



## NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MELAMINE GÂY HÌNH THÀNH TINH THỂ SỎI TIẾT NIỆU Ở RUỒI GIÁM (*Drosophila melanogaster*) VÀ ỨNG DỤNG TRONG SÀNG LỌC DUỢC LIỆU CÓ HOẠT TÍNH LÀM TAN TINH THỂ

Huỳnh Hồng Phiên và Trần Thanh Mến\*

Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

\*Tác giả liên hệ (Corresponding author): ttmen@ctu.edu.vn

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 05/01/2024

Sửa bài (Revised): 27/02/2024

Duyệt đăng (Accepted): 23/05/2024

**Title:** Studying the effects of melamine in causing urinary stone crystals in *Drosophila melanogaster* and application for screening of pharmaceutical materials with urinary stone-dissolving properties

**Author(s):** Huynh Hong Phien and Tran Thanh Men\*

**Affiliation(s):** College of Natural Sciences, Can Tho University

### TÓM TẮT

*Drosophila melanogaster* là sinh vật mô hình mẫu để sàng lọc sơ bộ các hợp chất và dược liệu tiềm năng để điều trị sỏi tiết niệu. Nghiên cứu này sử dụng melamine như một chất tạo tinh thể trong các ống Malpighian của *D. melanogaster*, đồng thời đánh giá tác động của nó lên các chỉ tiêu khác nhau như vòng đời, sự phát triển, khả năng vận động và khả năng chống chịu stress oxy hóa ở *D. melanogaster*. Các phát hiện chứng minh rằng melamine ảnh hưởng đáng kể đến vòng đời, sự phát triển và khả năng di chuyển của *D. melanogaster*. Các phân tích đã xác định nồng độ melamine ở nồng độ 2 mM là phù hợp để tạo ra sự hình thành tinh thể sỏi tiết niệu ở ruồi gián, với tỷ lệ hình thành tinh thể là  $93,33 \pm 5,77\%$ . Ngoài ra, chiết xuất được phârm có nguồn gốc từ kim tiền thảo đã cho thấy hiệu quả đáng kể trong việc làm giảm các tinh thể sỏi tiết niệu do melamine gây ra. Những kết quả này cho thấy sự phù hợp của mô hình sỏi tiết niệu do melamine gây ra ở ruồi gián để sàng lọc ban đầu các chiết xuất thực vật có khả năng hòa tan các tinh thể sỏi tiết niệu do melamine hình thành.

**Từ khóa:** *Drosophila melanogaster*, Malpighian, melamine, sỏi tiết niệu

### ABSTRACT

*Drosophila melanogaster* serves as an excellent model organism for the preliminary screening of compounds and potential medicinal herbs to treat urinary stones. This study utilized melamine as a crystal-forming agent in the Malpighian tubules of *D. melanogaster*, concurrently evaluating its impact on various parameters such as the life cycle, development, locomotion activity, and oxidative stress tolerance in *D. melanogaster*. The findings demonstrate that melamine significantly influences the life cycle, development, and mobility of *D. melanogaster*. Experimental analyses determined that a melamine concentration of 2 mM is optimal for inducing urinary stone crystal formation in fruit flies, with a crystal formation rate of  $93.33 \pm 5.77\%$ . Additionally, pharmaceutical extracts derived from *Desmodium styracifolium* have exhibited notable efficacy in reducing melamine-induced urinary stone crystals. These results underscore the suitability of the urinary stone model induced by melamine in fruit flies for the initial screening of plant extracts with the potential to dissolve urinary stone crystals formed by melamine.

**Keywords:** *Drosophila melanogaster*, Malpighian, melamine, urolithiasis

## 1. GIỚI THIỆU

Melamine là một hợp chất tổng hợp, được sử dụng phổ biến dùng trong sản xuất nhựa, bát đĩa, dụng cụ nhà bếp và chất kết dính, được chứng minh là yếu tố góp phần gây ra tổn thương thận cấp tính và các bệnh ở thận trong đó có sỏi tiết niệu (Hau et al., 2009). Thực phẩm nhiễm melamine có thể gây sỏi thận ở động vật và con người.

Ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*) là một mô hình đã được ứng dụng thành công trong nhiều nghiên cứu bệnh ở người trên nhiều hệ cơ quan (Allocca et al., 2018). Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh ruồi giấm có nhiều thuận lợi trong các nghiên cứu liên quan đến bệnh sỏi tiết niệu (Chen et al., 2011; Rose et al., 2019; Ghimire et al., 2019). Hệ thống thận của ruồi giấm bao gồm các tế bào thận và các ống Malpighian. Ống Malpighian của ruồi giấm tương tự như ống thận của động vật có vú cả về chức năng và cấu trúc (Wang et al., 2022). Sử dụng *D. melanogaster* đã thành công tạo ra sỏi calcium oxalate có trong ống Malpighian của ruồi giấm, xác định vai trò của chất đồng vận chuyển oxalate (SLC26A6) và vai trò của kẽm dư thừa trong việc hình thành sỏi (Chi et al., 2015). Chen et al. (2012) đã nghiên cứu và chứng minh melamine tại các nồng độ khảo sát 0,01; 0,05 và 0,1% có tác dụng tạo các tinh thể trong hệ thống ống Malpighian ở ruồi. Từ đó cho thấy ruồi giấm có nhiều đặc điểm thuận lợi ứng dụng trong việc sàng lọc ban đầu để tìm ra các loài thảo dược có hoạt tính hòa tan tinh thể cho bệnh sỏi tiết niệu.

