



NUÔI CÂY PHỨC HỢP OCG (OOCYTE - CUMULUS - GRANULOSA) ĐƯỢC THU NHẬN TỪ NANG NOÃN BÒ Ở GIAI ĐOẠN HÌNH THÀNH XOANG SỚM

Nguyễn Thị Thanh Giang^{1*}, Lê Thị Vĩ Tuyết² và Dương Hoa Xô¹

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Thanh Giang (email: nttgiang84@yahoo.com.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 12/02/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

In vitro culture of cumulus-oocyte-granulosa complexes (COCGs) from bovine early antral follicles

Từ khóa:

Nang noãn bò, nang noãn có xoang sớm, sự trưởng thành noãn bào, yếu tố tăng trưởng

Keywords:

Bovine follicles, early antral follicles, growth factors, oocyte maturation

ABSTRACT

The study was conducted to support the development of the *in vitro* oocytes through the culture process needs to be supplemented with two different including (1) control (DC): TCM-199 + FBS (10%) compared with (2) treatment (TN): TCM-199 + FBS (10%) + sodium pyruvate (0.1 mg/ml) + hypoxanthine (4 mM) + estrogen (0.1 µg/ml). The cumulus-oocyte-granulosa complexes-COCGs are cultured fixed by 1% agarose. After 13 days of culture, the results showed that the COCGs which had undergone in both treatment then formed antra, resulting in antral follicle-like structures on day 3 and 4 of culture. However, only in the TN treatment, these structures remained until day 13. In addition, the growth of follicle sizes was reported in both DC and TN treatments, respectively, from $95.2 \pm 1.4 \mu\text{m}$ to $107 \pm 6.4 \mu\text{m}$ and from $95.7 \pm 1.7 \mu\text{m}$ to $113.6 \pm 6.4 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$). The IVM experiment affirms the maturity of oocytes in the TN treatment at proportion 35.7% oocytes formed the first polar body. The IVF results showed that the fertilization of the oocytes was successfully accounted for 26.7% and growth to the 4-celled embryonic stage.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm hỗ trợ sự phát triển của noãn bào *in vitro* bằng cách bổ sung các yếu tố cần thiết trong quá trình nuôi cấy ở môi trường (1) đối chứng (ĐC): TCM-199 + FBS (10%), so sánh với môi trường (2) thí nghiệm (TN): có bổ sung thêm sodium pyruvate (0,1 mg/ml) + hypoxanthine (4 mM) + estrogen (0,1 µg/mL). Các phức hợp noãn bào-cumulus-tế bào hạt (complexes of cumulus-oocyte-granulosa, COCGs) được nuôi cố định bằng agarose 1%. Kết quả sau 13 ngày nuôi cấy cho thấy, các COCGs đều hình thành cấu trúc “giống xoang nang” ở ngày 3 và 4 của quá trình nuôi trong cả hai môi trường. Ở môi trường TN, các cấu trúc này duy trì đến ngày thứ 13. Bên cạnh đó, kích thước noãn bào tăng so với trước khi nuôi ở cả môi trường ĐC và TN lần lượt là từ $95,2 \pm 1,4 \mu\text{m}$ đến $107 \pm 6,4 \mu\text{m}$, và từ $95,7 \pm 1,7 \mu\text{m}$ đến $113,6 \pm 6,4 \mu\text{m}$ ($p < 0,05$). Kết quả IVM (nuôi trưởng thành noãn bào *in vitro*, *in vitro* maturation) khẳng định sự trưởng thành của noãn bào (xuất hiện thể cực thứ nhất) được nuôi trong môi trường TN đạt 35,7%. Kết quả IVF (thụ tinh trong ống nghiệm, *in vitro* fertilization) cho thấy 26,7% noãn bào được thụ tinh thành công và phát triển đến giai đoạn phôi 4 tế bào.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Thanh Giang, Lê Thị Vĩ Tuyết và Dương Hoa Xô, 2019. Nuôi cấy phức hợp OCG (Oocyte - Cumulus - Granulosa) được thu nhận từ nang noãn bò ở giai đoạn hình thành xoang sớm. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 235-242.

