



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.030

NUÔI THÀNH THỰC NOÃN BÒ THU NHẬN TỪ NANG NOÃN HÌNH THÀNH XOANG GIAI ĐOẠN SỚM TRONG ĐIỀU KIỆN *in vitro*

Lê Thị Vĩ Tuyết¹, Dương Hoa Xô² và Nguyễn Thị Thanh Giang^{2*}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh

²Trung tâm Công nghệ Sinh học 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: 13/02/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Matured oocytes received from preantral follicles cultured *in vitro*

Từ khóa:

Nang noãn, nuôi cấy nang noãn, sự phát triển nang noãn, yếu tố tăng trưởng

Keywords:

Follicle maturation, folliculogenesis, IVF, IVM, preantral follicle, stimulators

ABSTRACT

Bovine preantral follicles (0.5–1 mm diameter) were collected from ovaries of slaughtered cows and cultured *in vitro* in TCM199 medium with 10% fetal bovine serum (FBS). Follicles were cultured growing in 4-well plates, coated mineral oil with the three treatments: (1) TCM199, 10% FBS (control); (2) TCM199, 10% FBS, sodium pyruvate (0.1 mg/mL); (3) TCM199, 10% FBS, sodium pyruvate (0.1 mg/mL), estradiol (1 µg/mL), follicle stimulating hormone (FSH 0.02 UI/mL) and lutenizing hormone (LH 0.01 UI/mL). After 18 days of growing, collect oocytes and make it mature within 24 hours. Criteria were assessed by increasing the size of the follicle and the possible formation of the first terminal. The study results show that *in vitro* cultures early antral follicles (diameter <1 mm) with the supplement of growth factors has greatly improved the growth and development of follicles. The rate of the follicle with a diameter of about 3 mm in a medium with the presence of FSH, LH, estradiol accounts for 53.33%, while the control group is 16.67%. The oocytes collected from follicles from the first terminal after 24 hours of culturing, the maturing rate is up to 56%. Research shows preantral follicles growth requires supplementation of sodium pyruvate, estradiol, FSH and LH.

TÓM TẮT

Nang noãn bò ở giai đoạn hình thành xoang sớm (đường kính 0,5 -1 mm) được thu nhận từ buồng trứng bò cái bị giết mổ và được nuôi cấy tăng trưởng *in vitro* trong môi trường TCM199 có 10% huyết thanh bào thai bò (FBS, fetal bovine serum). Các nang noãn sẽ được nuôi tăng trưởng trong đĩa 4 giếng, có phủ dầu khoáng với 3 nghiệm thức: (1) TCM199, 10% FBS (đôi chứng); (2) TCM199, 10% FBS, sodium pyruvate (0,1 mg/mL); (3) TCM199, 10% FBS, sodium pyruvate (0,1 mg/mL), estradiol (1 µg/mL), follicle stimulating hormone (FSH 0,02 UI/mL) và lutenizing hormone (LH 0,01 UI/mL). Sau 18 ngày nuôi tăng trưởng nang noãn, thu nhận và nuôi thành thực noãn bào trong 24 giờ. Chỉ tiêu đánh giá dựa vào sự tăng kích thước nang và sự hình thành thể cực thứ nhất. Kết quả cho thấy nuôi cấy nang noãn hình thành xoang sớm (đường kính <1 mm) *in vitro* có bổ sung các yếu tố tăng trưởng đã cải thiện đáng kể sự tăng trưởng và phát triển của nang noãn. Tỷ lệ nang noãn đạt đường kính khoảng 3mm trong môi trường có hiện diện FSH, LH, estradiol đạt 53,33%, trong khi đó ở nhóm đối chứng là 16,67%. Các noãn bào được thu từ những nang noãn này đã xuất hiện thể cực sau 24 giờ nuôi thành thực, tỉ lệ thành thực lên đến 56%. Nghiên cứu cho thấy, nuôi tăng trưởng nang noãn giai đoạn hình thành xoang sớm cần bổ sung sodium pyruvate, estradiol, FSH và LH.

