóm nghiên cứu của Lindholst (2001, 2003)^{21,22} sử dụng cá hồi cầu vồng (*Oncorhynchus mykiss*) và cá sọc ngựa để tìm hiểu mối tương quan của quá trình trao đổi chất với các đáp ứng giống hormone estrogen khi phơi nhiễm BPA 100 µg/L dựa trên lượng BPA được hấp thụ/đào thải theo thời gian 2-168 giờ. Kết quả cho thấy hiện tượng trao đổi chất xảy ra nhanh hơn ở gan cá. Ngoài ra, Rubin (2001)⁵ đã nghiên cứu về ảnh hưởng của BPA lên đời con của chuột cái thuộc giống Sprague-Dawley khi cho những con chuột mang thai uống nước có chứa BPA liều 100 µg và 1200 µg BPA/kg trọng lượng cơ thể/ngày từ ngày thứ 6 của thai kì. Những con chuột con sinh ra đã bị phơi nhiễm với BPA có trọng lượng cơ thể tăng lên và điều này được

Bảng 2: Trọng lượng và chiều dài cá trước và sau thí nghiệm

BPA ($\mu\text{g/L}$)	Trọng lượng cơ thể cá (g)		Chiều dài cá (mm)		BMI (g/cm^2)
	Trước phơi nhiễm	Sau phơi nhiễm	Trước phơi nhiễm	Sau phơi nhiễm	
0	$0,026 \pm 0,001^a$	$0,17 \pm 0,07^a$	$15,25 \pm 1,28^a$	$26,65 \pm 5,21^a$	2,38
1	$0,029 \pm 0,007^a$	$0,19 \pm 0,09^a$	$15,16 \pm 3,01^a$	$28,16 \pm 3,81^a$	2,39
10	$0,027 \pm 0,001^a$	$0,20 \pm 0,07^a$	$15,76 \pm 2,31^a$	$28,76 \pm 4,64^a$	2,42
100	$0,027 \pm 0,003^a$	$0,22 \pm 0,08^b$	$14,97 \pm 3,45^a$	$30,75 \pm 4,41^b$	2,32

Ghi chú: ^akhác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$, ^bkhác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$, $n = 37$





Hình 2: Tiêu bản nhuộm PAS tế bào gan cá sau phơi nhiễm với 100 $\mu\text{g/L}$ BPA.

Bảng 3: Khác biệt hình thái tế bào gan giữa các nhóm thí nghiệm

Mẫu	Hình thái tế bào gan	Phản ứng viêm	Đáp ứng độc học
Đối chứng	Tạo không bào chứa lipid	+/- Đại thực bào	-
	Kiểm hoá bào tương	+/- Viêm dạng hạt	-
	Trương nở nhân/không bào	+/- Xơ hoá gan/chai gan	-
BPA 10 $\mu\text{g/L}$	Tạo không bào chứa lipid	+/- Viêm dạng hạt	-
	Kiểm hoá bào tương	+/- Viêm dạng hạt	-
	Trương nở nhân/không bào	+/- Xơ hoá gan/chai gan	-
BPA 100 $\mu\text{g/L}$	Tạo không bào chứa lipid	2+ Viêm dạng hạt	-
	Kiểm hoá bào tương	2+ Xơ hoá gan/chai gan	-
	Trương nở nhân/không bào	+ Đại thực bào	-

thể hiện rất rõ ràng từ khi sinh ra và tiếp tục cho đến giai đoạn trưởng thành. Để giải thích về cơ chế gây tăng trọng lượng cơ thể ở các sinh vật bị phơi nhiễm BPA, Rubin (2009)²³ cho rằng có tới 6 lý do khác nhau BPA ảnh hưởng đến trọng lượng cơ thể của sinh vật, đó là: (1) BPA hoạt động ở giai đoạn tiền sinh tế bào mỡ, tăng cường quá trình biệt hóa của tế bào mỡ và tích lũy mỡ ở các tế bào đích; (2) Hoạt động giống estrogen cũng là một cách để BPA làm tăng lượng mỡ; (3) Thời gian mang thai là thời gian rất nhạy cảm với estrogen và những chất giống estrogen như BPA; (4) BPA hoạt động thông qua các protein thuộc nhóm ERRs, trong đó ERR α và ERR γ đóng vai trò rất quan trọng trong việc kiểm soát cân bằng nội môi cũng như các quá trình sinh học và chức năng bình thường của ty thể^{24,25}; (5) BPA điều hòa lượng mỡ tích lũy thông qua con đường tác động của thyroid hormone, qua việc kiểm soát lượng glucose; (6) BPA làm rối loạn đường truyền tín hiệu của PPAR γ một protein có vai trò rất quan trọng trong quá trình biệt hóa của tế bào mỡ, kiểm soát cân bằng năng lượng, cân bằng nội môi của lipid. Như vậy, qua nghiên cứu này, BPA đã ảnh hưởng tới quá trình trao đổi chất bên trong cơ thể sau phơi nhiễm kéo dài dẫn tới ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của cá sọc ngựa giai đoạn Juvenile.