1 GIỚI THIỆU

Sự phát triển của những nang noãn/noãn bào phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: các gonadotropin, yếu tố tăng trưởng và các hormone steroid. Bên cạnh đó, sự tương tác giữa noãn bào với các tế bào lân cận như cumulus hay granulosa là cần thiết cho sự phát triển noãn bào tối ưu. Nhằm hỗ trợ sự phát triển noãn bào *in vitro* trong trường hợp các noãn bào này không có khả năng thành thực *in vivo*, các phức hợp noãn bào-cumulus-granulosa được nuôi cấy trong điều kiện bổ sung các yếu tố cần thiết. Sodium pyruvate, hypoxanthine và estrogen được khẳng định là có vai trò quan trọng trong sự phát triển của các tế bào nang noãn và sự thành thực của noãn bào (Leese and Barton, 1984; Eppig and Downs *et al.*, 1987; Harada *et al.*, 1997; Geshi *et al.*, 2000; Palter *et al.*, 2001; Couse *et al.*, 2005; Hirao *et al.*, 2012; Smetanina *et al.*, 2017). Sodium pyruvate là một chất chuyển hóa glucose, nguồn năng lượng chính cho tế bào và giúp tế bào bảo vệ bản thân trước các gốc tự do. Bên cạnh đó, sodium pyruvate được khẳng định vai trò trong việc thúc đẩy sự thành thực nhân của noãn bào ở bò và sự hiện diện liên tục của các tế bào cumulus trong quá trình thành thực noãn bào rất quan trọng cho sự phát triển tiếp theo của các hợp tử tới giai đoạn blastocyst. Các nghiên cứu gần đây trên gia súc đã chứng minh tỉ lệ thụ tinh bình thường của các noãn bào nuôi cấy bằng sodium pyruvate cao hơn so với nuôi cấy không bổ sung yếu tố này (Geshi *et al.*, 2000). Hơn nữa, khả năng tiêu thụ sodium pyruvate phụ thuộc vào sự hiện diện của các tế bào cumulus và tế bào hạt. Mức tiêu thụ oxy, glucose và pyruvate của các phức hợp noãn bào-cumulus-tế bào hạt (complexes of oocyte-cumulus-granulosa, COCGs) gấp gần hai lần các noãn bào trần (Leese and Barton, 1984; Downs, 2002; Sutton, 2003). Hypoxanthine là chất ức chế cAMP-phosphodiesterase trong dịch nang, do đó khi bổ sung hypoxanthine trong môi trường nuôi cấy sẽ giúp duy trì mức độ cAMP trong tế bào soma cũng như trong trứng và duy trì chức năng của chúng, như sự tương tác giữa noãn bào-granulosa. Hypoxanthine điều khiển sự tương tác bền vững của noãn bào-granulosa ở bò (Harada *et al.*, 1997). Hypoxanthine là một thành phần của hầu hết các môi trường nuôi cấy được sử dụng cho nuôi thành thực noãn bào động vật có vú. Hypoxanthine được chứng minh có tác động tích cực đến hình thái noãn bào với nồng độ 4 mM, nó giúp duy trì noãn bào ở giai đoạn túi mầm, hỗ trợ sự tồn tại của noãn bào và các tế bào cumulus. Estrogen thúc đẩy sự tăng sinh, biệt hóa của tế bào granulosa và tăng cường phản ứng của tế bào granulosa với sự kích thích của gonadotropin (Palter *et al.*, 2001; Couse *et al.*, 2005). Estrogen hỗ trợ tăng trưởng *in vitro* của trứng

bò trong nuôi cấy tăng trưởng phức hợp COCGs phân lập từ các nang có xoang sớm và có được khả năng giảm phân (Hirao *et al.*, 2004; Hirao *et al.*, 2009).

Mặc dù các yếu tố trên đều hỗ trợ sự phát triển của noãn bào nhưng chúng chỉ được nghiên cứu hiệu quả tác động đơn lẻ, tối ưu hóa nồng độ tác động. Việc tổ hợp các yếu tố này trong quá trình nuôi thành thực noãn bào chưa được chứng minh. Trên cùng một đối tượng nghiên cứu, việc nuôi cấy các COCGs phân lập từ các nang noãn có xoang sớm (0,5-1,0 mm) được thực hiện khá sớm. Năm 1997, Harada *et al* đã nuôi cấy thành công đầu tiên các phức hợp COCGs từ buồng trứng bò. Cũng trong công bố này, nhóm tác giả khẳng định hypoxanthine giúp duy trì hình thái bình thường và hỗ trợ gia tăng kích thước noãn bào sau nuôi cấy. Điều này được khẳng định một lần nữa trong nghiên cứu của nhóm tác giả Senbon vào năm 2002 và nồng độ 4 mM được chứng minh là hỗ trợ tốt nhất sự thành thực của noãn bào (Harada *et al.*, 1997; Senbon and Miyano, 2002). Trong những năm gần đây, có nhiều nghiên cứu liên quan đến khảo sát môi trường nuôi cấy dành cho COCGs. Cụ thể vào năm 2015 và 2016, nhóm nghiên cứu của Makita *et al* đã công bố hai công trình nghiên cứu khẳng định vai trò hỗ trợ sự tăng trưởng về kích thước và thành thực về chức năng noãn bào bởi estrogen. Cũng trong hai nghiên cứu này, nhóm tác giả khẳng định môi trường nuôi cấy kết hợp giữa estrogen và androgen cho hiệu quả tác động lên noãn bào tốt hơn khi chỉ sử dụng estrogen (Makita and Miyano, 2015; Makita *et al.*, 2016). Trên các cơ sở đó, thử nghiệm nuôi cấy thành thực noãn bào của bò trong các COCGs, (các phức hợp được thu nhận ở nang noãn có xoang sớm) trong môi trường nuôi có bổ sung estrogen, sodium pyruvate và hypoxanthine được thực hiện.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên vật liệu – hóa chất

Buồng trứng bò được cung cấp từ lò mổ Sơn Thủy Hà (Long An). Buồng trứng bò sữa không có các dấu hiệu của xơ hóa hoặc u nang. Tổng số buồng trứng được sử dụng cho toàn bộ thí nghiệm là 30 buồng trứng.