Trích dẫn: Lê Thị Vĩ Tuyết, Dương Hoa Xô và Nguyễn Thị Thanh Giang, 2019. Nuôi thành thực noãn bò thu nhận từ nang noãn hình thành xoang giai đoạn sớm trong điều kiện *in vitro*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 229-234.

1 GIỚI THIỆU

Theo Trung tâm Thông tin và Thống kê Khoa học và Công nghệ (CESTI), thuộc Sở khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh, các nghiên cứu được báo cáo cho tới nay, tại Việt Nam vẫn chưa có đơn vị nào nghiên cứu sản xuất để cung cấp phôi bò thương mại nhằm phục vụ ngành công nghiệp bò sữa. Trong khi đó, đã có rất nhiều nghiên cứu về việc thụ tinh trong ống nghiệm và xác định giới tính phôi bò trước khi cấy chuyên. Trong thời gian từ năm 2010 – 2014, Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh đã thực hiện thành công các nghiên cứu về tạo phôi bò như “Cải tiến trong quy trình tạo phôi bò *in vitro* làm tăng hiệu suất tạo phôi đến giai đoạn phôi nang” (Ngô Thị Mai Hương và *ctv.*, 2011); “Nghiên cứu ứng dụng quy trình sinh thiết phôi nang và xác định giới tính phôi bò từ các phôi bào sinh thiết” (Ngô Thị Mai Hương và *ctv.*, 2011-2013, tài liệu chưa công bố). Những nghiên cứu này đã thu được một số kết quả như: tỉ lệ thụ tinh đạt khoảng 80%; tỉ lệ phôi bò phát triển tới giai đoạn phôi nang đạt 25% và đã thành công trong việc sinh thiết, xác định giới tính phôi bò trước khi cấy chuyên bằng phản ứng PCR.

Tuy nhiên, việc nghiên cứu tạo phôi bò *in vitro* hiện gặp khó khăn về nguồn noãn bào do noãn thu nhận trên buồng trứng bò cái (*in vivo*) có số lượng ít, số lượng nang noãn nhỏ thường nhiều và nang trội rất ít, thậm chí có những buồng trứng không có nang noãn trội (Ngô Thị Mai Hương và *ctv.*, 2011). Mặc dù vậy, buồng trứng bò là “kho” chứa các noãn bào chưa trưởng thành (những noãn bào này nằm trong các nang trứng thứ cấp, tam cấp...), nếu thu nhận và sử dụng được nguồn noãn này từ những con bò cao sản thì sẽ sử dụng hết được khả năng sinh sản của con cái có đặc tính di truyền tốt (Araújo *et al.*, 2014). Do đó, trước khi giết mổ, nên thu buồng trứng của chúng để khai thác toàn bộ các nang noãn thứ cấp, tam cấp đem nuôi cấy sẽ có nguồn noãn bào chất lượng cao, tiến hành thụ tinh trong ống nghiệm (IVF, *in vitro* fertilization) tạo phôi bò cao sản. Cho nên, việc nghiên cứu nuôi trưởng thành *in vitro* các

noãn bào ở bò thu nhận ở giai đoạn nang noãn thứ cấp, tam cấp... là rất cần thiết. Xuất phát từ tình hình thực tế, nghiên cứu nuôi thành thực noãn bò thu nhận từ nang noãn hình thành xoang giai đoạn sớm trong điều kiện *in vitro* được tiến hành.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