Cá được xem là mô hình rất đáng quan tâm để nghiên cứu về độc học ở gan mà không gây u ở cả trong phòng thí nghiệm và ở ngoài hiện trường, do đó hình thái tế bào gan của nhiều loài cá đã được mô tả trước đây như cá hồi cầu vồng (*Oncorhynchus mykiss*), cá Medaka (*Oryzias latipes*), cá da trơn (*Ictalurus punctatus*)²⁶. Tương tự động vật có vú, gan cá đóng vai trò quan trọng trong việc cân bằng nội môi trong quá trình chuyển hóa của cơ thể²⁷. Tế bào gan đóng vai trò rất quan trọng trong việc thải độc tố và tổng hợp các protein huyết thanh như albumin, fibrinogen, các nhân tố bổ trợ và các protein đáp ứng cấp tính. Gan cá sọc ngựa khác với gan động vật có vú là các tế bào gan không được sắp xếp thành dây hoặc thùy. Các tế bào gan cá cái thường có xu hướng kiếm hơn tế bào gan cá đực do có sản xuất protein vitellogenin²⁸. Ngoài ra, tế bào gan cá có xu hướng có nhiều không bào để đáp ứng với mức glycogen cao hoặc mức lipid cao hoặc cả hai^{29,30}. Trong nghiên cứu này, không bào gan mở rộng và tập trung biểu hiện rất rõ ở nhóm cá phơi nhiễm với BPA nồng độ 100 $\mu\text{g/L}$ so với các nhóm khác và nhóm đối chứng (Hình 1). Điều đó cho thấy rằng phơi nhiễm với BPA ở liều thấp trong một thời gian dài có thể gây tích lũy lipid. Quan sát tế bào thấy có sự tăng kích thước không bào, đáp ứng với sự tăng lipid trong bào tương. Kết quả này khá tương đồng với kết quả nghiên cứu trên cá hồi cầu vồng (*Oncorhynchus mykiss*)²¹, Medaka (*Oryzias latipes*

) khi cho cá phơi nhiễm với bis(tri-n-butylin) oxide (TBTO), di-n-butyltindichloride (DBTC)³¹. Tuy nhiên, khác với các loài cá khác, cá sọc ngựa đang ở giai đoạn tăng trưởng khi phơi nhiễm với BPA trong thời gian dài lại có hiện tượng suy giảm glycogen trong gan (Hình 2). Theo công bố trước đây, sự mất đi của glycogen có thể xảy ra khi sinh vật bị ảnh hưởng trực tiếp của chất độc hoặc vì nguyên nhân quá đói, bị căng thẳng hoặc đang mang thai²⁰. Jayashree (2013)³² nghiên cứu về sự suy giảm glycogen trong gan chuột đực trưởng thành khi cho phơi nhiễm với BPA ở cấp độ phân tử cũng cho thấy ảnh hưởng của chất này đến quá trình chuyển tín hiệu của insulin và oxy hóa glucose trong gan. Sự oxy hóa glucose và suy giảm glycogen đều quan sát thấy ở cả các nhóm phơi nhiễm.