Kim tiền thảo (KTT) có tên khoa học là *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr. Chúng là một trong những loại thảo mộc truyền thống phổ biến nhất của Trung Quốc, và phân trên mặt đất của nó đã được sử dụng rộng rãi trong điều trị lâm sàng cho bệnh sỏi tiết niệu. KTT được chứng minh là có vai trò làm giảm sự lắng đọng tinh thể calcium oxalate trong thận và làm giảm tổn thương do tinh thể gây ra thông qua khả năng chống viêm và chống oxy hóa (Hou et al., 2018). Trong nghiên cứu này sử dụng được phẩm KTT có bán tại các nhà thuốc để khảo sát khả năng làm tan tinh thể sỏi tiết niệu trên mô hình ruồi giấm.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Phương tiện

Đối tượng thí nghiệm: Ruồi giấm hoang dại *Drosophila melanogaster* chủng Canton S (CS) được cung cấp từ phòng thí nghiệm Biofunctional Chemistry (Viện Công nghệ Kyoto, Nhật Bản).

Hóa chất: Melamine (1,3,5-triazine-2,4,6-triamine) (Himedia laboratories-Ấn Độ), được phẩm KTT (công ty được phẩm OPC-Việt Nam), Acid propionic ( $C_2H_5COOH$ ) (Meck KGaA-Đức), sodium benzoate (Himedia laboratories-Ấn Độ), agar (Hải Long-Việt Nam), ethanol 99,5% (Xilong scientific, Trung Quốc), Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipiridinium dichloride) (PQ) (Việt Nam).

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Khảo sát sự ảnh hưởng của melamine lên vòng đời và sự phát triển của ruồi giấm

Thành phần môi trường thức ăn ở nghiệm thức khảo sát có bổ sung thêm melamine với các nồng độ khảo sát là 0,5; 1; 2; 4; 6 và 8 mM vào thức ăn. Năm ruồi đực và 5 ruồi cái mới nở được chọn trong vòng 2 ngày và chửa giao phối, cho chúng giao phối trong 24 giờ, loại bỏ ruồi bố mẹ, giữ trứng và để chúng phát triển trong môi trường thử nghiệm. Kết quả ghi nhận bao gồm: thời gian và số lượng áu trùng giai đoạn 3 xuất hiện; thời gian, số lượng nhộng đầu tiên và tổng số nhộng sau 10 ngày (tính từ ngày đầu tiên thí nghiệm); thời gian, số lượng ruồi nở đầu tiên và tổng số ruồi nở sau 14 ngày (tính từ ngày đầu tiên thí nghiệm).

#### 2.2.2. Khảo sát sự ảnh hưởng của melamine lên khả năng vận động (Locomotion assay)

Khảo sát sự ảnh hưởng của melamine lên khả năng vận động được thực hiện theo miêu tả của Chaudhuri et al. (2007). Quy trình thực hiện như sau: 20 ruồi đực được nuôi 14 ngày trong môi trường có bổ sung melamine 2 mM và môi trường thức ăn tiêu chuẩn được sử dụng làm đối chứng được đặt trong lọ nhựa rỗng. Sau thời gian nghỉ 10 phút, tiến hành gõ lọ nhựa sao cho những con ruồi xuống đáy lọ và số lượng ruồi có thể leo lên 5 cm trong 6 giây được ghi lại. Các thử nghiệm được lặp lại ba lần, mỗi lần cách nhau 10 phút.

#### 2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của melamine đến khả năng chống chịu stress oxy hóa

Độc tính do PQ gây ra thể hiện qua sự oxy hóa khử và tạo ra các gốc tự do nội sinh (Castello et al., 2007).Thêm vào đó, PQ có khả năng phá hủy tế bào ruồi giấm (Chaudhuri et al., 2007) và chuột (Li et al., 2005; Prasad et al., 2009). Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) là một chất oxy hóa mạnh, là sản phẩm của quá trình oxy hóa tế bào. Ảnh hưởng của melamine đến khả năng chống chịu stress oxy hóa được khảo sát dựa theo phương pháp của Peng et al. (2012). Ruồi đực trưởng thành (1 ngày tuổi) được cho ăn theo chế độ ăn tiêu chuẩn hoặc bổ sung melamine (2 mM) trong 10 ngày. Sau đó, khả năng chống chịu

stress oxy hóa của ruồi trong điều kiện  $H_2O_2$  10% hoặc PQ (2 mM) được khảo sát. Số lượng ruồi chết được ghi nhận lại sau mỗi 4 giờ cho đến khi tất cả ruồi chết hết. Kết quả ghi nhận bao gồm: thời gian sống sót trung bình (giờ), thời gian sống sót 50% (giờ), thời gian sống sót 10% (giờ).

