

- activation and somatic cell nuclear transplantation. J. Rep. Dev., 59:78-84.
15. Kwak S.S., Cheong S.A., Jeon Y., Lee S., Choi K.C., Jeung E.B. and Huynh S.H. (2012). The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. Theriogenol. Anim. Rep., 78(1): 86-01.
 16. Lin H.J., Chen W.L., Chen T.H., Kung Y.J. and Wan L. (2014). Vascular endothelial growth factor-460 C/T BstUI Gene polymorphism is associated with primary open angle glaucoma. Biomedicine, 4: 20-23.
 17. Nalbandian A., Dettin L., Dym M. and Ravindranath N. (2003). Expression of vascular endothelial growth factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse. Biol. Rep., 69: 985-94.
 18. Nguyen N.T., Lin P.C., Siriboon C., Lo N.W. and Ju J.C. (2010). Sonic Hedgehog improves *in vitro* development of porcine parthenotes and handmade cloned embryos. Theriogenol., 74: 1149-60.
 19. Nilsson M. and Heymach J.V. (2006). Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. J. Thorac Oncol., 1: 768-70.
 20. Olsson A.K., Dimberg A., Kreuger J. and Claesson-Welsh L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. Nat Rev. Mol. Cell Biol., 7: 359-71.
 21. Shimizu T. (2006). Promotion of ovarian follicular development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) and growth differentiation factor 9 (GDF-9) genes. J. Rep. Dev., 52: 23-32.
 22. Nguyễn Ngọc Tấn, Trần Hồ Ái Ngân và Phạm Thị Ngọc Trúc (2019). Ảnh hưởng của đồng nuôi cấy phức hợp tế bào trứng heo có chất lượng khác nhau đến khả năng thành thực nhân trong điều kiện *in vitro*. Tạp chí KHKT Chăn nuôi, 251: 65-70.
 23. Trousdale R.K., Pollak S.V., Klein J., Lobel L., Funahashi Y., Feirt N. and Lustbader J.W. (2007). Single-chain bifunctional vascular endothelial growth factor (VEGF)-follicle-stimulating hormone (FSH)-C-terminal peptide (CTP) is superior to the combination therapy of recombinant VEGF plus FSH-CTP in stimulating angiogenesis during ovarian folliculogenesis. Endocrinol., 148: 1296-05.
 24. Winther H., Leiser R., Pfarrer C. and Dantzer V. (1999). Localization of micro- and intermediate filaments in non-pregnant uterus and placenta of the mink suggests involvement of maternal endothelial cells and periendothelial cells in blood flow regulation. Ana. Embryol., 200: 253-63.
 25. Yan L., Luo H., Gao X., Liu K. and Zhang Y. (2012). Vascular endothelial growth factor-induced expression of its receptors and activation of the MAPK signaling pathway during ovine oocyte maturation *in vitro*. Theriogenol., 78: 1350-60.
 26. Zimmermann R.C., Xiao E., Husami N., Sauer M.V., Lobo R., Kitajewski J. and Ferin M. (2001). Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. J. Clin. Endocrinol. Metab., 86: 768-72.

ẢNH HƯỞNG CỦA TẾ BÀO CUMULUS ĐẾN HIỆU QUẢ THỤ TINH VÀ TẠO PHÔI BÒ *IN VITRO*

Nguyễn Khánh Vân¹, Phạm Thị Kim Yến¹ và Phạm Doãn Lâm^{2*}

Ngày nhận bài báo: 10/07/2021 - Ngày nhận bài phản biện: 10/08/2021

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 20/08/2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của tế bào cumulus trong quá trình thụ tinh và tạo phôi bò *in vitro*. Tế bào trứng bò có hoặc không có cumulus được sử dụng cho quá trình thụ tinh và tạo phôi bò *in vitro*. Tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ đa tinh trùng của nhóm không có cumulus là cao hơn nhóm có cumulus (tương ứng 91,12 và 10,92% so với 80,91 và 2,24%, $P < 0,05$). Không có sự khác biệt về tỷ lệ phân chia giữa nhóm có cumulus và không có cumulus (tương ứng 80,04% so với 79,98%, $P > 0,05$). Tuy nhiên tỷ lệ tạo phôi nang của nhóm có cumulus là cao hơn nhóm không có cumulus (tương ứng 35,68% so với 26,75%, $P < 0,05$). Không có sự khác biệt về chất lượng phôi nang bò *in vitro* được tạo ra từ hai nhóm có và không có cumulus. Việc sử dụng tế bào trứng bò thành thực *in vitro* có tế bào cumulus trong quá trình thụ tinh sẽ nâng cao hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*.