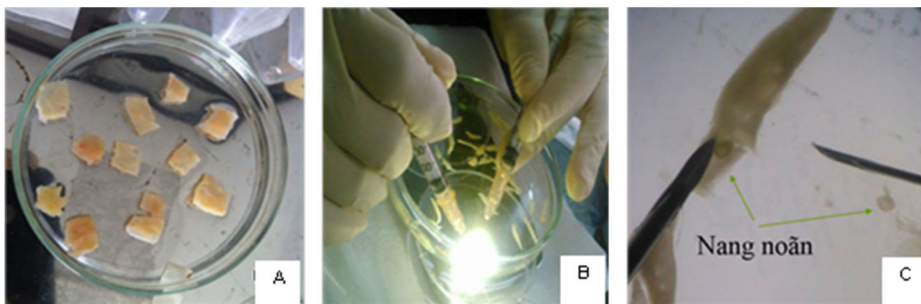
2.1 Đối tượng, hóa chất

Buồng trứng bò được cung cấp bởi lò mổ Sơn Thủy Hà (Long An). Buồng trứng bò sử dụng cho toàn bộ đề tài được thu nhận từ bò sữa (được thải loại từ các trang trại chăn nuôi bò sữa) mỗi con có trọng lượng khoảng 350-400 kg. Buồng trứng không có các dấu hiệu của xơ hóa hoặc u nang. Số buồng trứng bò sử dụng cho nghiên cứu là 180 buồng trứng.

Các hóa chất sử dụng cho nghiên cứu được mua từ hãng Sigma USA: FBS (fetal bovine serum); sodium pyruvate; FSH (follicle stimulating hormone); LH (lutening hormone); estradiol; penicilin/streptomycin; hyaluronidase, ngoại trừ môi trường M199 được mua ở Life Technologies (USA).

2.2 Xử lý buồng trứng và phân lập nang noãn

Mẫu buồng trứng được thu tại lò mổ, bảo quản trong muối đệm phosphate (phosphate-buffered saline, PBS) kháng sinh (penicilin/streptomycin) 2X, vận chuyển về phòng thí nghiệm trong 1-2 giờ sau khi thu nhận. Rửa sạch buồng trứng bằng PBS kháng sinh 1X; loại bỏ máu, mô mỡ, thể vàng và thu mảnh mô vỏ buồng trứng kích thước 1x1x10 mm trong môi trường M199 bổ sung penicillin 100 mg/mL, streptomycin 100 mg/mL và liberase 0,01 mg/mL, ủ ở 37°C trong 5 phút. Các nang có kích thước 500-1000 µm được phân lập từ những mảnh mô vỏ buồng trứng này bằng đầu kim 26G (Hình 1). Các nang trứng sau phân lập được chuyển vào môi trường rửa gồm M199, penicillin 100 mg/mL, streptomycin 100 mg/mL để chuẩn bị cho nuôi cấy *in vitro* (Hulshof *et al.*, 1994; Katska *et al.*, 1998; Gutierrez *et al.*, 2000).



Hình 1: Quá trình phân tách nang

(A): mảnh mô vỏ buồng trứng, (B,C): nang noãn được thu nhận dưới kính hiển vi

Nang noãn được nhuộm bằng neutral red (30 µg/mL) để đánh giá tỉ lệ sống/chết, nếu nang noãn bắt màu đỏ của thuốc nhuộm chứng tỏ nang noãn sống và ngược lại (Telfer *et al.*, 1998).

2.3 Nuôi cấy nang noãn *in vitro*

Các nang noãn sau khi chuyển qua môi trường rửa được đưa vào 500µL môi trường có phủ dầu khoáng trong đĩa nuôi 4 giếng tương ứng với các nghiệm thức: (1) TCM199, 10% FBS (đối chứng); (2) TCM199, 10% FBS, sodium pyruvate 0,1 mg/mL; (3) TCM199, 10% FBS, sodium pyruvate 0,1 mg/mL, estradiol 1 µg/mL, FSH 0,02 UI/mL và LH 0,01 UI/mL (Geshi *et al.*, 2000; Senbon and Miyano, 2002; Katska *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2013). Nang noãn được nuôi 18 ngày và thay môi trường nuôi cấy mỗi 3 ngày. Trong suốt quá trình nuôi nang noãn, đánh giá các chỉ tiêu: sự toàn vẹn của màng nền, hình dạng noãn bào và tế bào granulosa bao quanh nang bằng các hình ảnh ghi nhận qua kính vi thao tác. Đường kính của nang được đo mỗi 6 ngày trong suốt quá trình nuôi cấy.