#### 2.2.4. Khảo sát sự hình thành tinh thể biểu hiện của sỏi tiết niệu trong óng Malpighian và tác dụng làm tan tinh thể sỏi của dược phẩm chiết xuất từ thảo dược KTT

Khảo sát sự hình thành tinh thể biểu hiện của sỏi tiết niệu trong óng Malpighian trên mô hình ruồi giấm được thực hiện theo miêu tả của Han et al. (2019). Melamine 2 mM (được sử dụng làm tác nhân gây sỏi tiết niệu trên mô hình ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*)). Một trăm con ruồi đực mới nở được chọn trong vòng 24 giờ, để chúng phát triển trong hai loại môi trường: môi trường thức ăn tiêu chuẩn và môi trường có bổ sung melamine. Sau 10 ngày, 20 con ruồi ở mỗi nghiệm thức lần lượt được gây mê bằng  $CO_2$ , sau đó tiến hành giải phẫu trong phosphate buffered saline (PBS) lạnh. Các óng Malpighian giải phẫu được cõi định trong formaldehyde 4% trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ

**Bảng 1. Ảnh hưởng của các nồng độ melamine lên vòng đời ruồi giấm**

Nồng độ	Giai đoạn 3		Giai đoạn nhộng		Ruồi trưởng thành	
	Thời gian xuất hiện (ngày)	Số lượng (con)	Thời gian xuất hiện (ngày)	Số lượng xuất hiện đầu tiên (nhặng)	Tổng số nhặng sau 10 ngày	Thời gian xuất hiện (ngày)
Đối chứng	4	$8 \pm 2,31^a$	6	$100 \pm 8,14^a$	$123 \pm 13,32^a$	9
0,5mM	4	$6 \pm 5,20^{ab}$	6	$78 \pm 23,63^a$	$98 \pm 2,08^{ab}$	10
1 mM	4	$5 \pm 1,00^{ab}$	6	$67 \pm 17,35^{ab}$	$85 \pm 23,43^{bc}$	10
2 mM	4	$5 \pm 2,52^{ab}$	6	$34 \pm 11,14^{bc}$	$56 \pm 6,81^c$	10
4 mM	5	$1 \pm 1,00^b$	6	$36 \pm 18,23^{bc}$	$22 \pm 9,24^d$	10
6 mM	6	$0,33 \pm 0,33^b$	7	$12 \pm 7,23^c$	$12 \pm 7,23^d$	12
8 mM	6	$0,33 \pm 0,33^b$	7	$4 \pm 1,15^c$	$6 \pm 3,21^d$	12
						$4 \pm 1,53^d$

Ghi chú: Số liệu được trình bày là trung bình của 3 lần lặp lại  $\pm$  độ lệch chuẩn, các chữ cái theo sau giá trị trung bình giống nhau trong cùng một cột thì khác biệt không có ý nghĩa (Tukey, P < 0,05)

Kết quả Bảng 1 cho thấy thời gian xuất hiện áu trùng giai đoạn 3 có xu hướng bị chậm tương ứng với sự tăng dần các nồng độ melamine. Thời gian xuất hiện áu trùng giai đoạn 3 sớm nhất là ở nghiệm thức đối chứng và melamine nồng độ 0,5; 1; 2 mM (ngày thứ 4), nồng độ 4 mM xuất hiện vào ngày thứ 5 và ở nồng độ 6 mM, 8 mM thì giai đoạn 3 xuất hiện chậm nhất vào ngày thứ 6. Số lượng áu trùng giai đoạn 3 ở các nghiệm thức đối chứng và melamine nồng độ 0,5; 1; 2 mM không có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ). Tuy nhiên

phòng. Mức độ hình thành tinh thể được xác định bằng cách chụp hình dưới kính hiển vi Olympus CX23 (Trung Quốc).

Số ruồi còn lại của nghiệm thức melamine được sử dụng để đánh giá mức độ làm tan tinh thể của dược phẩm chiết xuất từ KTT. Ruồi bệnh sau 10 ngày được tiếp tục nuôi trong hai loại môi trường: môi trường thức ăn tiêu chuẩn và môi trường có bổ sung dược phẩm KTT (2 mg/mL). Sau 10 ngày khảo sát, 20 con ruồi ở mỗi nghiệm thức lần lượt được gây mê bằng  $CO_2$ , sau đó tiến hành giải phẫu dưới kính hiển vi (Kruss, Đức). Đánh giá tỉ lệ mức độ tinh thể được thực hiện bằng cách chụp hình dưới kính hiển vi Olympus CX23 (Trung Quốc).

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của melamine lên vòng đời và sự phát triển của ruồi giấm

Ảnh hưởng của melamine lên vòng đời ruồi giấm được khảo sát trong điều kiện có bổ sung melamine với các nồng độ lần lượt là 0,5; 1; 2; 4; 6 và 8 mM, kết quả được trình bày ở Bảng 1.

ở nồng độ 4, 6 và 8 mM, số lượng áu trùng giai đoạn 3 có sự khác biệt về mặt thống kê so với đối chứng. Từ đó cho thấy, melamine có tác dụng làm chậm quá trình phát triển của ruồi giấm khi hiện diện ở nồng độ cao.

Trong giai đoạn hóa nhộng, khi ruồi phát triển trong điều kiện có bổ sung melamine 6 mM và 8 mM thì làm chậm thời gian hóa nhộng 1 ngày so với đối chứng. Tổng số nhặng hình thành sau 10 ngày ở nghiệm thức đối chứng cao hơn so với nghiệm thíc

có chứa melamine. Ở nồng độ 6 và 8 mM, số lượng nhộng hình thành giảm lần lượt 88% và 96% so với đối chứng và có khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

Thời gian xuất hiện ruồi giai đoạn trưởng thành ở nghiệm thức đối chứng vào ngày thứ 9, tiếp đến là melamine ở nồng độ 0,5 mM, 1 mM, 2 mM và 4 mM xuất hiện vào ngày thứ 10, chậm nhất là melamine ở nồng độ 6 và 8 mM (ngày thứ 12). Tổng số ruồi nở sau 14 ngày cao nhất là nghiệm thức đối chứng với  $132 \pm 18,36$  con, có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê với các nghiệm thức được nuôi trong melamine. Nghiệm thức có tổng số lượng ruồi nở sau 14 ngày thấp nhất là nồng độ 6 mM và 8 mM lần lượt là  $10 \pm 7,94$  và  $4 \pm 1,53$  con. Từ những số liệu ghi nhận được, ta có thể đưa ra kết luận rằng melamine gây độc và ảnh hưởng đến các giai đoạn phát triển vòng đời của ruồi giấm.