Các hóa chất sử dụng cho nghiên cứu được cung cấp từ hãng Sigma (USA): FBS; BSA; sodium pyruvate; penicilin/streptomycin; hyaluronidase, FSH; LH; estradiol; hypoxanthine, heparin; amino acid thiết yếu; amino acid không thiết yếu. Môi trường TCM199 được cung cấp bởi Life Technologies (USA). Môi trường TL Fertilization Medium, SOF medium được cung cấp bởi hãng Minitube.

Nhóm còn lại được tiến hành thụ tinh IVF. Các noãn bào này được rửa lại trong môi trường IVF (TL Fertilization Medium (môi trường thụ tinh) bổ sung albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin – BSA) (6 mg/mL), pyruvate stock (10 μ L/mL) và heparin (10 μ L/mL)) trước khi chuyển sang vi giọt thụ tinh. Vi giọt thụ tinh được tạo bằng môi trường IVF (môi trường thụ tinh) với kích thước 90 μ L/vi giọt. 10 μ L dịch huyền phù tinh trùng (mật độ 6.106 tinh trùng/ml) được thêm vào vi giọt thụ tinh. Sau 8 – 10 giờ đồng nuôi cấy, hợp tử giả định được rửa 2 lần trong môi trường nuôi phôi SOF (SOF stock bổ sung FBS (10%), amino acid thiết yếu (10 μ L/mL), amino acid không thiết yếu (20 μ L/mL), pyruvate (0,363 mg/mL)) trước khi nuôi trong vi giọt môi trường này. Sau 48 giờ nuôi, tỉ lệ thụ tinh (tỉ lệ tạo phôi 4 tế bào) được ghi nhận bằng cách quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược (Ngô Thị Mai Hương và *ctv.*, 2011).

2.2 Thu nhận các phức hợp noãn bào-cumulus-granulosa (COCGs)

Các mẫu buồng trứng bò sữa không bị u nang, không bị xơ hóa được thu nhận từ lò mổ Sơn Thủy Hà ở Long An và được bảo quản trong muối đệm phosphate (PBS, Phosphate Buffer Saline) kháng sinh (penicilin/streptomycin) 2X. Buồng trứng được xử lý để loại bỏ máu và mô mỡ trong các dung dịch PBS với nồng độ kháng sinh giảm dần 2X và 1X (Harada *et al.*, 1997). Các nang noãn có xoang sớm (đường kính 0.5-1mm) được phân lập bằng cơ học từ buồng trứng (Saha *et al.*, 2000; Sun and Li, 2013). Các nang noãn được rửa trong môi trường TCM199 bổ sung 10% FBS, kháng sinh 1X. Các phức hợp COCGs được phân lập từ những nang noãn này, chỉ những noãn bào có đường kính 90-100 μ m mới được nuôi cấy (Hình 1). Đường kính noãn bào (trừ màng zona) được xác định bằng phần mềm RI (Research Instruments) và hình ảnh được quan sát và ghi nhận dưới kính hiển vi đảo ngược.

2.3 Nuôi cấy tăng trưởng các phức hợp noãn bào-cumulus-granulosa (COCGs) *in vitro*

Các phức hợp COCGs được nuôi cấy trong đĩa 4 giếng với giá thể gel agarose 1% được chuẩn bị sẵn. Gel agarose 1% được hút chuyển vào mỗi giếng của đĩa 4 giếng với thể tích là 300 μ L. Đĩa nuôi được ủ 2 giờ trong điều kiện 38,5°C, 5% CO₂. Các COCGs được chuyển vào những đĩa này với số lượng 5-10 phức hợp/giếng. Sau đó, 200 μ L agarose 1% được bổ sung tiếp tục vào đĩa nuôi, ủ đĩa ở 38,5°C đến khi gel đông lại. Môi trường nuôi cấy được bổ sung vào đĩa với thể tích là 500 μ L. Môi trường cần được ủ tối thiểu 2 giờ trước khi sử dụng (Leese and Barton, 1984; Harada *et al.*, 1997; Hirao *et al.*, 2004; Hirao *et al.*, 2009; Hirao *et al.*, 2012).

Môi trường thí nghiệm (TN): TCM199, FBS (10%), sodium pyruvate (0,1 mg/ml), hypoxanthine (4 mM), estrogen (0,1 μ g/ml) (Hirao *et al.*, 2004).

Môi trường đối chứng (ĐC): TCM199, FBS (10%).

Quá trình nuôi cấy được thực hiện ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂. Ngày đầu tiên của quá trình nuôi cấy là ngày D0 và nuôi cấy tiếp tục cho đến ngày D13. Trong suốt quá trình nuôi cấy, các phức hợp được đánh giá sự thay đổi về hình thái, sự hình thành xoang (Huang *et al.*, 2013). Vào ngày D13, các phức hợp còn lại được chuyển sang vi giọt chứa 100 μ L môi trường nuôi thành thực (5-10 noãn bào /1 vi giọt) được phủ dầu khoáng. Sau đó, các noãn bào này sẽ được sử dụng để thực hiện nuôi thành thực (*in vitro* maturation, IVM) và thụ tinh nhân tạo (*in vitro* fertilization, IVF).