2.4 Nuôi trưởng thành noãn bào *in vitro*

Các nang có kích thước khoảng 3 – 3,9 mm được chọn để thu nhận phức hợp noãn bào cumulus-granulosa và nuôi trưởng thành trong môi trường nuôi trưởng thành noãn bào (IVM, *in vitro* maturation). Môi trường IVM sử dụng có thành phần là M199 bổ sung 10% FBS, FSH 0,02 UI/mL, LH 0,01 UI/mL trong 24 giờ, 38,5°C, 5% CO₂ (Younis *et al.*, 1989; Xiao *et al.*, 2014). Mật độ noãn bào được nuôi 5-10 phức hợp/vi giọt 100 µL trên đĩa Ø35. Sự thành thực của noãn sau nuôi được đánh giá thông qua sự xuất hiện thể cực thứ nhất. Noãn bào được loại bỏ các tế bào cumulus, granulosa bám xung quanh bằng cách thêm 10 µL dung dịch hyaluronidase (0,3 µg/mL) vào mỗi vi giọt nuôi cấy và ủ trong 20 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 granulosa bao quanh bằng pipette pasteur, quan sát sự hiện diện của thể cực thứ

nhất và ghi nhận kết quả.

2.5 Phương pháp xử lý số liệu

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

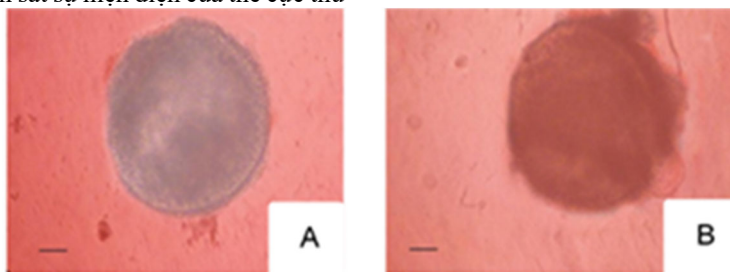
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập nang trứng từ mô vỏ buồng trứng

Các kết quả ghi nhận ở thí nghiệm này được thực hiện lặp lại 5 lần (Bảng 1); trong đó, 3 lần đầu nhằm tối ưu hóa quy trình phân lập, đánh giá tỉ lệ nang sống sau khi phân lập và ở 2 lần sau, tiếp tục quy trình để ghi nhận kết quả nhuộm nang sau 24 giờ phân lập. Thí nghiệm được tiến hành với mục tiêu đánh giá phương pháp phân lập có làm nang bị tổn thương và chết từ từ hay không và từ đó xây dựng quy trình thu nhận nang trứng cho các thí nghiệm kế tiếp. Kết quả cho thấy có hai hiện tượng có thể quan sát rõ ràng khi thực hiện nhuộm neutral red. Hiện tượng thứ nhất, 30 phút sau khi nhuộm, nang sống bắt màu thuốc nhuộm và nang chết không bắt màu thuốc nhuộm (Hình 2). Hiện tượng thứ hai sau 24 giờ nhuộm, các nang từng bắt màu thuốc nhuộm sau 30 phút nhuộm đã không còn bắt màu thuốc nhuộm nữa. Từ hai hiện tượng quan sát được trong suốt thí nghiệm đánh giá tình trạng sống chết của nang có thể rút ra hai nhận định:

Các nang sau khi phân lập bằng cơ học và enzyme có bị tổn thương và chết ngay sau khi phân lập.

Các nang trứng sau phân lập vẫn có khả năng bắt màu thuốc nhuộm, cho thấy nang vẫn còn sống. Tuy nhiên, có thể nang đã bị tổn thương, do đó khi đánh giá tại thời điểm 24 giờ sau phân lập, các nang này chết đi. Điều này có thể khẳng định, quá trình phân lập trên có thể làm nang bị tổn thương và chết sau 24 giờ được nuôi cấy.