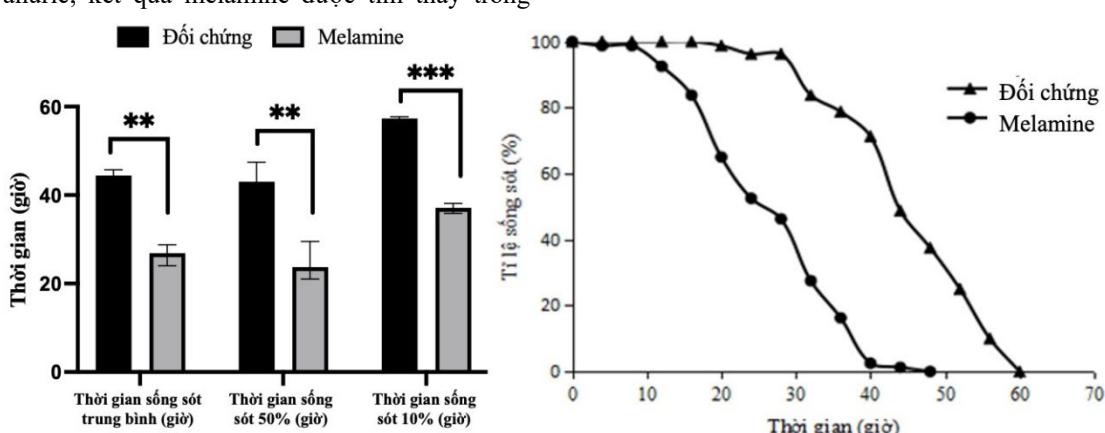
Qua kết quả thử nghiệm cho thấy melamine ảnh hưởng đến vòng đời, sự phát triển và gây độc đối với ruồi giấm *Drosophila melanogaster*. Nồng độ melamine càng cao tương ứng với mức độ ảnh hưởng đến vòng đời của ruồi giấm càng lớn. Điều đó là phù hợp với kết quả nghiên cứu trên vì melamine là một chất gây độc tế bào, ảnh hưởng đến thận và cơ quan sinh sản (Hau et al., 2009; Gombedza et al., 2019). Một số nghiên cứu về ảnh hưởng của melamine trên chuột cái chỉ ra rằng melamine có thể gây độc cho hệ thống sinh sản của con cái. Khi chuột mang thai hoặc cho con bú được tiếp xúc với melamine hoặc hỗn hợp melamine-acid cyanuric, kết quả melamine được tìm thấy trong

nước ối, sữa mẹ và bào thai. Hơn nữa, cả melamine và hỗn hợp melamine- acid cyanuric đều ảnh hưởng đến sự phát triển của thai nhi và làm tăng số lượng thai nhi tử vong sớm (Britt et al., 2000; Ferre et al., 2013). Ngoài ra, trong nghiên cứu của Dufour et al. (2006) đã chứng minh melamine và acid cyanuric đã được ghi nhận là có thể gây tổn thương thận cũng như tổn thương tinh hoàn. Sau khi chuột đực tiếp xúc với melamine hoặc hỗn hợp melamine và acid cyanuric, chúng có biểu hiện giảm trọng lượng tinh hoàn và mào tinh, giảm mức testosterone trong huyết thanh; tổn thương tế bào mầm và tinh trùng, xuất hiện các biểu hiện bong tróc, hoại tử và quá trình chết tế bào. Trong nghiên cứu Yiu et al. (2017) đã chứng minh melamine gây tổn thương tế bào ống thận bằng cách gây ra viêm, xơ hóa và quá trình chết tế bào.

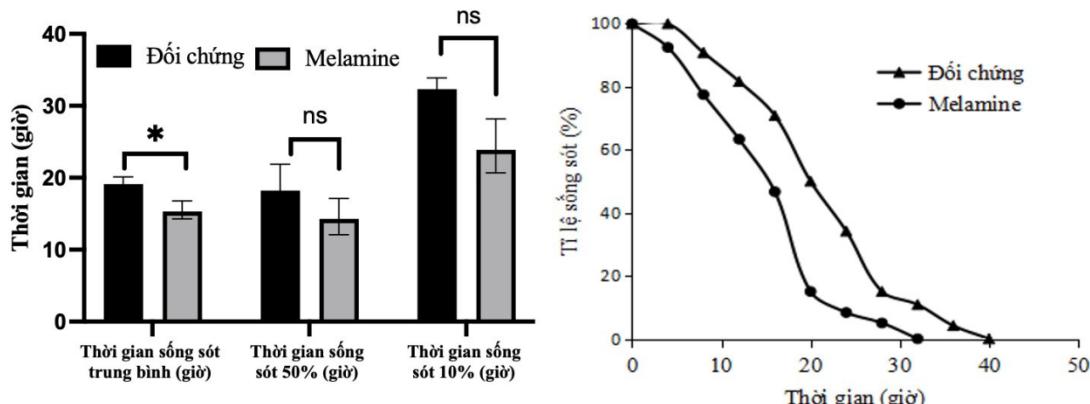
### 3.2. Ảnh hưởng của melamine đến khả năng chống chịu trong điều kiện stress oxy hóa do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và PQ gây ra

Stress oxy hóa được biết là có liên quan đến cơ chế hình thành của nhiều bệnh. Các nghiên cứu trên mô hình động vật và nuôi cây mô cho thấy số lượng tinh thể oxalate, calcium oxalate và calcium phosphate cao sẽ kích thích các loại oxy phản ứng trong tế bào thận thông qua trung gian của phản ứng viêm (Khan, 2013).