Ở nghiên cứu này, ngoài hiện tượng không bào lớn bất thường, những thay đổi về mặt hình thái khác cũng được quan sát thấy trong gan của nhóm cá phơi nhiễm với BPA 100 $\mu\text{g/L}$. Những thay đổi gồm sự kiểm hóa bào tương và/ hoặc nhân tế bào trương nở, nhân tế bào có gai và lệch về một bên. Những quan sát này tương đồng với kết quả ghi nhận bởi Wester (2003)³¹. Đặc biệt, không quan sát thấy các phản ứng viêm như hội tụ đại thực bào, khối u, triệu chứng xơ hóa/xơ hóa gan ở tất cả các nhóm cá phơi nhiễm với BPA so với nhóm đối chứng. Điều này không giống ở động vật có vú, khi tổn thương xảy ra, các tế bào nhu mô trong gan thường có triệu chứng bị xơ hóa trong quá trình bệnh tiến triển³¹, xơ hóa gan là một bước ít khi xảy ra dẫn tới hoại tử các tế bào gan ở cá.

KẾT LUẬN

Đáp ứng ở cá sọc ngựa khi phơi nhiễm với BPA trong suốt giai đoạn tăng trưởng Juvenile (từ 30 ngày tuổi đến 90 ngày tuổi) phụ thuộc vào nồng độ chất này trong nước. 100 $\mu\text{g/L}$ BPA là nồng độ phơi nhiễm quan sát thấy tăng kích thước và trọng lượng cơ thể cá, tuy nhiên kèm theo đó là rủi ro về thay đổi hình thái gan, có thể dẫn đến ảnh hưởng về chức năng gan. Phơi nhiễm với BPA ở nồng độ thấp hơn 100 $\mu\text{g/L}$, không gây nên những thay đổi nào đáng kể về cơ thể và cũng như tế bào gan.

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

BMI: Body Mass Index- chỉ số khối cơ thể
 BPA: Bisphenol A
 DBTC: di-n-butyltindichloride
 DO: Dissolved oxygen - oxy hòa tan
 EDCs: Endocrine Disrupting Chemicals - chất hóa học gây biến đổi nội tiết
 ERR α : Estrogen related receptor alpha - thụ thể alpha liên quan đến estrogen

ERR γ : Estrogen related receptor gamma - thụ thể dạng gamma liên quan đến estrogen

ERRs: Estrogen related receptors - thụ thể liên quan đến estrogen

NTP: National Toxicology Program- Chương trình độc học quốc gia

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development - Tổ chức Hợp tác Kinh tế và Phát triển

PAS : Periodic acid-Schiff - phương pháp nhuộm acid

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha - thụ thể hoạt hóa tiền peroxisome dạng gamma

TBTO: bis (tri-n-butylin) oxide

US-EPA: U.S. Environmental Protection Agency - Cục Bảo vệ Môi sinh Hoa Kỳ

Y ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU

Các thí nghiệm với cá sọc ngựa ở nghiên cứu này thuộc đề tài C2017-20-35 của Đại học Quốc gia TP.HCM. Đề tài đã được chấp thuận về đạo đức trong nghiên cứu y sinh học, chứng nhận bởi Viện nghiên cứu thể hệ gene, số 4-2019/NCHG-HĐĐĐ.

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả không có xung đột lợi ích.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Ngô Thị Mai, Đoàn Thị Phương Thảo, Võ Thị Ngọc Diễm và Nguyễn Thành Công là những người thực hiện thí nghiệm, thu thập và xử lý các dữ liệu thu được. Lê Phi Nga và Ngô Thị Mai đóng góp chính trong việc viết và chỉnh sửa bản thảo.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ từ đề tài C2017-20-35 của Đại học Quốc gia TP.HCM.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Reif DM, Judson RS, Richard AM, Knudsen TB, Dix DJ, Kavlock RJ, et al. Endocrine profiling and prioritization of environmental chemicals using ToxCast data. *Environmental Health Perspectives*. 2010;118(12):1714–20. Available from: DOI:10.1289/ehp.1002180.
2. Corrales J, Kristofco LA, Steele WZ, Yates BS, Breed CS, Williams ES, et al. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose Response*. 2015;13(3):1–25. Available from: DOI:10.1177/1559325815598308.
3. Le TMT, Nguyen PD, Dinh QT, Ngo HH, Do HLC. Presence of e-EDCs in surface water and effluents of pollution sources in Sai Gon and Dong Nai river basin. *Sustainable Environmental Research*. 2016;26(1):20–27. Available from: DOI:10.1016/j.serj.2015.09.001.
4. Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary Concentrations of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in a Human Reference Population. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113(4):391–396. Available from: DOI:10.1289/ehp.7534.
5. Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight,

patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environmental Health Perspectives*. 2001;109(7):675–80. Available from: DOI:10.1289/ehp.01109675.