Tổng số phức hợp COCGs được nuôi cấy là 124 COCGs, thu nhận từ 20-25 buồng trứng.

2.4 Nuôi thành thực noãn bào (IVM) và thụ tinh *in vitro* (IVF)

Các noãn bào sau quá trình nuôi tăng trưởng *in vitro* được chuyển vào vi giọt dầu khoáng chứa 100 μ L môi trường nuôi thành thực noãn bào TCM199 có chứa FBS (10%), sodium pyruvate (0,1 mg/mL), estrogen (0,1 μ g/mL), FSH (0,02 IU/mL), LH (0,01 IU/mL), 5-10 trứng/1 vi giọt. Các noãn bào được nuôi cấy trong điều kiện 38,5°C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Sự thành thực của noãn bào sau nuôi được đánh giá thông qua sự xuất hiện thể cực và khả năng tạo phôi. Số phức hợp được chia làm 2 nhóm, nhóm đánh giá sự hình thành thể cực sẽ được loại bỏ các cumulus bám xung quanh bằng cách thêm 10 μ L dung dịch hyaluronidase (0,3 μ g/ml) vào mỗi vi giọt nuôi cấy và ủ trong 10 phút ở nhiệt độ 38,5°C với 5% CO₂, bão hòa hơi nước. Sau thời gian ủ, noãn bào được loại bỏ hết các tế bào cumulus và granulosal bao quanh bằng pipette pasteur, quan sát sự hiện diện của thể cực thứ nhất và đường kính noãn bào (trừ màng zona) được xác định bằng phần mềm RI (Research Instruments).

Nhóm còn lại được tiến hành thụ tinh IVF. Các noãn bào này được rửa lại trong môi trường IVF (TL Fertilization Medium (môi trường thụ tinh) bổ sung albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin – BSA) (6 mg/mL), pyruvate stock (10 μ L/mL) và heparin (10 μ L/mL)) trước khi chuyển sang vi giọt thụ tinh. Vi giọt thụ tinh được tạo bằng môi trường IVF (môi trường thụ tinh) với kích thước 90 μ L/vi giọt. 10 μ L dịch huyền phù tinh trùng (mật độ 6.106 tinh trùng/ml) được thêm vào vi giọt thụ tinh. Sau 8 – 10 giờ đồng nuôi cấy, hợp tử giả định được rửa 2 lần trong môi trường nuôi phôi SOF (SOF stock bổ

sung FBS (10%), amino acid thiết yếu (10 μ L/mL), amino acid không thiết yếu (20 μ L/mL), pyruvate (0,363 mg/mL)) trước khi nuôi trong vi giọt môi trường này. Sau 48 giờ nuôi, tỉ lệ thụ tinh (tỉ lệ tạo phôi 4 tế bào) được ghi nhận bằng cách quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược (Ngô Thị Mai Hương và *ctv.*, 2011).

2.5 Xử lý số liệu và kiểm định thống kê

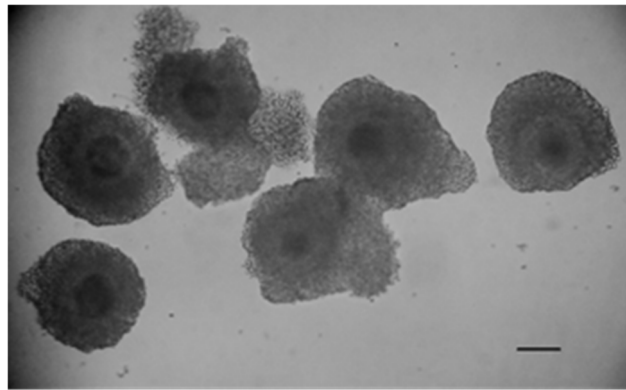
Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và Statgraphics Centurion phiên bản XVI.II. Sự khác biệt thống kê của số liệu đường kính được xử lý bằng kiểm định T-test, còn các số liệu khác được xử lý bằng kiểm định χ^2 -test. Kết quả có

ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$.

3 KẾT QUẢ

3.1 Phân lập phức hợp COCGs

Các phức hợp COCGs được thu nhận bằng cách sử dụng kim 29G và pipette pasteur xé nang nõn đường kính 0,5 -1 mm. Kết quả cho thấy phương pháp xé nang cho ra các phức hợp COCGs tương đối toàn vẹn (phức hợp có hơn 5 lớp tế bào). Quy trình phân lập này cho kết quả đạt 84% (25/30) phức hợp sau phân lập có hình thái nguyên vẹn và 96% (24/25) phức hợp sống được đánh giá bằng phương pháp nhuộm neutral red. Do đó, quy trình phân lập COCGs được áp dụng cho các thí nghiệm kế tiếp.