Hình 2: Tình trạng nang trứng sau khi phân lập. Thang đo 200 µm

(A): nang chết, (B): nang sống

Kết quả Bảng 1 cho thấy tỉ lệ nang sống sau 24 giờ phân lập ở các lần thí nghiệm đều đạt khoảng

80% và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả này thấp hơn so với công bố của

Chambers *et al.* (2010), nghiên cứu đạt tỉ lệ nang noãn sống sau phân lập là 90%. Tuy nhiên, tỉ lệ nang sống của nhóm vẫn cao hơn so với công bố của Jorssen *et al.* (2014), nhóm tác giả chỉ đạt tỉ lệ tương đương 70%. Điều này cho thấy, việc phân lập chủ yếu dựa vào kỹ thuật của người nghiên cứu, vì đa số

các nang đều được tách bằng cách dùng kim 26G. Với 80,5% nang noãn sống sau phân lập và không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê về kết quả này giữa những lần phân lập, do đó quy trình thu nhận nang noãn này được sử dụng để thực hiện các nghiệm thức tiếp theo.

Bảng 1: Số lượng nang sống khi được phân lập bằng cơ học kết hợp enzyme

Thứ tự thực hiện	Tổng số nang thu nhận	Số lượng nang sống sau 24h phân lập
Lần 1	49	39
Lần 2	51	41
Lần 3	49	39
Lần 4	22	18
Lần 5	21	17
Trung bình (nang)	38,40 ± 15,45	30,80 ± 12,17
Tỉ lệ nang sống trung bình (%)	80,50 ± 0,95	

3.2 Nuôi cấy nang noãn *in vitro*

Nang noãn được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung agarose 1%, sử dụng 3 loại môi trường khác nhau: (1) TCM199, 10% FBS (đối chứng), (2) TCM199, 10% FBS, sodium pyruvate 0,1 mg/mL, (3) TCM199, 10% FBS, sodium pyruvate 0,1 mg/mL, estradiol 1 µg/mL, FSH 0,02 UI/mL và LH

0,01 UI/mL. Tổng số nang noãn sử dụng trong thử nghiệm là 1083 nang, đường kính nang khoảng từ 577,8-756,8 µm. Sau 18 ngày nuôi cấy, tỉ lệ nang noãn đạt được kích thước khoảng 3 mm ở 3 nghiệm thức lần lượt là 16,67% (60/360), 36,36% (132/363) và 53,33% (192/361) (số liệu không trình bày). Kết quả chi tiết về sự thay đổi đường kính và tỉ lệ nang noãn hình cầu được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2: Kết quả nuôi cấy nang noãn *in vitro*

		Môi trường (1)	Môi trường (2)	Môi trường (3)
Số lượng nang noãn thu nhận		360	363	360
Đường kính nang noãn X ± SD (µm)	Ngày 0	667,90 ± 49,76 ^a	676,03 ± 50,80 ^a	662,92 ± 52,33 ^a
	Ngày 18	2713,00 ± 270,66 ^b	2814,65 ± 210,36 ^b	2965,12 ± 98,68 ^b
% nang noãn có dạng hình cầu sau 18 ngày nuôi cấy		132/360 (36,7%)	187/363 (51,5%)	204/360 (56,7%)

a, b: Giá trị của các chữ số mũ trong cùng một hàng khác nhau là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