Từ khóa: Tế bào trứng bò, IVE, phôi nang, tế bào cumulus.

¹ Phòng TNTĐ Công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi

² Viện Chăn nuôi

* Tác giả liên hệ: TS. Phạm Doãn Lâm, Phó Viện trưởng Viện Chăn nuôi. Điện thoại: 0914366975; Email: pdlanvn@yahoo.com

ABSTRACT

Influence of cumulus cells on fertilization and production of bovine embryos *in vitro*

The present study was conducted to evaluate the influence of cumulus cells during bovine IVF. Oocytes with or without cumulus cell were used for fertilization to create bovine blastocysts *in vitro*. The fertilized and polyspermic rates of free cumulus cell group were higher than that of cumulus-oocytes complexes group (91.12 and 10.92% versus 80.91 and 2.24%, $P < 0.05$, respectively). There was no difference in the cleavage rates of free cumulus cell and cumulus-oocytes complexes groups (80.04% versus 79.98%, $P > 0.05$, respectively). However, the blastocyst rate of cumulus-oocytes complexes group was higher than that of free cumulus cell group (35.68% versus 26.75%, $P < 0.05$, respectively). There was no difference in the quality of bovine blastocyst *in vitro* from free cumulus cell and cumulus-oocytes complexes group. The use of bovine cumulus-oocytes matured *in vitro* in fertilization will improve the efficiency of production of bovine embryos *in vitro*.

Keywords: Oocytes bovine, IVF, blastocyst, cumulus cells.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào cumulus chỉ có ở tế bào trứng của động vật có vú, tế bào trứng và lớp tế bào cumulus bao xung quanh tế bào trứng kết hợp với nhau để thực hiện quá trình trao đổi chất bên trong tế bào chất của tế bào trứng thông qua các cầu nối liên kết (Fatehi và ctv, 2005). Tế bào cumulus hỗ trợ cho quá trình thành thực nhân của tế bào trứng đến giai đoạn Metaphase II và quá trình thành thực tế bào chất. Sự thành thực của tế bào chất tế bào trứng giúp tế bào trứng hoàn thành quá trình thụ tinh thông thường và phát triển tiếp theo của phôi (Van và ctv, 2002).

Mặc dù có một số nghiên cứu cho thấy vai trò quan trọng của tế bào cumulus đối với quá trình thành thực tế bào trứng, nhưng lại không có sự nhất quán về vai trò của tế bào cumulus trong quá trình thụ tinh và phát triển tiếp theo của phôi. Việc loại bỏ tế bào cumulus khỏi tế bào trứng thành thực *in vitro* trước khi thụ tinh làm tăng tỷ lệ thụ tinh ở trâu (Nandi và ctv, 1998), ở lợn (Kikuchi và ctv, 1993), nhưng lại làm giảm tỷ lệ thụ tinh ở bò (Fatehi và ctv, 2002). Tuy nhiên cho đến nay không có nhiều thông tin về vai trò của tế bào cumulus trong quá trình thụ tinh và phát triển tiếp theo của phôi, đặc biệt là phôi *in vitro*.

Chăn nuôi bò thịt là thành phần không thể thiếu để phát triển kinh tế nông nghiệp nước ta. Trong bối cảnh dịch tả lợn châu Phi đang là một trở ngại lớn cho việc tái đàn, phát triển đàn lợn, chăn nuôi bò thịt là hướng đi tổng

hợp nhất có thể giải quyết đồng thời nhiều vấn đề trong đời sống người chăn nuôi. Hiện nay, sản lượng thịt bò trong nước mới chỉ đáp ứng được 30% nhu cầu tiêu dùng của người dân, 70% còn lại là lượng thịt bò nhập khẩu. Do đó cần có một chiến lược để tăng nhanh và phát triển bền vững ngành chăn nuôi bò thịt. Công nghệ tạo phôi bò *in vitro* kết hợp với cấy truyền phôi là một công cụ hữu hiệu, đáp ứng được nhu cầu cấp bách này.