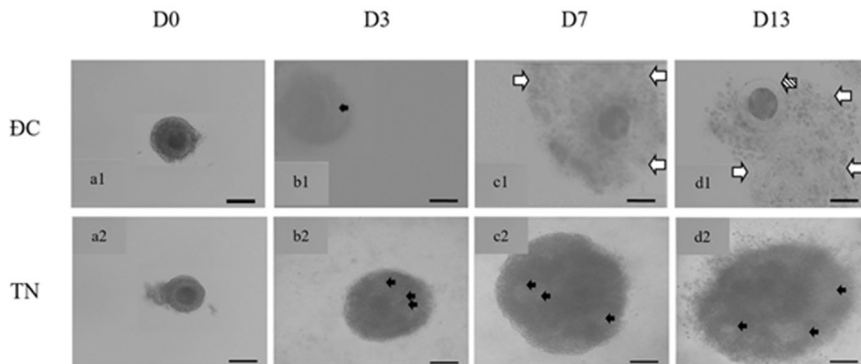


Hình 1: Các phức hợp COCGs được phân lập (thang đo 50 μ m)

3.2 Sự tăng trưởng nõn bào *in vitro*

Sau quá trình nuôi 13 ngày, các phức hợp COCGs có sự thay đổi hình thái rất khác biệt, kích thước phức hợp tăng theo thời gian nuôi cấy, đồng thời hình thành các cấu trúc giống xoang nang (Hình 2). Ở cả hai nghiệm thức, sau 1 ngày nuôi cấy, các phức hợp COCGs sẽ thay đổi thành hình dạng khối cầu giống như nang trứng (Hình 2b). Đường kính của COCGs ngày càng tăng theo thời gian nuôi cấy. Trong nghiệm thức đối chứng ĐC, 60% - 70%

COCGs tạo thành cấu trúc giống xoang sau 3-4 ngày (Hình 2-b1). Sau 4-5 ngày, các tế bào granulosa bắt đầu lan rộng trong gel làm mất cấu trúc giống nang có xoang của phức hợp (Hình 2-c1, d1). Sau 13 ngày, 98% COCGs bị dần trôi trong gel agarose làm mất cấu trúc giống nang có xoang (Hình 2d-1). Trong nghiệm thức thí nghiệm TN, cũng có 60%-70% phức hợp COCGs tạo thành cấu trúc giống nang có xoang sau 3-4 ngày, nhưng cấu trúc này vẫn được duy trì sau 13 ngày đạt 47% (29/62) (Hình 2-b2, c2, d2).



Hình 2: Hình thái COCGs trong suốt quá trình nuôi cấy, thang đo 100 μ m

■ cấu trúc giống xoang nang ⇨ các tế bào granulosa lan rộng, mất cấu trúc giống xoang nang ⇩: nõn bào tràn
 ĐC: đối chứng, TN: thí nghiệm, D: ngày nuôi cấy

Sau 13 ngày nuôi cấy, những phức hợp COCGs có cấu trúc giống nang có xoang được tách ra khỏi gel có hình thái noãn bào bình thường tương ứng trong 2 môi trường ĐC và TN là 26 % và 68 %. Đường kính noãn bào tăng từ 95 μm đến 107,0 ± 6,4 μm và 113,6 ± 6,4 μm lần lượt ở nghiệm thức ĐC và TN (Bảng 1). Kết quả phân tích thống kê cho thấy, ở cả hai nghiệm thức, đường kính noãn bào sau nuôi cấy cao hơn đáng kể ($p_{\text{value}} < 0,05$) so với trước khi nuôi

cấy (Hình 3). Tỷ lệ tăng trưởng của trứng khi nuôi trong nghiệm thức TN có bổ sung sodium pyruvate, hypoxanthine và estrogen là 18,6% cao hơn ($p_{\text{value}} < 0,05$) so với đối chứng (12,3%). Kết quả của 3 lần lặp lại không khác biệt đáng kể ($p_{\text{value}} > 0,05$). Tỷ lệ noãn bào trần ghi nhận được ở cả hai nghiệm thức ĐC và TN trong suốt quá trình nuôi cấy là 98% và 53% (Bảng 2).

Bảng 1: Sự tăng trưởng của trứng trong 2 nghiệm thức

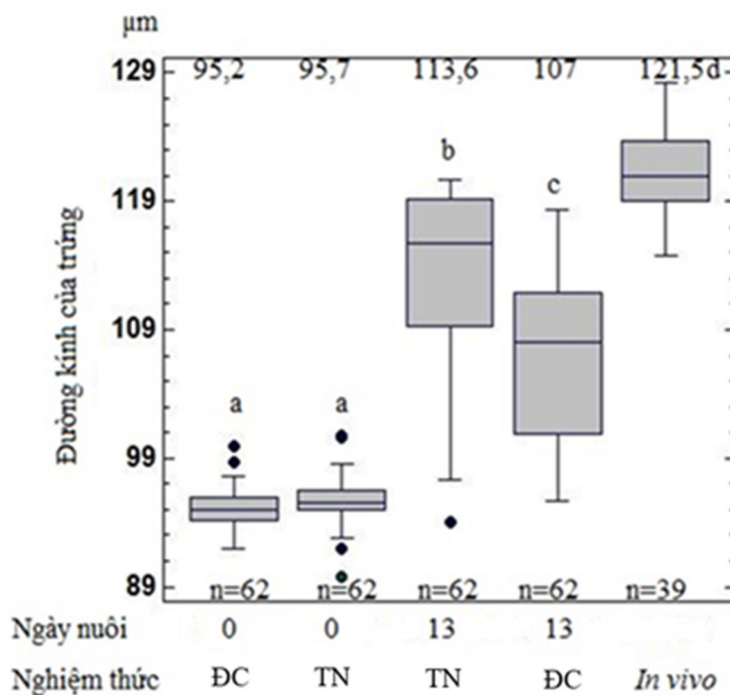
Nghiệm thức	Số COCGs nuôi*	Đường kính của noãn bào M ± SD (μm)			Số lượng (%) noãn bào có hình thái bình thường
		Trước khi nuôi	Sau khi nuôi	Tăng trưởng (%)	
ĐC	62	95,2 ± 1,4 ^{aa}	107 ± 6,4 ^{aβ}	12,3 ± 6,3 ^a	16(26) ^a
TN	62	95,7 ± 1,7 ^{aa}	113,6 ± 6,4 ^{bβ}	18,6 ± 5,7 ^b	42(68) ^b
In vivo**	39		121,5 ± 3,0 ^b		