X: giá trị trung bình, SD: độ lệch chuẩn

Kích thước nang noãn ở hầu hết các môi trường nuôi đều tăng sau 18 ngày. Mặc dù không khác biệt khi xử lý thống kê về kích thước nang noãn tại thời điểm ngày 18 giữa các môi trường nuôi với nhau, nhưng nhóm nang được nuôi trong môi trường bổ sung sodium pyruvate, estradiol, FSH và LH (môi trường 3) đạt được đường kính nang lớn nhất, đạt 2965 µm. Đa số các nang noãn tăng trưởng sau 6 ngày nuôi cấy sẽ sống đến hết quá trình khảo sát. Trong môi trường 3, các nang trứng vẫn sống và giữ được cấu trúc hình cầu, với tỉ lệ cao nhất đạt 56,7% trong khi đó nhóm đối chứng chỉ đạt 36,7%.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 18 ngày nuôi, các nang noãn được nuôi trong môi trường bổ sung sodium pyruvate, estradiol, FSH và LH (môi trường 3) có sống lượng nang sống, hình thái bình thường (hình cầu) và tỉ lệ noãn bào thành thực cao nhất. Điều này khẳng định vai trò của các yếu tố: sodium pyruvate, estradiol, FSH và LH trong việc phát triển nang noãn *in vitro*. Các nghiên cứu trước đây cũng

đã góp phần khẳng định kết quả trên (Saha *et al.*, 2000). Sodium pyruvate được coi là nguồn cung cấp năng lượng cho các hoạt động chuyển hóa. Một vài nghiên cứu ở bò cho thấy, sự trao đổi chất của noãn bào ở bò khi có sodium pyruvate tăng lên trong suốt quá trình nuôi cấy (Geshe *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 2014). Có giả thuyết cho rằng, tế bào cumulus chuyển hóa glucose thành pyruvate hoặc qua chu kỳ trung gian Krebs có thể chuyển đến noãn bào và tăng chất lượng noãn trưởng thành trong thí nghiệm (Geshe *et al.*, 2000). Theo Jewgenow *et al.* (1998), việc bổ sung sodium pyruvate vào môi trường nuôi góp phần giữ hình thái bình thường cho nang. Các yếu tố khác như estradiol - được tổng hợp trên tế bào granulosa của các nang noãn đã hình thành xoang, ảnh hưởng đến quá trình phát triển của noãn bào; FSH kích thích tế bào granulosa tăng sinh, hình thành xoang, tạo steroid và lactate, và nó hoạt động có sự tương tác với gonadotrophin; LH bổ sung vào môi trường nuôi cấy cũng làm tăng sức sống của nang, sự hình thành xoang nang (Geshe *et al.*, 2000).

Theo Sasha *et al.* (2000), FSH và LH hoạt hóa hệ thống cAMP để tăng hoạt động của chuỗi enzyme bao gồm sự hình thành steroid trên các tế bào granulosa. Riêng sự hoạt động của hệ thống cAMP và tăng nồng độ estrogen dẫn đến sự tăng trưởng và phát triển của các noãn bào (Sasha *et al.*, 2000).

Trong nghiên cứu này, các nang noãn được đồng nuôi cấy nhiều nang trong đĩa nuôi 4 giếng và kết quả cho tỉ lệ nang tăng trưởng còn khá thấp, có 50,33% nang đạt được kích thước khoảng 3 mm (số liệu không trình bày) - sẵn sàng cho nuôi thành thực (IVM). Trong nghiên cứu của Katska *et al.* (1998), họ chứng minh được việc nuôi cấy riêng lẻ các nang noãn có đường kính >325 µm trong vi giọt, sẽ cho tốc độ tăng trưởng cao hơn so với đồng nuôi cấy nhiều nang noãn. Điều này cũng giải thích cho việc nuôi cấy đồng thời nhiều nang noãn như trong thí nghiệm của nghiên cứu này sẽ không đạt được kết quả cao. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Gutierrez *et al.* (2000) cho thấy IGF-I (yếu tố tăng trưởng giống insulin 1, insulin-like growth factor 1) và EGF (yếu tố tăng trưởng biểu bì, epidermal growth factor) làm tăng tỉ lệ tăng trưởng và hình thành xoang của nang noãn nhưng không tác động lên sự tăng trưởng của noãn bào. Nghiên cứu của Berisha *et al.* (2004), FGF (yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi, fibroblast growth factor) là nhân tố tham gia vào quá trình hình thành nang noãn và đặc biệt là trong quá trình tăng trưởng cuối cùng của các nang ở giai đoạn tiền