Công nghệ sản xuất phôi bò *in vitro* không chỉ giúp tạo ra những đàn bò có giá trị di truyền cao mà còn cung cấp một lượng lớn phôi bò sử dụng cho các nghiên cứu như: xác định giới tính phôi, nhân bản, cấy chuyển nhân, chuyển gen (Galli và Lazzari, 2008). Mặc dù các nhà nghiên cứu cũng đã nỗ lực nâng cao hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*, tuy nhiên hiệu quả của quá trình tạo phôi bò *in vitro* vẫn còn thấp. Theo Sirad và ctv (2006), chỉ có 30-40% tế bào trứng sau khi thành thực *in vitro* được thụ tinh và phát triển đến giai đoạn phôi nang.

Tại Việt Nam, việc nghiên cứu tạo phôi bò *in vitro* đã được thực hiện từ những năm 1990 và hiện nay vẫn đang được tiếp tục nghiên cứu tại Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam; Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào động vật - Viện Chăn nuôi và Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có báo cáo nào đánh giá về vai trò của tế bào cumulus trong quá trình thụ tinh *in vitro* tế bào trứng bò. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh

hường của tế bào cumulus đến hiệu quả thụ tinh và tạo phôi bò thịt *in vitro*, hướng tới mục đích tạo được nguồn phôi bò thịt thương mại có chất lượng tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tế bào trứng bò thu từ buồng trứng bò thịt tại các lò mổ ở huyện Đông Anh - Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu buồng trứng bò thịt tại lò mổ

Buồng trứng được thu từ bò thịt cái tại các lò mổ ở Đông Anh, Hà Nội ngay sau khi giết mổ.

Rửa buồng trứng 3 lần trong môi trường DPBS có bổ sung kháng sinh. Dùng kéo vô trùng cắt bỏ hoàn toàn phần cuống và các dây chằng bám vào buồng trứng.

Bảo quản buồng trứng trong bình vô trùng ổn nhiệt 35°C có chứa dung dịch DBPS + kháng sinh và được vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm trong vòng 2-3 giờ để thu tế bào trứng.

2.2.2. Thu và lựa chọn tế bào trứng từ buồng trứng

Sử dụng phương pháp chọc hút để thu tế bào trứng bò từ buồng trứng lò mổ. Quá trình chọc hút thu tế bào trứng bò từ buồng trứng lò mổ được thực hiện như sau: Tế bào trứng bò được thu từ những nang có đường kính 3-8mm trên buồng trứng bằng phương pháp chọc hút. Sử dụng xylanh 5ml với kim tiêm 18G có chứa dung dịch thu tế bào trứng (TALP-Hepes có bổ sung huyết thanh bê và kháng sinh) để chọc hút tế bào trứng. Sau chọc hút, toàn bộ lượng dịch trong xylanh được cho vào các đĩa Petri Φ 90mm, để lắng 5-10 phút trên bàn ổn nhiệt 37°C trước khi soi tìm trên kính hiển vi soi nổi. Các tế bào trứng sau khi soi tìm dưới kính hiển vi soi nổi được đánh giá và phân loại theo tiêu chuẩn của Zeron và ctv (2001). Trong nghiên cứu này chỉ sử dụng các tế bào trứng loại A, B. Các tế bào trứng loại A, B là những tế bào có từ 3 lớp tế bào cumulus bao xung quanh tế bào chất, liên kết chặt chẽ, không giãn nở, nguyên sinh chất đồng đều.

2.2.3. Nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng bò

Chuẩn bị môi trường nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng bò: môi trường TCM 199 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) có bổ sung 1 μ g/ml Cysteamine, 200 μ g/ml FSH, 5% huyết thanh thai bò, kháng sinh. Tế bào trứng bò ngay sau khi thu được rửa 3 lần trong môi trường nuôi, sau đó chuyển sang nuôi trong đĩa 4 giếng có chứa môi trường nuôi 22-24 giờ ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂ và độ ẩm không khí bão hòa (50 tế bào trứng/giếng).