* Số liệu từ 3 lần thí nghiệm lặp lại. Mỗi lần lặp lại 19-23 COCGs

^{a, b} Các giá trị khác nhau trong mỗi cột mô tả sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$)

^{α, β} Mỗi giá trị đường kính trung bình khác biệt so với giá trị trước khi nuôi ($p < 0,05$, t-test)

In vivo **: Các phức hợp COCGs được thu nhận từ các nang có xoang đường kính 5-8 mm



Hình 3: Đồ thị thể hiện đường kính của noãn bào sau khi nuôi cấy sau 13 ngày

^{a, b, c, d} Các giá trị khác nhau mô tả sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$)

Bảng 2: Hình thái của trứng sau khi nuôi 13 ngày

Nghiệm thức	Số COCGs*	Số lượng noãn bào còn granulos (Số lượng noãn bào bị bóc trần)	
		(%)	(%)
ĐC	62	1 (2) ^a	61 (98) ^a
TN	62	29 (47) ^b	33 (53) ^b

* Số liệu từ 3 lần thí nghiệm lặp lại. Mỗi lần lặp lại 19-23 COCGs

^{a, b} Các giá trị khác nhau trong mỗi cột mô tả sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$, kiểm định χ^2 -test)

3.3 Sự thành thực noãn bào *in vitro*

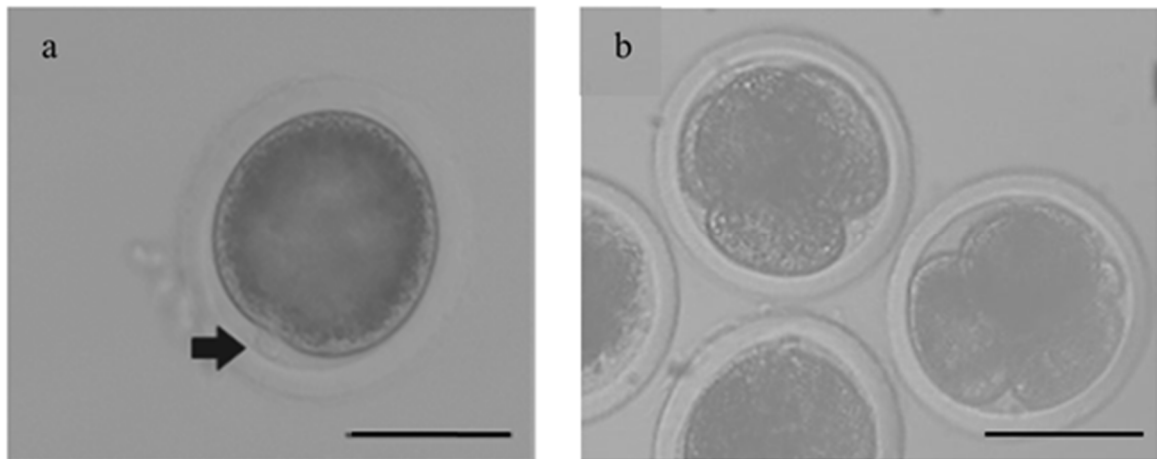
Sau khi nuôi tăng trưởng chỉ có những phức hợp noãn bào-cumulus chứa noãn bào có hình thái bình thường mới được nuôi thành thực. Tổng số 29 phức hợp noãn bào-cumulus thu được từ nghiệm thức TN của nuôi tăng trưởng được chia làm 2 nhóm, lần lượt là nhóm IVM (nuôi thành thực noãn bào *in vitro*; 14

COCGs) và nhóm IVF (thụ tinh trong ống nghiệm; 15 COCGs). Kết quả được thể hiện ở bảng 3 cho thấy: sau 24 giờ nuôi thành thực noãn bào (IVM), tỉ lệ trứng thành thực – xuất hiện thể cực thứ nhất là 35,7 % (5/14) (Hình 4-a). Sau khi nuôi thành thực, trứng được thụ tinh trong ống nghiệm (IVF), tỉ lệ phôi ghi nhận đến giai đoạn 4 tế bào đạt 26,7% (4/15) (Hình 4-b).