Trong điều kiện stress oxy hóa do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% gây ra, ruồi giấm được bổ sung melamine (2mM thức ăn) có thời gian sống sót trung bình thấp hơn so với đối chứng (Hình 1).



**Hình 1. Khả năng sống sót của ruồi giấm đực CS nuôi bổ sung melamine (2 mM) trong điều kiện H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% (Giá trị trung bình của 3 lần lặp ± Độ lệch chuẩn; \*\*:P < 0,01, \*\*\*:P < 0,001)**



**Hình 2. Khả năng sống sót của ruồi giấm đực CS nuôi bổ sung melamine (2 mM) trong điều kiện PQ 20mM (Giá trị trung bình của 3 lần lặp ± Độ lệch chuẩn; \*: $P < 0,05$ , ns: không khác biệt)**

Kết quả Hình 1 cho thấy thời gian sống sót của ruồi giấm giảm khi bổ sung vào thức ăn melamine 2 mM trong điều kiện  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Thời gian sống sót trung bình của melamine là  $26,60 \pm 2,44$  giờ, thấp hơn 1,61 lần so với đối chứng; thời gian còn 50% sống sót là  $24,75 \pm 4,27$  giờ, thấp hơn 1,76 lần so với đối chứng; thời gian còn 10% sống sót là  $37,00 \pm 1,15$  giờ, thấp hơn 1,50 lần so với đối chứng.

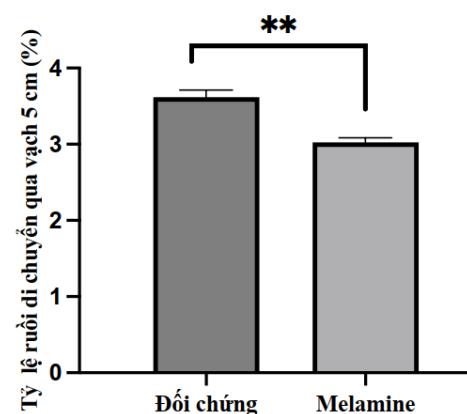
Kết quả Hình 2 cho thấy thời gian sống sót của ruồi giấm bị úc chế khi thức ăn có chứa melamine 2 mM trong điều kiện có bổ sung PQ. Thời gian sống sót trung bình của melamine là  $15,45 \pm 1,22$  giờ, giảm 23,67% so với đối chứng; thời gian còn 50% sống sót là  $14,50 \pm 2,50$  giờ, giảm 30,12% so với đối chứng; thời gian còn 10% sống sót là  $24,25 \pm 3,86$  giờ, giảm 30,22% so với đối chứng. Các số liệu khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Theo các nghiên cứu của Münzel et al. (2010), Nezis et al. (2012) và Karbach et al. (2014) thì stress oxy hóa là sự mất cân bằng giữa việc tạo ra quá nhiều gốc oxy phản ứng (ROS) và hệ thống kháng oxy hóa của cơ thể, nó gây ra nhiều bệnh hiểm nghèo như xơ vữa động mạch, thoái hóa thần kinh, viêm khớp, bệnh ung thư, bệnh thận mãn tính và nhiều bệnh khác. Thận của con người đặc biệt nhạy cảm với stress oxy hóa, được xem là yếu tố nghiêm trọng trong việc khởi phát, phát triển và hình thành của hầu hết các bệnh về thận (Gorin, 2016; Ratliff et al., 2016). Bệnh thận mãn tính là hậu quả của mất nephron và có liên quan đến sự tương tác của viêm, stress oxy hóa và yếu tố chuyển đổi tăng trưởng  $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta 2$ ). Stress oxy hóa có thể là nguyên nhân chính gây ra tổn thương thận do tiếp xúc với melamine khi nghiên cứu ở tế bào ống thận gần trên người (Hsieh et al., 2012). Trong nghiên cứu của Guo et al. (2012) đã chứng minh

melamine là yếu tố gây ra stress oxy hóa thông qua tăng tạo ra ROS và lactate dehydrogenase trong tế bào NRK-52e, và melamine có thể gây ra tổn thương oxy hóa trong các tế bào PC12 đã biệt hóa (Han et al., 2011).

### 3.3. Melamine liều cao gây ảnh hưởng lên khả năng vận động (Locomotion assay)

Kết quả ghi nhận khả năng vận động của ruồi giấm đực 14 ngày tuổi được nuôi trong môi trường có bổ sung melamine nồng độ 2 mM, ruồi được nuôi trong môi trường tiêu chuẩn được xem như là đối chứng. Khả năng vận động của ruồi giấm ở nghiệm thí đối chứng và melamine được thể hiện qua khả năng leo trèo của ruồi giấm trưởng thành trong 6 giây. Kết quả ghi nhận khả năng vận động của ruồi giấm được trình bày ở Hình 3.