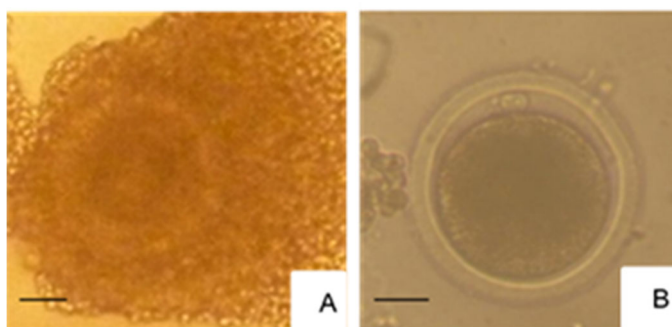
phóng noãn bằng cách kích thích sự hình thành mạch. Do đó, việc nuôi cấy nang noãn đơn lẻ và bổ sung các yếu tố tăng trưởng (growth factors) như: FGF, IGF, EGF có thể giúp nâng cao tốc độ tăng trưởng, tỉ lệ nang noãn sống và giữ nguyên cấu trúc đồng thời cải thiện tỉ lệ noãn bào thành thực từ nang sau nuôi cấy. Từ đó cho thấy, việc bổ sung estradiol, FSH và LH cũng giúp cải thiện đáng kể sự phát triển của nang, tuy nhiên đó vẫn chưa phải là môi trường tối ưu cho sự phát triển của nang noãn.

3.3 Nuôi thành thực noãn bào *in vitro*

Noãn bào được thu từ các nang đạt đường kính khoảng 3mm sau 18 ngày nuôi, sau đó được nuôi thành thực trong môi trường IVM trong 24h. Kết quả ghi nhận được, noãn ở cả 3 nghiệm thức xuất hiện thể cực thứ nhất (Hình 3). Nhóm noãn bào được thu nhận từ nang noãn nuôi tăng trưởng trong môi trường 3 có tỉ lệ trứng xuất hiện thể cực thứ nhất cao nhất đạt 56,25%, cao hơn so với nhóm 1 và 2 lần lượt là 40% và 50% (Bảng 3). Các nang này được thu từ 3 môi trường nuôi tăng trưởng khác nhau, nhưng được nuôi thành thực bằng cùng 1 môi trường và tỉ lệ thành thực khác nhau, có thể khẳng định quá trình nuôi tăng trưởng nang đã giúp não bào phát triển toàn diện và môi trường nuôi tăng trưởng đã ảnh hưởng đến tỉ lệ thành thực của noãn bào - xuất hiện thể cực thứ nhất. Những noãn bào đã xuất hiện thể cực thứ nhất thì có khả năng kết hợp cùng tinh trùng để tạo phôi IVF.

Bảng 3: Kết quả nuôi trưởng thành noãn bào *in vitro* IVM

Môi trường nuôi cấy	Môi trường (1)	Môi trường (2)	Môi trường (3)
Số lượng nang noãn thu nhận để IVM	60	132	192
Tỉ lệ noãn bào xuất hiện thể cực thứ nhất (%)	40% (24/60)	50% (66/132)	56,25% (108/192)



Hình 3: Nuôi thành thực noãn bào *in vitro*. Thang đo 50µm

(A): Noãn tách từ nang, (B): noãn xuất hiện thể cực thứ nhất

Kết quả nghiên cứu này được so sánh với nghiên cứu nuôi cấy nang noãn kích thước khác nhau của nhóm nghiên cứu Younis *et al.* (1989) và Hirao *et al.* (2014). Theo Younis *et al.* (1989), các noãn bào thành thực (xuất hiện thể cực thứ nhất) sau nuôi trưởng thành IVM các phức hợp OCG (COCGs,

phức hợp noãn bào-cumulus-granulosa) từ nang noãn có kích thước lớn hơn 5 mm là 70,4% trong môi trường IVM bổ sung FSH, LH và estradiol. Trong khi đó, nhóm nghiên cứu Hirao *et al.* (2014) đạt kết quả IVM là 52,1% đối với các noãn bào thu nhận từ những nang noãn có kích thước 0,5-0,8 mm

