

THỜI GIAN THỤ TINH CHO TRỨNG CHÓ ĐƯỢC NUÔI THÀNH THỰC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY 2 BƯỚC

Ngô Thị Mai Hương¹, Trần Thanh Tiếng¹, Phan Kim Ngọc², Nguyễn Thanh Bình³, Trần Thị Dân³

TÓM TẮT

Những lợi ích và tiềm năng của nghiên cứu công nghệ hỗ trợ sinh sản ở chó liên quan đến việc bảo vệ và bảo tồn các loài có nguy cơ tuyệt chủng. Các nghiên cứu trên các giống địa phương có thể cung cấp dữ liệu cần thiết để áp dụng trên các loài hoang dã. Mục đích của nghiên cứu này là tìm hiểu thời gian nào phù hợp nhất cho thụ tinh trứng chó được nuôi thành thực trong ống nghiệm bằng phương pháp nuôi cấy 2 bước. Cumulus tế bào noãn bào phức hợp (COC) đã thu được từ buồng trứng. Sau 48h, 60h, 72h IVM, COC đã được thụ tinh với tinh trùng chó trong 8 giờ. Tỷ lệ thụ tinh được đánh giá qua tỷ lệ hình thành tiền nhân (pronucleus) và phôi giai đoạn 2 tế bào. Kết quả chỉ ra rằng tỷ lệ thụ tinh vào lúc 60h và 72h sau khi IVM cao hơn so với 48 giờ. Bảy phôi chó đã thu được trong nghiên cứu này.

Từ khóa: Chó, Trứng, Thời gian thích hợp, Thụ tinh trong ống nghiệm, Nuôi cấy thành thực

OPTIMAL TIME FOR THE IN-VITRO FERTILIZATION (IVF) OF DOG OOCYTE CULTURED BY THE TWO-STEP METHOD OF IN-VITRO MATURATION (IVM)

Ngo Thi Mai Huong, Tran Thanh Tieng, Phan Kim Ngoc, Nguyen Thanh Binh, Tran Thi Dan

SUMMARY

The potential benefits of assisted reproduction technology research in canine are linked to the protection and saving of endangered species. The research on domestic species can provide the necessary basic data to for research on wild species. The purpose of this study was to identify the optimal time for the in-vitro fertilization (IVF) of dog oocyte cultured by the in-vitro maturation (IVM). The cumulus cell-oocyte complexes (COCs) were obtained from dog ovary anestrus stage. After 48h, 60h, and 72h IVM, the COCs were inseminated with dog sperm for 8 hours. The fertility rate was evaluated according to the formation of pronucleus rate and embryo 2 cells stage rate. The results indicated that the fertility rate at 60h and 72h after IVM were higher than that at 48h. Seven dog embryos were obtained in this study.

Key words: Dogs, Oocyte, In-vitro fertilization, Optimal time, Maturation methods

I ĐẶT VẤN ĐỀ

Những nghiên cứu đầu tiên về nuôi thành thực (IVM) và thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) trên trứng chó đã được báo cáo bởi Mahi và Yanagimachi (1976). Tuy nhiên, hiệu quả thu được không cao (Farstard và ctv, 2000; Cui và ctv, 2006).

Đặc điểm sinh sản ở chó rất khác biệt so với các loài có vú khác. Ở hầu hết các động vật có vú, sự thành thực của trứng diễn ra tại nang trứng. Khi trứng được giải phóng khỏi nang nó đã đạt tới kỳ giữa của giảm phân lần II và thực sự sẵn sàng cho thụ tinh. Trái lại, ở chó, trứng rụng khi vẫn đang ở giai đoạn túi mầm. Thở cực đầu tiên được bài xuất khoảng 48-72 giờ sau khi rụng, khi trứng đã ở khoảng giữa của ống dẫn trứng (Tsutsui và Shimazu, 1975; Tsutsui, 1989).