2.2.4. Đánh giá tế bào trứng bò sau nuôi thành thực *in vitro*

Các tế bào trứng bò sau khi nuôi thành thực *in vitro*, loại bỏ hoàn toàn lớp tế bào cumulus bao xung quanh bằng dung dịch Hyaluronidase trong TALP-Hepes với thời gian 3 phút. Tiếp tục các tế bào trứng được rửa 2-3 lần trong môi trường TALP-Hepes có bổ sung huyết thanh bê.

Các tế bào trứng bò sau khi được loại bỏ hoàn toàn lớp tế bào cumulus bao xung quanh sẽ được chuyển sang quan sát dưới kính hiển vi soi nổi để lựa chọn các tế bào trứng thành thực. Những tế bào trứng thành thực là những tế bào trứng có sự xuất hiện của thể cực thứ nhất.

2.2.5. Thụ tinh *in vitro* tế bào trứng bò

Sử dụng nguồn tinh trùng bò thịt đông lạnh của Trạm nghiên cứu và sản xuất tinh bò Moncada cho quá trình thụ tinh *in vitro* tế bào trứng bò. Quá trình thụ tinh *in vitro* tế bào trứng bò được thực hiện như sau:

Tinh trùng bò thịt đông lạnh được giải đông ở 37°C, sau đó được rửa 2 lần trong môi trường BO-IVF (Ivf Bioscience, USA).

Pha loãng tinh trùng sau rửa bằng môi trường BO-IVF. Nồng độ tinh trùng sau pha loãng ở mức 5x10⁶/ml là phù hợp cho quá trình thụ tinh *in vitro* tế bào trứng bò.

Rửa tế bào trứng bò sau thành thực *in vitro* 3 lần trong môi trường BO-IVF, tế bào trứng trước khi thụ tinh sẽ được giữ nguyên hoặc loại bỏ một phần lớp tế bào cumulus bao xung quanh; tiếp theo chuyển tế bào trứng và

tinh trùng đã được pha loãng vào giọt thụ tinh có chứa môi trường BO-IVF và đông nuôi cấy 5 giờ ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ và độ ẩm không khí bão hòa.

2.2.6. Nuôi phôi bò *in vitro*

Sau 5 giờ đông nuôi cấy, các hợp tử giả định sẽ được loại bỏ hết tế bào cumulus bao xung quanh. Tiếp theo các hợp tử giả định được chuyển sang môi trường nuôi phôi bò *in vitro* (SOF có bổ sung huyết thanh thai bò) ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ và độ ẩm không khí bão hòa.

Đánh giá khả năng phân chia ở ngày thứ 2, tạo phôi nang ở ngày thứ 7-8 sau thụ tinh *in vitro*.

2.2.7. Nhuộm Hoechst 33342

Nhuộm tế bào trứng/phôi được thực hiện như sau: Chuẩn bị 3 loại môi trường: (1) Hoechst 33342 stock: 250µg Hoechst 33342/ml Ethanol tuyệt đối; (2) Dung dịch nhuộm tế bào trứng/phôi: 50µl Hoechst 33342 stock + 450µl Ethanol tuyệt đối; (3) Dung dịch rửa tế bào trứng/phôi: PBS + 0,3% PVP. Rửa tế bào trứng/phôi trong dung dịch PBS có bổ sung 0,3% PVP; tiếp theo chuyển tế bào trứng/phôi vào dung dịch nhuộm tế bào trứng/phôi để qua đêm ở 4°C. Chuẩn bị đĩa 4 giếng: giếng 1 chứa 500µl Ethanol tuyệt đối; giếng 2 chứa 1ml Glycerol. Hút tế bào trứng/phôi sau khi đã

cố định trong dung dịch nhuộm tế bào trứng/phôi vào giếng 1 để rửa phôi, sau đó chuyển tế bào trứng/phôi sang giếng 2 và rửa tế bào trứng/phôi trong dung dịch Glycerol. Sau khi tế bào trứng/phôi được rửa trong Glycerol, chuyển sang lam kính, mỗi tế bào trứng/phôi một giọt và xếp hàng dọc theo chiều dọc lam kính. Đậy lamên lên lam kính, soi kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang.