sau 14 ngày nuôi cấy trong môi trường bổ sung FSH, LH, EGF (yếu tố tăng trưởng ngoại bì, epidermal growth factor) (Hirao *et al.*, 2014). Từ đó cho thấy, kết quả của nhóm nghiên cứu đạt được (56,25% trứng thành thực sau khi IVM) cũng tương tự như các nhóm nghiên cứu. Có thể đưa ra khuyến cáo noãn bào tăng trưởng *in vivo* càng lâu thì khả năng trưởng thành *in vitro* càng cao và việc bổ sung estradiol hay EGF có hỗ trợ thêm sự trưởng thành noãn bào *in vitro*.

4 KẾT LUẬN

Phương pháp để thu nhận nang noãn từ mô vô buồng trứng bò trong thời gian nhanh và tỉ lệ nang sống sau phân lập cao, đó là nang trứng cần được phân tách cơ học kết hợp enzyme. Quá trình nuôi cấy nang noãn đã hình thành xoang sớm (đường kính <1 mm) *in vitro* rất cần thiết có sự bổ sung kết hợp với nhau giữa các yếu tố như: FSH, LH, estradiol và sodium pyruvate. Trứng thu nhận từ những nang này sau quá trình nuôi cấy có khả năng thành thực với tỉ lệ đạt được khoảng 56%.

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 Tiêng, 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.

Araújo, V.R., Gastal, M.O., Figueiredo, J.R., and Gastal, E.L., 2014. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 12(1): 78.

Berisha, B., Sinowatz, F., and Schams, D., 2004. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 67(2): 162-171.

Chambers, E., Gosden, R., Yap, C., and Picton, H., (2010). *In situ* identification of follicles in ovarian cortex as a tool for quantifying follicle density, viability and developmental potential in strategies to preserve female fertility. *Human reproduction*. 25(10): 2559-2568.

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*. 36(6): 1730-1734.

Gutierrez, C.G., Ralph, J.H., Telfer, E.E., Wilmut I., and Webb, R., 2000. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 62(5): 1322-1328.

Hirao, Y., Somfai, T., and Naruse, K., 2014. *In vitro* growth and maturation of vitrified-warmed bovine oocytes collected from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Development*. 60(1): 68-72.

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.

Hulshof, S.C.J., Figueiredo, J.R., Becker, S.J.F., Bevers M.M., and Van Den Hurk R., 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Veterinary Quarterly*. 16(2): 78-80.

Jewgenow, K., Penfold, L.M., Meyer, H.H., Wildt, D.E., 1998. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *Journal of reproduction and fertility*. 112(1): 39-47.

Jorssen, E. P., Langbeen, A., Fransen, E., Martinez, E. L., Leroy, J. L., and Bols, P. E., 2014. Monitoring preantral follicle survival and growth in bovine ovarian biopsies by repeated use of neutral red and cultured *in vitro* under low and high oxygen tension. *Theriogenology*. 82(3): 387-395.

Katska, L., and Ryńska, B., 1998. The isolation and *in vitro* culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. *Theriogenology*. 50(2): 213-222.

Saha, S., Shimizu, M., Geshi, M., and Izaïke, Y., 2000. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Animal reproduction science*. 63(1): 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.

Telfer, E. E., Binnie, J. P., and Jordan, L. B., 1998. Effect of follicle size on the onset of apoptotic cell death in cultured bovine ovarian follicles. *Theriogenology*. 1(49): 357-363.

Xiao, X., Zi, X. D., Niu, H. R., et al., 2014. Effect of addition of FSH, LH and proteasome inhibitor MG132 to *in vitro* maturation medium on the developmental competence of yak (*Bos grunniens*) oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 12(1): 30-38.

Younis, A. I., Brackett, B. G., and Fayrer-Hosken, R. A., 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete research*. 23(2): 189-201.