Sự thụ tinh ở chó cũng rất đặc biệt. Chó cái chấp nhận giao phối ở thời điểm

1: Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM

2: Trường ĐH Khoa học Tự nhiên Tp. HCM

3: Trường ĐH Nông lâm Tp. HCM

đỉnh LH, khoảng 36-50 giờ trước khi rụng trứng. Lúc này, trứng vẫn chưa thành thực thậm chí là chưa cả hiện diện trong ống dẫn trứng (Doak và ctv, 1967; Concanon, 1991; Saint Dizier và ctv, 2001). Như vậy, tinh trùng đã tập trung xung quanh tổ hợp trứng chó – tế bào ở trước khi trứng thành thực. Hiện tượng này diễn tiến như thế nào và có ảnh hưởng ra sao tới sự phát triển tiếp của trứng cũng như sự thụ tinh vẫn chưa được làm rõ (Songsasen và Wild, 2007).

Cho đến nay, vẫn chưa có sự thống nhất quan điểm về thời gian nuôi thành thực trứng cũng như thời gian thụ tinh tối ưu cho trứng chó (Rodrigues và Rodrigues, 2006; Songsasen và Wild, 2007). Mục đích của nghiên cứu này là tìm hiểu thời gian nào phù hợp nhất cho thụ tinh trứng chó được nuôi thành thực trong ống nghiệm bằng phương pháp nuôi cấy 2 bước.

Hiện nay, các nghiên cứu *trong ống nghiệm* về sinh sản của chó ở Việt Nam còn hạn chế cả về số lượng nghiên cứu và kết quả đạt được. Hiện chỉ có nhóm của tác giả Quách Tuyết Anh, Trần Thị Dân trường Đại học Nông lâm Tp. HCM đã báo cáo kết quả nuôi thành thực trứng chó trong ống nghiệm đạt 0,75%.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Địa điểm và thời gian

Đề tài được tiến hành tại Phòng thí nghiệm Nghiên cứu và ứng dụng tế bào gốc, Trường Đại học khoa học tự nhiên, Tp HCM từ tháng 01/2010 đến tháng 12/2010.

Phương pháp

Buồng trứng được thu nhận từ những con chó đang ở độ tuổi sinh sản (1,5-4,5 tuổi) và đã từng qua sinh sản.

Buồng trứng được thu nhận tại lò mổ và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong nước muối sinh lý ấm (35-37°C) bổ sung kháng sinh. Những buồng trứng được lựa chọn cho thí nghiệm là những buồng trứng có nang nổi từ 0,5-2 mm. Những buồng trứng không có nang nổi hoặc nang nổi to (>4 mm) hoặc có thể vàng đều không được lựa chọn cho thí nghiệm.

Trứng được thu nhận bằng phương pháp rạch buồng trứng. Các trứng có tế bào chất đen đều, có đường kính $\geq 100 \mu\text{m}$ và có nhiều hơn 2 lớp tế bào ở bám đều xung quanh được thu nhận để nuôi thành thực.

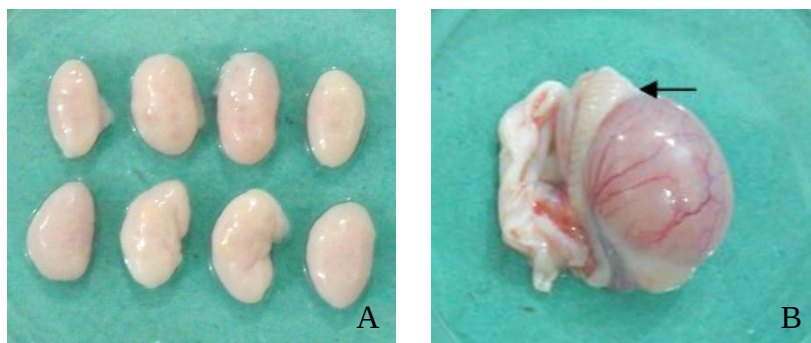
Các trứng được nuôi theo quy trình nuôi cấy 2 bước (Sonya Wesselowski, 2004; Mai Hương và ctv, 2011). Sau 48h, 60h và 72h nuôi thành thực, trứng chó được thụ tinh với tinh trùng.