2.2.8. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excell (2010), sự sai khác có ý nghĩa được kiểm tra bằng hàm ANOVA, với α=0,05.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của tế bào cumulus đến hiệu quả thụ tinh *in vitro* tế bào trứng bò

Để đánh giá vai trò của tế bào cumulus trong quá trình thụ tinh *in vitro* tế bào trứng bò, trong nghiên cứu này, chúng tôi chia tế bào trứng bò sau nuôi thành thực *in vitro* vào hai nhóm: (1) loại bỏ một phần tế bào cumulus trước khi thụ tinh và (2) không loại bỏ tế bào cumulus trước khi thụ tinh. Tại thời điểm 10 giờ sau thụ tinh các tế bào trứng sẽ được nhuộm nhân để kiểm tra và đánh giá khả năng thụ tinh dựa trên tỷ lệ tế bào trứng có tinh trùng xâm nhập vào bên trong sau thụ tinh (Hình 1, 2, 3).

Bảng 1. Ảnh hưởng của tế bào cumulus đến hiệu quả thụ tinh *in vitro* tế bào trứng bò (Mean±SE, %)

Dạng tế bào trứng	Số tế bào trứng thụ tinh	Tế bào trứng được thụ tinh có ≥2 nhân 10 giờ sau thụ tinh	Tế bào trứng có 2 nhân 10 giờ sau thụ tinh	Tế bào trứng có >2 nhân 10 giờ sau thụ tinh
Có cumulus	97	78 80,91 ^a ±1,14	76 80,01 ^a ±1,14	2 2,24 ^a ±1,08
Không có cumulus	88	80 91,12 ^b ±1,09	71 81,21 ^a ±1,18	9 10,92 ^b ±1,32

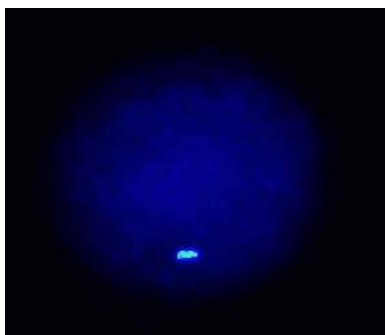
Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa (P<0,05)

Kết quả ở bảng 1 cho thấy tỷ lệ tế bào trứng được thụ tinh (tế bào trứng ≥2 nhân sau thụ tinh, hình 2, 3) ở nhóm có cumulus thấp hơn so với nhóm không có cumulus (80,91% so với 91,12%, P<0,05). Thêm vào đó, tỷ lệ tế bào trứng có hiện tượng đa tinh trùng (tế bào trứng >2 nhân tại thời điểm 10 giờ sau thụ tinh) của nhóm không có cumulus cao hơn so

với nhóm có cumulus (10,92% so với 2,24%, P<0,05). Tuy nhiên, không có sự khác biệt về tỷ lệ tế bào trứng có 2 nhân tại thời điểm 10 giờ sau thụ tinh giữa hai nhóm (Bảng 1, hình 2). Tỷ lệ đa tinh trùng đối với tế bào trứng bò có cumulus của chúng tôi là thấp hơn so với Hwang và ctv (2016).

Trong quá trình thụ tinh *in vitro*, số lượng tinh trùng được sử dụng nhiều hơn so với quá trình thụ tinh *in vivo* (Van và ctv, 2002). Tế bào cumulus có vai trò bắt giữ và định hướng để tinh trùng xâm nhập và tiếp cận tế bào trứng. Khi sử dụng tế bào trứng không có cumulus, số lượng tinh trùng có thể dễ dàng tiếp cận với

tế bào trứng sẽ nhiều hơn khi sử dụng tế bào trứng có cumulus (Van và ctv, 2002). Do vậy đây cũng có thể là một trong những nguyên nhân dẫn đến tỷ lệ tế bào trứng được thụ tinh của nhóm có cumulus thấp hơn nhóm không có cumulus.