6. Zhang W, Xiong B, Sun WF, An S, Lin KF, Gou MJ, et al. Acute and chronic toxic effects of bisphenol A on *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Toxicology*. 2014;29(6):714–22. Available from: DOI:10.1002/tox.21806.
7. Mihaich EM, Friederich U, Caspers N, Hall AT, Klecka GM, Diamond SS, et al. Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009;72(5):1392–1401. Available from: DOI:10.1016/j.ecoenv.2009.02.005.
8. Mu X, Huang Y, Lei Y, Teng M, Li X, Wang C, et al. Developmental effects and estrogenicity of bisphenol A alternatives in a zebrafish embryo model. *Environmental Science & Technology*. 2018;52(5):3222–31. Available from: DOI:10.1021/acs.est.7b06255.
9. Moreman J, Lee O, Trznadel M, David A, Kudoh T, Tyler CR. Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo-larvae. *Environmental Science & Technology*. 2017;51(21):12796–805. Available from: DOI:10.1021/acs.est.7b03283.
10. Wester PW, Canton JH. Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) and di-n-butyltindichloride (DBTC). *Aquatic Toxicology*. 1978;10(2-3):143–65. Available from: DOI:10.1016/0166-445X(87)90020-8.
11. OECD. TG No. 234: Fish Sexual Development Test. Guideline for the testing of chemicals; 2011.
12. Belfroid A, Velzen MV, Horst BVD, Vethaak D. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemospheres*. 2002;49(1):97–103.
13. Ngo TM, Do HLC, Chi, Le PN. A proteomic analysis to assess the effects of chronic exposure of bisphenol A to adult zebrafish (*Danio rerio*). *Tạp Chí Sinh học*. 2017;39(3):333–374. Available from: DOI:10.15625/0866-7160/v39n3.98995.
14. Dorn PB, Chou CS, Gentempo JJ. Degradation of Bisphenol A in natural waters. *Chemosphere*. 1978;16(7):1501–07. Available from: DOI:10.1016/0045-6535(87)90090-7.
15. Matthews M, Varga ZM. Anesthesia and Euthanasia in Zebrafish. *ILAR Journal*. 2012;53(2):192–204. Available from: DOI:10.1093/ilar.53.2.192.
16. Bộ Y tế. Hướng dẫn qui trình kỹ thuật chuyên ngành giải phẫu bệnh, tế bào học. NXB Y học; 2016: 248-250.
17. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*. 2007;41:111–120.
18. Brown ME. Assessing body condition in birds. In: Nolan V, Kittleron ED, editors. *Current Ornithology*. New York: Plenum Press; 1996. p. 67–135.
19. Berry KH, Christopher MM. Guidelines for the field evaluation of desert tortoise health and disease. *Journal of Wildlife Diseases*. 2001;37:427–50.
20. Wolf JC, Wolfe MJ. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology*. 2005;33(1):75–85. Available from: DOI:10.1080/01926230590890187.
21. Lindholst C, Wynne PM, Marriott P, Pedersen SN, Bjerregaard P. Metabolism of bisphenol A in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to estrogenic response. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology*. 2003;135(2):169–77.
22. Lindholst C, Pedersen SN, Bjerregaard P. Uptake, metabolism and excretion of bisphenol A in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 2001;55(1-2):75–84.
23. Rubin BS, Soto AM. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Molecular Cell Endocrinology*. 2009;304(1-2):55–62. Available from: DOI:10.1016/j.mce.2009.02.023.
24. Keiter S, Baumann L, Frber H, Holbech H, Skutlarek D, Engwall M, et al. Long-term effects of a binary mixture of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and bisphenol A (BPA) in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*. 2012;118-119:116–29. Available from: DOI:10.1016/j.aquatox.2012.04.003.