**Hình 3. Khả năng di chuyển của ruồi giấm**

(Giá trị trung bình của 3 lần lặp ± Độ lệch chuẩn; \*\*: $P < 0,01$ )

Từ biểu đồ cho thấy, melamine có hiệu ứng úc chế hoạt động vận động ở ruồi giấm. Khả năng di

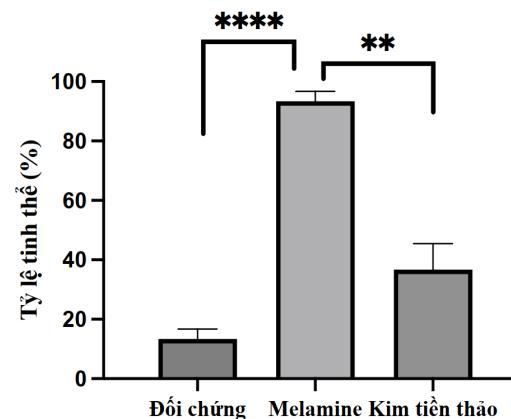
chuyển của ruồi giấm sau khi bổ sung thêm melamine 2 mM thấp hơn so với đối chứng. Trong nghiên cứu của Valéria et al. (2014), kết quả đã chứng minh rằng khả năng vận động di chuyển của ruồi giấm có liên quan đến hoạt động của acetylcholinesterase (AChE) vì AChE là chất kích thích dẫn truyền thần kinh chính của hệ thần kinh trung ương côn trùng (Kim and Lee, 2013). Bác bỏ các quan điểm trước đây rằng độc tính của melamine chỉ giới hạn ở chức năng thận, một số bằng chứng cho thấy nó có thể làm rối loạn hoạt động của hệ thần kinh trung ương và gây suy giảm nhận thức (Kim et al., 2011; Yang et al., 2012; Chu et al., 2013; Bolden et al., 2017). Đáng chú ý, trong nghiên cứu gần đây của Sun et al. (2021) đã chứng minh giảm biểu hiện AChE và tăng cường hoạt động AChE được tìm thấy trong HPC (hồi hải mã - một bộ phận của não trước) của chuột được điều trị bằng melamine. Những kết quả trên chỉ ra rằng độc tính do melamine gây ra có thể liên quan đến sự suy giảm các chức năng thần kinh.

### 3.4. Kết quả mức độ hình thành tinh thể biểu hiện sỏi tiết niệu trong ống Malpighian và hiệu quả hoà tan tinh thể của dược phẩm KTT

Sự hình thành sỏi tiết niệu có thể là kết quả của sự tương tác phức tạp của nhiều yếu tố (tuổi tác, giới tính, di truyền, khí hậu, chế độ ăn uống,...), trong đó có ảnh hưởng của môi trường thức ăn. Trong nghiên cứu này đã thành công tạo ra các tinh thể trong các ống Malpighian của ruồi bằng cách bổ sung thêm melamine vào chế độ ăn. Kết quả ghi nhận biểu hiện của bệnh sỏi tiết niệu trên ống Malpighian của ruồi giấm trưởng thành được khảo sát trong điều kiện có bổ sung melamine nồng độ 2 mM và khả năng hỗ trợ điều trị sỏi tiết niệu của dược phẩm chiết xuất từ KTT (Hình 4).

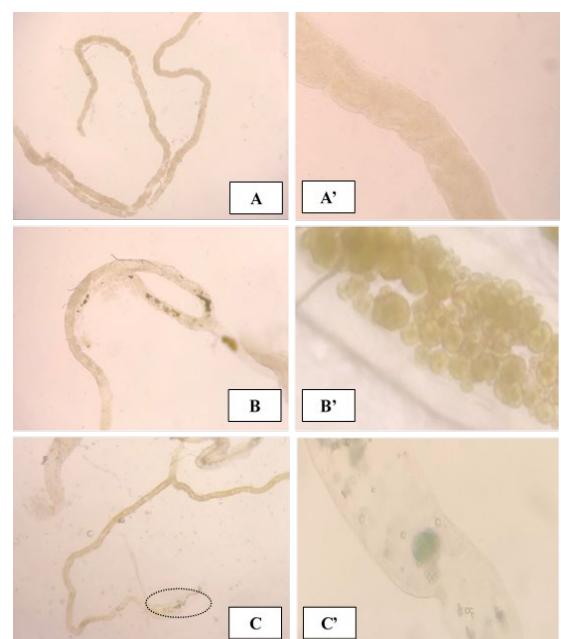
Từ kết quả Hình 4 cho thấy ruồi trưởng thành phát triển trong môi trường có bổ sung thêm melamine 2 mM có khả năng hình thành tinh thể gây sỏi tiết niệu trong ống Malpighian cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Ở nghiệm thức đối chứng, tỷ lệ hình thành sỏi trung bình là  $13,33 \pm 5,77\%$ , trong khi tỷ lệ hình thành sỏi ở nghiệm thức có bổ sung melamine 2 mM lên đến  $93,33 \pm 5,77\%$ . Điều này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu trước đó của Chung and Turney (2017), kết quả đã chứng minh sodium oxalate (NaOx) và ethylene glycol (EG) được bổ sung thêm vào chế độ ăn đã tăng tạo sự hình thành tinh thể trong ống Malpighian của ruồi giấm. Ở nghiệm thức chế độ ăn bình thường, tỷ lệ hình thành sỏi là  $(20 \pm 2,2\%)$ , ở chế độ ăn bổ sung sodium

oxalate (NaOx) chiếm  $(73 \pm 3,6\%)$ , và ở chế độ ăn ethylene glycol (EG)  $(84 \pm 2,2\%)$  chiếm tỷ lệ thấp hơn so với tỷ lệ hình thành tinh thể do melamine 2mM sử dụng trong nghiên cứu. Khi kết hợp 2 hợp chất acid cyanuric và melamine, chúng được chứng minh là tạo thành các tinh thể ở cả ống lợn lợn giàn và ống lợn xa ở chuột (Chen et al., 2014).