Hình 1. Tế bào trứng không thụ tinh (có 1 nhân tại thời điểm 10 giờ sau thụ tinh)



Hình 2. Tế bào trứng được thụ tinh (có 2 nhân tại thời điểm 10 giờ sau thụ tinh)



Hình 3. Tế bào trứng đa tinh trùng (có >2 nhân tại thời điểm 10 giờ sau thụ tinh)

Tỷ lệ tế bào trứng bị đa tinh trùng sau thụ tinh *in vitro* của nhóm không có cumulus trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn nhóm có cumulus (Bảng 1). Đa tinh trùng là hiện tượng phổ biến trong quá trình thụ tinh *in vitro* tế bào trứng bò và cho đến nay vẫn còn nhiều nguyên nhân chưa được làm rõ. Hiện tượng đa tinh trùng có thể có liên quan đến mức độ hóa rắn của màng zona pellucida (Massimiliano và ctv, 2012). Việc tế bào trứng không có cumulus có thể ảnh hưởng đến mức độ hóa rắn của màng zona pellucida trong quá trình thụ tinh. Khi mức độ hóa rắn của màng zona pellucida trong quá trình thụ tinh không đủ sẽ làm cho tinh trùng dễ xâm nhập vào bên trong tế bào trứng hơn, qua đó làm tăng số lượng tinh trùng xâm nhập vào bên trong một tế bào trứng và dẫn đến hiện tượng tế bào trứng đa tinh trùng sau thụ tinh cao hơn.

3.2. Ảnh hưởng của tế bào cumulus đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*

Ảnh hưởng của tế bào cumulus đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro* trong nghiên cứu này được chúng tôi đánh giá dựa trên tỷ lệ tế bào trứng phân chia ở ngày thứ 2 (Hình 4), tỷ lệ tạo phôi nang (Hình 5) ở ngày thứ 7 sau thụ tinh và chất lượng phôi nang bò *in vitro* được tạo ra từ hai nhóm: (1) loại bỏ một phần tế bào cumulus trước khi thụ tinh và (2) không loại bỏ tế bào cumulus trước khi thụ tinh. Để đánh giá thêm vai trò của tế bào cumulus trong quá trình thụ tinh tế bào trứng bò đối với khả năng phát triển tiếp theo của phôi, chất lượng phôi nang được thu từ các tế bào trứng có hoặc không có cumulus sẽ được kiểm tra tổng số tế bào/phôi nang bằng phương pháp nhuộm Hoechst 33342 (Hình 6).

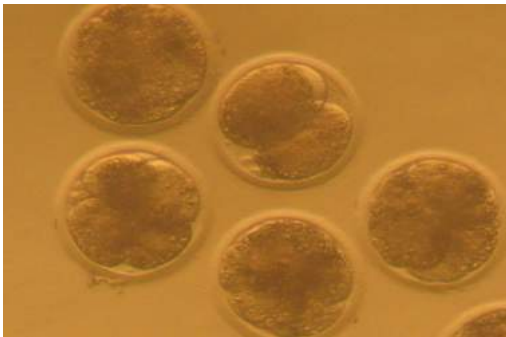
Bảng 2. Ảnh hưởng của tế bào cumulus đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro* (Mean±SE, %)

Dạng tế bào trứng	Số tế bào trứng thụ tinh	Phân chia	Phôi nang	Trung bình tổng số tế bào/phôi nang
Có cumulus	253	201 80,04 ^a ±1,67	89 35,68 ^a ±1,32	105,97 ^a ±2,34
Không có cumulus	192	152 79,98 ^b ±1,45	50 26,75 ^b ±1,28	105,21 ^a ±2,16

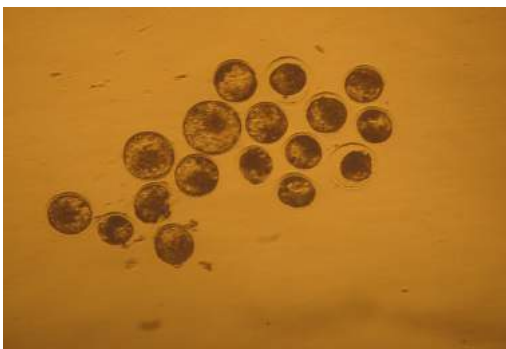
Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ phân chia giữa nhóm

có cumulus và nhóm không có cumulus, tương ứng 80,04 so với 79,98% (P>0,05). Điều