Bảng 3: Đánh giá sự thành thực của noãn bào ở nghiệm thức TN

Nhóm	Số COCGs ban đầu	Tỉ lệ xuất hiện thể cực (%)	Tỉ lệ phôi 4 tế bào (%)
Nuôi thành thực (IVM)	14	35,7 (5/14)	X
Tạo phôi (IVF)	15	X	26,7 (4/15)

X: không ghi nhận kết quả



Hình 4: Noãn bào thành thực. Thang đo 100 μm

(a) Noãn bào thành thực, (b) Trứng sau thụ tinh

➡ : thể cực thứ nhất; 🎯 : phôi 4 tế bào; 🚫 : trứng không thụ tinh

4 THẢO LUẬN

Theo sinh lý buồng trứng, noãn bào tăng trưởng về kích thước, chuẩn bị nguyên liệu, tiến hành giảm phân nhằm thành thực về chức năng trong suốt quá trình phát triển và sẵn sàng cho quá trình thụ tinh diễn ra sau đó (Harada *et al.*, 1997). Trong nghiên cứu này chúng tôi có thể khẳng định việc nuôi cấy *in vitro* các phức hợp COCGs giúp hoàn thiện sự phát triển noãn bào, noãn bào sau quá trình nuôi cấy tăng trưởng có khả năng tiếp tục giảm phân đến giai đoạn metaphase II (ghi nhận bởi sự xuất hiện thể cực thứ I). Bên cạnh đó, việc bổ sung các yếu tố như sodium pyruvate, hypoxanthine và estrogen vào môi trường nuôi cấy giúp hỗ trợ sự phát triển noãn bào tốt hơn so với môi trường không bổ sung những yếu tố này. Từ đó có thể khẳng định, sodium pyruvate, hypoxanthine và estrogen góp phần thúc đẩy sự phát triển noãn bào *in vitro*.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, nghiệm thức thí nghiệm có bổ sung sodium pyruvate, hypoxanthine

và estrogen có tỉ lệ tăng trưởng noãn bào là 18,6%. Tỉ lệ này cao hơn so với nghiên cứu tương tự, nuôi cấy tăng trưởng noãn bào với yếu tố bổ sung là pyroxanthine của Yamamoto và cộng sự được công bố năm 1999, nhóm tác giả chỉ đạt tỉ lệ tăng trưởng noãn bào là 16,1% (Yamamoto *et al.*, 1999). Điều này chứng tỏ, sodium pyruvate và estrogen bổ sung vào môi trường nuôi cấy tác động tích cực lên sự tăng trưởng của noãn bào. Hơn nữa, khi so sánh tỉ lệ các COCGs hình thành cấu trúc giống xoang nang với nhóm nghiên cứu của Harada *et al.* (1997) có thể thấy rằng, estrogen được bổ sung trong môi trường nuôi cấy hỗ trợ sự hình thành cấu trúc giống xoang nang tốt hơn.

Bên cạnh việc đánh giá sự tăng trưởng của noãn bào sau 13 ngày nuôi cấy COCGs *in vitro*, các noãn bào sau nuôi cấy cũng được đánh giá khả năng thành thực. Noãn bào được gọi là thành thực khi chúng có khả năng tạo thể cực thứ nhất và tạo phôi khi tiến hành IVF (Senbon and Miyano, 2002; Huang *et al.*, 2013; Endo *et al.*, 2014). Kết quả nghiên cứu đạt

35,7% noãn bào xuất hiện thể cực thứ nhất và 26,7% trong số chúng thụ tinh thành công (phát triển thành phôi 4 tế bào sau 48 giờ). Theo Senbon and Miyano, 2002, tỉ lệ noãn bào thành thực là 23% khi được nuôi tăng trưởng 16 ngày trong môi trường với môi trường tăng trưởng có bổ sung hypoxanthine (Senbon and Miyano, 2002). Trong một nghiên cứu khác của Endo *et al* cũng khẳng định, tỉ lệ noãn bào thành thực sau khi nuôi IVM là 22% trong trường hợp nuôi tăng trưởng 16 ngày có bổ sung 17 β -estradiol (Endo *et al.*, 2014). Sự khác biệt trong kết quả đánh giá sự thành thực noãn bào trong nghiên cứu này với các tác giả khác có thể là do thời gian khảo sát khác nhau hoặc cũng có thể là do tác động của việc tổ hợp các yếu tố, hay do số mẫu thu được không đủ lớn để xử lý thống kê. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Huang *et al*, các noãn bào được nuôi tăng trưởng từ những nang noãn có kích thước 0,5-1 mm 14 ngày (hoặc hơn) sẽ bị giảm khả năng thành thực (Huang *et al.*, 2013).

Nghiên cứu này chưa thể khẳng định rõ ràng việc tổ hợp các yếu tố môi trường nuôi bao gồm sodium pyruvate, hypoxanthine và estrogen có hiệu quả hơn so với việc sử dụng chúng một cách riêng lẻ hay không. Tuy vậy, nghiên cứu có thể khẳng định rằng, môi trường bổ sung ba yếu tố này hỗ trợ thành thực noãn bào (35,7%) và khả năng tạo phôi IVF (26,7%) tốt hơn so với môi trường không bổ sung (0%). Do vậy, để nang noãn tăng trưởng và thành thực *in vitro* cần thiết phải bổ sung đồng thời các tố tăng trưởng.