Hình 4. Biểu đồ thể hiện tỉ lệ hình thành tinh thể trong ống Malpighian

(Giá trị trung bình của 3 lần lặp ± Độ lệch chuẩn; \*\*: $P < 0,01$ , \*\*\*: $P < 0,0001$ )



Hình 5. Ống Malpighian của ruồi giấm

(A (Độ phóng đại 10x), A' (Độ phóng đại 40x): đối chứng; B (Độ phóng đại 10x), B' (Độ phóng đại 40x): melamine và C (Độ phóng đại 10x), C' (Độ phóng đại 40x): KTT)

Đáng chú ý, sau khi bổ sung thêm dược phẩm KTT vào khẩu phần thức ăn của ruồi giấm, tỷ lệ hình thành sỏi trong ống Malpighian ở nghiệm thức có bổ sung thêm KTT ( $36,67 \pm 15,28\%$ ) giảm 56,67% so với nghiệm thức melamine 2 mM không bổ sung KTT ( $93,33 \pm 5,77\%$ ). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với những kết quả nghiên cứu trước đây, chứng minh rằng KTT có vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ điều trị giảm tinh thể sỏi tiết niệu. Điều này đã được chứng minh trong nghiên cứu của Zhou et al. (2018) nhằm mục đích điều tra tác dụng chống tiết niệu của flavonoid từ KTT (TFDS) trên sỏi thận calcium oxalate ở chuột Sprague-Dawley. Nhóm nghiên cứu đã chỉ ra rằng TFDS làm giảm đáng kể tinh thể calcium oxalate trong thận so với nhóm đối chứng. Xie et al. (2018) cũng tiến hành nghiên cứu tác dụng từ flavone tổng của KTT làm giảm bớt quá trình chết tế bào và autophagy của các tế bào HK-2 gây ra bởi COM bằng cách điều chỉnh KIM-1 thông qua con đường p38/MAPK.

Giải phẫu các ống Malpighian bình thường được thể hiện trong Hình 5 A-A'. Sự hình thành tinh thể

được quan sát dưới kính hiển vi sau 10 ngày khi bắt đầu nuôi ruồi trong điều kiện có bổ sung melamine. Tinh thể quan sát thấy có dạng hình tròn, màu nâu, mật độ dày đặc trong ống Malpighian (Hình 3.5 B-B'). Các tinh thể có xu hướng kết tinh, ngưng tụ thành các khối có kích thước lớn. Từ đó chứng minh melamine là hợp chất tạo nên các tinh thể trong ống Malpighian, biểu hiện của bệnh sỏi tiết niệu. Ngoài ra, nghiên cứu còn chứng minh hiệu quả của dược phẩm KTT giúp giảm hình thành các tinh thể, ức chế sự phát triển và ngăn cản ngưng tụ của các tinh thể tạo thành sỏi gây tắc nghẽn đường bài tiết (Hình 5 C-C'). Các tinh thể có xu hướng giảm nhỏ kích thước, ít kết dính hơn, giảm số lượng tinh thể.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công mô hình ruồi giấm biểu hiện sỏi tiết niệu do melamine gây ra thông qua sự hình thành các tinh thể trong ống Malpighian, ảnh hưởng đến khả năng vận động, quá trình sinh trưởng, phát triển của ruồi giấm. Đồng thời, đã khảo sát được mức độ hoà tan tinh thể của dược phẩm KTT dựa trên mô hình xây dựng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Allocca, M., Zola, S., & Bellosta, P. (2018). The Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*: modelling of human diseases (Part II). *Drosophila melanogaster-Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*, 131-156. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.73199>
- Bolden, A. L., Rochester, J. R., & Kwiatkowski, C. F. (2017). Melamine, beyond the kidney: A ubiquitous endocrine disruptor and neurotoxicant? *Toxicology letters*, 280, 181-189. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.893>
- Brown, C. A., Jeong, K. S., Poppenga, R. H., Puschner, B., Miller, D. M., Ellis, A. E., Kang, K.I., Sum, S., Cistola, A. M., & Brown, S. A. (2007). Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(5), 525-531. <https://doi.org/10.1177/104063870701900510>
- Chaudhuri, A., Bowling, K., Funderburk, C., Lawal, H., Inamdar, A., Wang, Z., & O'Donnell, J. M. (2007). Interaction of genetic and environmental factors in a Drosophila parkinsonism model. *Journal of Neuroscience*, 27(10), 2457-2467. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4239-06.2007>
- Chen, W. C., Lin, W. Y., Chen, H. Y., Chang, C. H., Tsai, F. J., Man, K. M., Shen, J. L., & Chen, Y. H. (2012). Melamine-induced urolithiasis in a Drosophila model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2753-2757. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf204647p>
- Chen, Y. H., Liu, H. P., Chen, H. Y., Tsai, F. J., Chang, C. H., Lee, Y. J., Lin, W.Y., & Chen, W. C. (2011). Ethylene glycol induces calcium oxalate crystal deposition in Malpighian tubules: a Drosophila model for nephrolithiasis/urolithiasis. *Kidney international*, 80(4), 369-377. DOI: <https://doi.org/10.1038/ki.2011.80>
- Chen, Y. T., Jiann, B. P., Wu, C. H., Wu, J. H., Chang, S. C., Chien, M. S., Hsuan, S.L., Lin, Y.L., Chen, T.H., Tsai, F.J., & Liao, J. W. (2014). Kidney stone distribution caused by melamine and cyanuric acid in rats. *Clinica Chimica Acta*, 430, 96-103. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.01.003>
- Chi, T., Kim, M. S., Lang, S., Bose, N., Kahn, A., Flechner, L., Blaschko, S. D., Zee, T., Muteliefu, G., Bond, N., & Kolipinski, M. (2015). A Drosophila model identifies a critical role for zinc in mineralization for kidney stone disease. *PLoS one*, 10(5), e0124150. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124150>
- Chu, C. Y., Chu, K. O., Ho, C. S., Kwok, S. S., Chan, H. M., Fung, K. P., Wang, C. C., (2013). Melamine in prenatal and postnatal organs in rats. *Reproductive Toxicology*. 35, 40-47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.06.003>
- Karbach, S., Wenzel, P., Waisman, A., Munzel, T., & Daiber, A. (2014). eNOS uncoupling in cardiovascular diseases-the role of oxidative stress