này là khác so với báo cáo của Fatehi và ctv (2005). Theo các tác giả này, tỷ lệ phân chia của tế bào trứng bò không có cumulus là giảm khi được so sánh với tế bào trứng bò có cumulus. Mặc dù không có sự khác biệt về tỷ lệ phân chia nhưng tỷ lệ tạo phôi nang của nhóm có cumulus là cao hơn so với nhóm không có cumulus (35,68% so với 26,75%, $P < 0,05$). Điều này cho thấy mối liên quan giữa tế bào cumulus đến khả năng phát triển tiếp theo của phôi. Mặc dù có nhiều dữ liệu sinh lý về ảnh hưởng của tế bào cumulus đến sự thành thực của tế bào trứng, nhưng cơ chế hỗ trợ của tế bào cumulus đối với quá trình thụ tinh và phát triển tiếp theo của phôi vẫn chưa rõ ràng (Tanghe và ctv, 2002). Sự không có mặt của tế bào cumulus trong quá trình thụ tinh cho phép nhiều tinh trùng bất thường xâm nhập vào bên trong tế bào trứng. Mặc dù quá trình phân chia vẫn tiếp tục xảy ra, tuy nhiên để phát triển đến giai đoạn phôi nang thì các tinh trùng này không đảm bảo chất lượng (Fatehi và ctv, 2005).

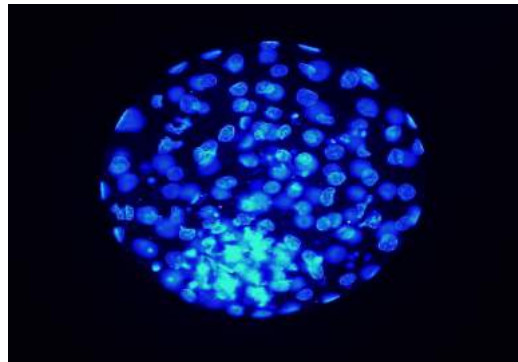


Hình 4. Phôi phân 2-8 tế bào ngày thứ 2 sau TT



Hình 5. Phôi nang *in vitro* ngày thứ 7 sau TT

Một vai trò nữa của tế bào cumulus trong quá trình thụ tinh là bảo vệ tế bào trứng chống lại những stress oxy hóa, đặc biệt là sự tăng nồng độ ROS trong quá trình thụ tinh *in vitro* (Tanghe và ctv, 2003). Trong quá trình thụ tinh *in vitro*, việc đồng nuôi cấy tế bào trứng bò với một số lượng lớn tinh trùng có thể làm tăng nồng độ ROS và dẫn đến những tổn thương cho tế bào trứng hoặc hợp tử ở giai đoạn tiền nhân, qua đó ảnh hưởng đến khả năng phát triển tiếp theo của tế bào trứng bò sau thụ tinh *in vitro* (Tanghe và ctv, 2003). Fatehi và ctv (2005) đã kiểm tra khả năng chống lại stress oxy hóa của các tế bào trứng bò có hoặc không có cumulus trong quá trình thụ tinh. Các tác giả này nhận thấy rằng tế bào cumulus có tác dụng kích thích lên cystein và cysteamine để tổng hợp glutathione (GSH) trong tế bào trứng bò có cumulus. GSH là hợp chất sulhydryl không chứa protein có trong tế bào động vật có vú và có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ tế bào chống lại stress oxy hóa. Việc loại bỏ tế bào cumulus trước khi thụ tinh có thể làm cho tế bào trứng trở nên nhạy cảm với stress oxy hóa, ảnh hưởng bất lợi đến khả năng phát triển tiếp theo của phôi.



Hình 6. Phôi nang bò *in vitro* nhuộm Hoechst 33342 để kiểm tra tổng số tế bào/phôi nang

Trong nghiên cứu của chúng tôi, mặc dù tỷ lệ tạo phôi nang của nhóm có cumulus cao hơn nhóm không có cumulus, tuy nhiên không có sự khác biệt về chất lượng phôi nang bò *in vitro* được tạo ra từ hai nhóm này (Bảng 2). Trung bình tổng số tế bào/phôi nang của chúng tôi thấp hơn so với Fatehi và ctv (2005).

Sự khác nhau giữa các kết quả nghiên cứu có thể là do chất lượng tế bào trứng, chất lượng tinh trùng, môi trường nuôi phôi *in vitro*.