Tinh trùng được thu nhận từ phó tinh hoàn của chó. Tinh hoàn chó được thu nhận từ lò mổ. Phó tinh hoàn được tách ra khỏi tinh hoàn và được cắt nhỏ trong dung dịch PBS, rung lắc (vortex) nhẹ trong 1 phút. Dịch thu nhận sau khi rung lắc được tiến hành phương pháp bơi lên (swim-up) với dung dịch BO ấm (38°C). Những tinh trùng khỏe, có khả năng vận động bình thường được thu nhận nhờ phương pháp này. Tinh trùng được điều chỉnh tới mật độ 10^7 tinh trùng/ml. Một thể tích 10 μl dung dịch này được thêm vào 90 μl vi giọt thụ tinh có sẵn trứng để tiến hành thụ tinh.

Trứng và tinh trùng được đồng nuôi cấy trong tủ ủ CO₂ ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, bão hòa hơi nước. Sau 8-10 giờ nuôi ủ, trứng được chuyển sang môi trường nuôi phôi (TCM 199 + 25 μM β -mercaptoethanol + 10 ng/ml EGF + 0,25 mM pyruvate + 2,0 mM glutamine + 0,1% polyvinyl alcohol + 0,03 mg/ml gentamycin).

Sự thụ tinh của trứng chó được tính bằng sự hiện diện của phôi 2 tế bào hoặc 4 tế bào và trứng với 2 tiền nhân.

Sau 30 giờ thụ tinh, ngoại trừ các phôi thu nhận được, toàn bộ các trứng còn lại được nhuộm với thuốc nhuộm propidium iodide (PI) 200 µg/ml theo quy trình của Reyes, (2006). Xem hình 1



Hình 1: (A) buồng trứng chó; (B) Tinh hoàn chó;
→ phó tinh hoàn.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảng 1: Kết quả thụ tinh

Giờ nuôi trứng	Số trứng được thụ tinh	Số trứng có 2 tiền nhân (%)	Số phôi (%)	Số trứng thụ tinh* (%)
48	138	21 (15,22)	2 (1,45)	23 (16,67)
60	129	26 (20,16)	3 (2,33)	29 (22,48)
72	105	21 (20,00)	3 (2,86)	24 (22,86)

*: số trứng thụ tinh gồm tổng số phôi và số trứng có 2 tiền nhân

Sau 9 lần thí nghiệm lặp lại, kết quả tạo thành phôi như sau: Ở lô thụ tinh sau 48 giờ nuôi, có 2 lần thí nghiệm lặp lại thu nhận được phôi. Mỗi lần lặp lại thu nhận được 1 phôi giai đoạn 2 tế bào. Trung bình tỉ lệ trứng đạt giai đoạn tiền nhân thu được là 15,22% và tỉ lệ trứng thụ tinh là 16,67%.

Ở lô thụ tinh sau 60 giờ nuôi, thu nhận được tổng số 3 phôi từ 2 lần thí nghiệm lặp lại. Trong đó có 2 phôi giai đoạn 4 tế bào và 1 phôi giai đoạn 2 tế bào. Tỉ lệ trứng đạt giai đoạn tiền nhân là 20,16%; tỉ lệ thụ tinh là 22,48%.

Ở lô thụ tinh sau 72 giờ nuôi, thu nhận được 2 phôi giai đoạn 2 tế bào và 1 phôi giai đoạn 4 tế bào từ 3 đợt thí nghiệm. Tỉ lệ trứng đạt giai đoạn tiền nhân là 20%; tỉ lệ trứng thụ tinh là 22,86%.

Các kết quả trên cho thấy trứng thụ tinh sau 60 giờ và 72 giờ nuôi thành thực cho hiệu quả thụ tinh cao hơn ở cả 2 phương diện trứng đạt giai đoạn tiền nhân và tạo phôi. Do đó, kết quả thụ tinh cũng cao hơn.

Ở Việt Nam, chưa có công bố nào về việc thụ tinh thành công cho trứng chó nuôi thành thực trong ống nghiệm cũng như thu nhận được phôi từ những trứng này.