- and inflammation. *Current pharmaceutical design*, 20(22), 3579-3594.
- Kim, S. H., Lee, I. C., Lim, J. H., Shin, I. S., Moon, C., Kim, S. H., Park, S.C., Kim, H.C., & Kim, J. C. (2011). Effects of melamine on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 31(6), 506-514. <https://doi.org/10.1002/jat.1703>
- Kim, Y. H., & Lee, S. H. (2013). Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta?. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(1), 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.11.004>
- Münzel, T., Gori, T., Bruno, R. M., & Taddei, S. (2010). Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease?. *European heart journal*, 31(22), 2741-2748. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq396>
- Nezis, I. P., & Stenmark, H. (2012). p62 at the interface of autophagy, oxidative stress signaling, and cancer. *Antioxidants & redox signaling*, 17(5), 786-793. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4394>
- Peng, C., Zuo, Y., Kwan, K. M., Liang, Y., Ma, K. Y., Chan, H. Y. E., Huang, Y., Yu, H., & Chen, Z. Y. (2012). Blueberry extract prolongs lifespan of Drosophila melanogaster. *Experimental Gerontology*, 47(2), 170-178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.12.001>
- Ratliff, B. B., Abdulmahdi, W., Pawar, R., & Wolin, M. S. (2016). Oxidant mechanisms in renal injury and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 25(3), 119-146. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6665>
- Rose, E., Lee, D., Xiao, E., Zhao, W., Wee, M., Cohen, J., & Bergwitz, C. (2019). Endocrine regulation of MFS2 by branchless controls phosphate excretion and stone formation in Drosophila renal tubules. *Scientific reports*, 9(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45269-x>
- Sorokin, I., Mamoulakis, C., Miyazawa, K., Rodgers, A., Talati, J., & Lotan, Y. (2017). Epidemiology of stone disease across the world. *World Journal of Urology*, 35(9), 1301-1320. <https://doi.org/10.1007/s00345-017-2008-6>
- Valéria, S. de A. P., F., Felipe da S., G., Echeverria, G. M., Raquel, M. K., Kemmerich, M I., Lausmann, T. A. P., Martins da Costa, J. G., Athayde, M. L., Boligon, A. A., Kamdem, J. P., & Posser, T. (2014). Phytochemical constituents and toxicity of Duguetia furfuracea hydroalcoholic extract in Drosophila melanogaster. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014(1), 838101. <https://doi.org/10.1155/2014/838101>
- Wang, S., Ju, Y., Gao, L., Miao, Y., Qiao, H., & Wang, Y. (2022). The fruit fly kidney stone models and their application in drug development. *Heliyon*, 8(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09232>
- Xie, H., Li, J., Gao, H., Wang, J., Li, C., Xu, Y., & Liu, C. (2018). Total flavone of Desmodium styracifolium relieved apoptosis and autophagy of COM-induced HK-2 cells by regulating KIM-1 via p38/MAPK pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 442(1), 169-175. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3201-z>
- Yang, Y., Xiong, G. J., Yu, D. F., Cao, J., Wang, L. P., Xu, L., & Mao, R. R. (2012). Acute low-dose melamine affects hippocampal synaptic plasticity and behavior in rats. *Toxicology letters*, 214(1), 63-68. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.08.010>
- Yiu, A. J., Ibeh, C. L., Roy, S. K., & Bandyopadhyay, B. C. (2017). Melamine induces  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor activation and elicits apoptosis in proximal tubular cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 313(1), C27-C41. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00225.2016>
- Zhou, J., Jin, J., Li, X., Zhao, Z., Zhang, L., Wang, Q., Li, J., Zhang, Q., & Xiang, S. (2018). Total flavonoids of Desmodium styracifolium attenuates the formation of hydroxy-L-proline-induced calcium oxalate urolithiasis in rats. *Urolithiasis*, 46(3), 231-241. <https://doi.org/10.1007/s00240-017-0985-y>