4. KẾT LUẬN

Việc loại bỏ tế bào cumulus từ tế bào trứng bò thành thực *in vitro* trước khi thụ tinh *in vitro* làm tăng tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ đa tinh trùng, không làm giảm tỷ lệ phân chia và chất lượng phôi nang bò *in vitro* được tạo ra, nhưng làm giảm tỷ lệ tạo phôi nang bò *in vitro*. Sử dụng tế bào trứng thành thực có tế bào cumulus trong quá trình thụ tinh nâng cao hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện thông qua đề tài: “Nghiên cứu ảnh hưởng của tế bào cumulus và môi trường nuôi phôi đến kết quả tạo phôi bò *in vitro*” từ nguồn kinh phí hỗ trợ hoạt động thường xuyên Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào động vật. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fatehi A.N., Zeinstra E.C., Kooij R.V., Colenbrander B and Bevers M.M. (2002). Effect of cumulus cell removal of *in vitro* matured bovine oocytes prior to *in vitro* fertilization on subsequent cleavage rate. *Theriogenol.*, 57: 1347-55.
2. Fatehi A.N., Bernard A.J.R., Ben C., Eric J.S., Bart M.G., Mart M.B. and Rob van den H. (2005). Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote*, 13(May): 177-85.
3. Galli C. and Lazzari G. (2008). The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Rep. Dom. Anim.*, 43: 1-7.
4. Hwang I.S., Kwon D.J., Im G.S., Tashima K., Hochi S. and Hwang S. (2016). High incidence of polyspermic fertilization in bovine oocytes matured *in vitro* after Cryotop vitrification. *CryoLetters*, 37(1): 27-33.
5. Kikuchi K., Nagai T., Motlik J., Shioya Y. and Izaike I. (1993). Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenol.*, 39: 593-99.
6. Massimiliano P., Roberto B., Giuseppe F., Maria C.F., Luciano L., Giuseppe M., Maurizio M., Carmine P., Tiziana P., Michela R., Lakamy S., Fulvio U. and Marco D.S. (2012). Whole depth change in bovine zona pellucida biomechanics after fertilization: How relevant in hindering polyspermy? *PLOS ONE*, 7(9): 1-7.
7. Nandi S., Chauhan M.S and Palta P. (1998). Influence of cumulus cells and sperm concentration on cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenol.*, 50: 1251-62.
8. Siard M.A., Richard F., Blondin P. and Robert C. (2006). Contribution of the oocytes to embryo quality. *Theriogenol.*, 65: 126-36.
9. Tanghe S., Van Soom A., Nauwynck H., Coryn M. and de Kruif A. (2002). Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocytes maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Rep. Dev.*, 61: 414-24.
10. Tanghe S., Van Soom A., Mehrad J., Maes D., Duchateau L and de Kruif A. (2003). Cumulus contributions during bovine fertilization *in vitro*. *Theriogenol.*, 60: 135-49.
11. Van S.A., Tanghe S., De Pauw I., Maes D. and de Kruif A. (2002). Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Rep. Dom. Anim.*, 37: 144-51.
12. Zeron Y.A., Ocheretny O., Keda A., Borochoy D. and Skla A.A. (2001). Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Rep.*, 121: 447-54.

KHẢ NĂNG SẢN XUẤT CỦA LỢN ĐỰC GIỐNG YORKSHIRE NUÔI TẠI CÔNG TY CỔ PHẦN GIỐNG CHĂN NUÔI BẮC GIANG

Trần Đức Hoàn^{2*}, Nguyễn Đình Nguyên¹ và Nguyễn Việt Đức¹

Ngày nhận bài báo: 10/07/2021- Ngày nhận bài phản biện: 10/08/2021

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 20/08/2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá khả năng sản xuất lợn đực giống Yorkshire (Y) nuôi tại Công ty Cổ phần Giống chăn nuôi Bắc Giang. Tổng số 35 lợn đực giống Y được khai thác

¹Trường Đại học Nông Lâm Bắc Giang

* Tác giả liên hệ: TS. Trần Đức Hoàn, Khoa Chăn nuôi - Thú y, Trường Đại học Nông Lâm Bắc Giang; ĐT: 0965 679 819; Email: dr.hoan288@gmail.com