25. Moon MK, Kim MJ, Jung IK, Koo YD, Ann HY, Lee KJ, et al. Bisphenol A Impairs Mitochondrial Function in the Liver at Doses below the No Observed Adverse Effect Level. *Journal of Korean Medical Science*. 2012;27(6):644–52.
26. Boorman GA, Botts S, Bunton TE, Fournie JW, Harshbarger JC, Hawkins WE, et al. Diagnostic criteria for degenerative, inflammatory, proliferative nonneoplastic and neoplastic liver lesions in medaka (*Oryzias latipes*): consensus of a National Toxicology Program Pathology Working Group. *Toxicologic Pathology*. 1997;25(2):202–10. Available from: DOI:10.1177/019262339702500210.
27. Roberts RJ, Ellis AE. The anatomy and physiology of teleosts. *Fish Pathology*, 3th Edition; 2001: 12–54.
28. Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek AP, Woutersen RA. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic Pathology*. 2011;39(5):759–75. Available from: DOI: 10.1177/0192623311409597.
29. Ferguson HW. *Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Comparative Tissue Responses in Diseases of Teleosts*. 1st Edition: Iowa State; 1989.
30. Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*. 2003;188(2-3):117–41.
31. Wester PW, Brandhof EVD, Vos JH, Ven LVD. Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) and di-n-butyltin dichloride (DBTC). *Aquatic Toxicology*. 1978;10(2-3):143–65. RIVM report. Available from: 10.1016/0166-445X(87)90020-8.
32. Jayashree S, Indumathi D, Akilavalli N, Sathish S, Selvaraj J, Balasubramanian K. Effect of Bisphenol-A on insulin signal transduction and glucose oxidation in liver of adult male albino rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013;35(2):300–310. Available from: DOI:10.1016/j.etap.2012.12.016.

Chronic effects of bisphenol an exposure on zebrafish (*Danio rerio*) at juvenile state

Ngo Thi Mai¹, Doan Thi Phuong Thao², Vo Thi Ngoc Diem², Nguyen Thanh Cong³, Le Phi Nga^{4,*}

ABSTRACT

Introduction: Bisphenol A (BPA) is an endocrine disrupting chemical, therefore some countries have banned the use of it in plastic containers for food storage and plastic toys for children. BPA can be found in natural waters with measured concentrations varying from ng/l to $\mu\text{g/l}$. However, in fact that the chronic ecotoxicology data obtained from aquatic animals for BPA exposure at these levels are quite few. **Methods:** In this study zebrafish at 30 days of age were exposed to four variants 0, 1, 10 and 100 $\mu\text{g/l}$ BPA along 60 days, which is the fasted growth period in zebrafish (Juvenile stage). At the end of the experiments, all fish weight and length were measured and their fresh livers were used for histological assessment. **Results:** The results showed that weight and length of fish in 100 $\mu\text{g/l}$ BPA group increased significantly as compared with that in the other experimental groups. Also only in this group, changes in hepatic morphology such as vacuolar number and size increasement, cytoplasmicand/or nuclear enlargement, glycogen reduction, lipid enhancement, were observed, but especially no significant inflammation. Fish in the other groups exposed to BPA concentrations $<100\mu\text{g/l}$ had no change in all targeted endpoints as compared with that of the control. **Conclusion:** Chronic exposure of 100 $\mu\text{g/L}$ BPA to zebrafish along the fast-growth period (Juvenile) caused increasement of weight and length, and altered morphology of hepatic cells, that may harm to liver functions.

Key words: bisphenol A, chronic exposure, *Danio rerio*, Juvenile stage, hepatic morphology

¹Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM

²Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Medicine and Phamarcology at Ho Chi Minh City

³School of Biotechnology, International University, VNU-HCM

⁴Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology, VNU-HCM

Correspondence

Le Phi Nga, Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology, VNU-HCM

Email: lephinga@hcmut.edu.vn

History

- Received: 07-12-2018
- Accepted: 14-6-2019
- Published: 25-6-2019

DOI :

<https://doi.org/10.32508/stdjsee.v3i1.468>



Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Mai N T, Thao D T P, Diem V T N, Cong N T, Nga L P. **Chronic effects of bisphenol an exposure on zebrafish (*Danio rerio*) at juvenile state.** *Sci. Tech. Dev. J. - Sci. Earth Environ.*; 3(1):37-45.