5 KẾT LUẬN

Môi trường nuôi cấy *in vitro* noãn bào (có đường kính 90-100 μ m) trong COCGs có bổ sung các hợp chất hypoxanthine, estrogen, sodium pyruvate đã cải thiện sự tăng trưởng và phát triển của noãn bào. Noãn bào sau khi nuôi tăng trưởng 13 ngày sẽ thành thực, xuất hiện thể cực thứ nhất và có khả năng tạo phôi 4 tế bào khi thực hiện IVF.

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện đề tài, nhóm nghiên cứu xin cảm ơn chân thành đến: ban lãnh đạo Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo mọi điều kiện và cung cấp kinh phí để thực hiện đề tài; ban giám đốc công ty Sơn Hà (Long An) đã hỗ trợ nguồn mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ngô Thị Mai Hương, Nguyễn Thị Thanh Giang, Nguyễn Tấn Cường, Trần Thanh Tiếng, Phan Kim Ngọc và Dương Hoa Xô, 2011. Một số cải tiến trong quy trình tạo phôi bò *in vitro* làm tăng hiệu suất tạo phôi đến giai đoạn phôi nang. Tạp chí Sinh học. 36(1): 112-120.

- Couse, J.F., Yates, M.M., Deroo, B.J. and Korach, K.S., 2005. Estrogen receptor- β is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Journal of Endocrinology*. 146(8): 3247-3262.
- Downs, S.M., Humpherson, G. and Leese, H. J., 2002. Pyruvate utilization by mouse oocytes is influenced by meiotic status and the cumulus oophorus. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 62(1): 113-123.
- Endo, M., Kimura, K., Kuwayama, T., Monji, Y. and Iwata, H., 2014. Effect of estradiol during culture of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the mitochondrial DNA copies of oocytes and telomere length of granulosa cells. *Zygote*. 22(4): 431-439.
- Eppig, J.J. and Downs, S.M., 1987. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development *in vitro*: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. *Developmental Biology*. 119(2): 313-321.
- Geshi, M., Takenouchi, N., Yamauchi, N. and Nagai, T., 2000. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biology of Reproduction*. 63(6):1730-1734.
- Harada, M., Miyano, T., Matsumura, K., Osaki, S., Miyake, M. and Kato, S., 1997. Bovine oocytes from early antral follicles grow to meiotic competence *in vitro*: effect of FSH and hypoxanthine. *Theriogenology*. 48(5):743-755.
- Hirao, Y., Itoh, T., Shimizu, M., et al., 2004. *In vitro* growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium. *Biology of Reproduction*. 70(1): 83-91.
- Hirao, Y., Shimizu, M., Iga, K. and Takenouchi, N., 2009. Growth of bovine oocyte-granulosa cell complexes cultured individually in microdrops of various sizes. *Journal of Reproduction and Development*. 55(1): 88-93.
- Hirao, Y., Shimizu, M., Iga, K. and Takenouchi, N., 2012. Optimization of oxygen concentration for growing bovine oocytes *in vitro*: constant low and high oxygen concentrations compromise the yield of fully grown oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. 58(2): 204-211.
- Huang, W., Nagano, M., Kang, S.-S., Yanagawa, Y. and Takahashi, Y., 2013. Effects of *in vitro* growth culture duration and prematuration culture on maturational and developmental competences of bovine oocytes derived from early antral follicles. *Theriogenology*. 80(7):793-799.
- Leese, H. and Barton, A.M., 1984. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *Journal of reproduction and fertility*. 72(1): 9-13.

- Makita, M. and Miyano, T., 2015. Androgens promote the acquisition of maturation competence in bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. 61(3): 211-217.
- Makita, M., Ueda, M. and Miyano, T., 2016. The fertilization ability and developmental competence of bovine oocytes grown in vitro. *Journal of Reproduction and Development*. 62(4): 379-384.
- Palter, S.F., Tavares, A.B., Hourvitz, A., Veldhuis, J.D. and Adashi, E.Y., 2001. Are estrogens of import to primate/human ovarian folliculogenesis?. *Endocrine*. 22(3): 389-424.
- Saha, S., Shimizu, M., Geshi, M. and Izaike, Y., 2000. In vitro culture of bovine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 63(1-2): 27-39.
- Senbon, S., and Miyano, T., 2002. Bovine oocytes in early antral follicles grow in serum-free media: effect of hypoxanthine on follicular morphology and oocyte growth. *Zygote*. 10(4): 301-309.
- Smetanina, I.G., Tatarinova, L. V. and Krivokharchenko, A. S., 2017. Effects of hypoxanthine at low concentrations on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Biology Bulletin*. 44(5): 477-480.
- Sun, J. and Li, X., 2013. Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture in vitro. *Reproductive Biology*. 13(3): 221-228.
- Sutton, M.L., Cetica, D., Beconi, M. T., Kind, K. L., Gilchrist, R. B. and Thompson, J. G., 2003. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*. 126(1):27-34.
- Yamamoto, K., Otoi, T., Koyama, N., Horikita, N., Tachikawa, S. and Miyano, T., 1999. Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*. 52(1): 81-89.