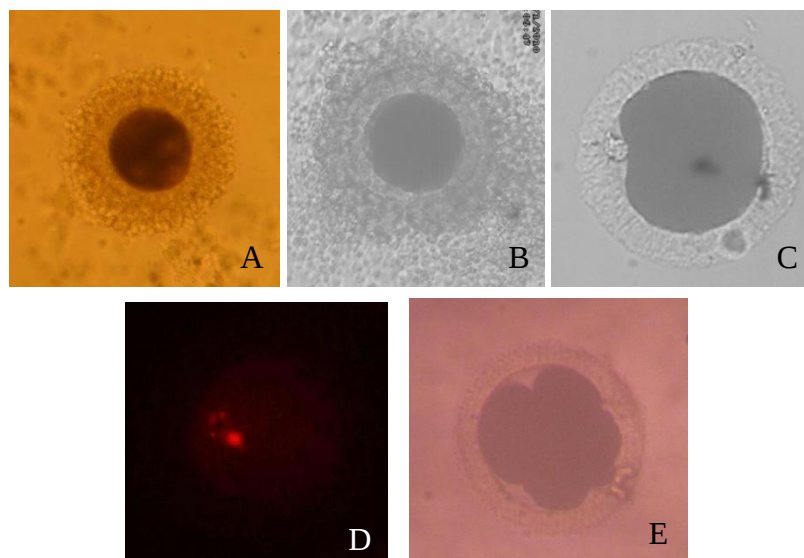
Trên thế giới, do những kết quả hạn chế trong nuôi thành thực trứng chó trong ống nghiệm nên kết quả thụ tinh, và nuôi phôi chó cũng rất hạn chế. Mahi và Yanagimachi (1976) là nhóm đầu tiên báo cáo về thử nghiệm thụ tinh ống nghiệm ở loài này và thu được khoảng 20-30% trứng thụ tinh được đánh giá thông qua sự hiện diện của tiền nhân đực trong các noãn bào. Songsasen và ctv (2002) đã thụ tinh trong ống nghiệm đối với trứng nuôi cấy trong ống nghiệm và thấy rằng 34% trứng có sự xâm nhập của tinh trùng (sự thụ tinh được đánh giá bởi sự hiện diện

của hai nhân nguyên và một đuôi tinh trùng duy nhất trong tế bào chất trứng). Thông thường, sự thụ tinh được ghi nhận chỉ khoảng 4% tổng số trứng. Trong nghiên cứu khác cũng của Songsasen và ctv, tác giả thu được 7 phôi giai đoạn 2-12 tế bào sau khi thụ tinh 85 trứng (8,23%) (Songsasen và ctv, 2007). Một nghiên cứu gần đây của Rodrigues và ctv (2004) đạt được tỉ lệ thụ tinh 30%, một nửa trong số đó là thụ tinh đa tinh trùng. Các tác giả này cũng cho biết tỷ lệ thụ tinh của trứng thu nhận từ chó giai đoạn động dục là 42,5%, giai đoạn không động dục là 34,3% và giai đoạn hoàng thể hóa là 18,6%. Tổng số các phôi phát triển sau giai đoạn 8 tế bào trong các nghiên cứu khoảng 10%. Trong nghiên cứu khác của Saikhun và ctv (2008), tỉ lệ phôi 2 tế bào thu được khi nuôi phôi trong môi trường SOF là 33,6%. Cho tới nay, chỉ có Otoi và ctv (2001) đã nuôi thành công 1 phôi chó tới giai đoạn phôi nang từ 217 trứng nuôi thành thực trong ống nghiệm (0,46%).

Nghiên cứu đã thu nhận được phôi từ việc thụ tinh trứng nuôi thành thực bằng phương pháp nuôi cấy 2 bước cả ở thời điểm 48 giờ, 60 giờ và 72 giờ sau nuôi và không có sự khác biệt giữa các thời điểm này nên nghiên cứu vẫn chưa chỉ ra được thời điểm nào là tối ưu cho tạo phôi chó. Tuy nhiên, kết quả thụ tinh (gồm cả phôi và trứng có 2 tiền nhân) lại cho thấy sự cao hơn ở lô nuôi thành thực sau 60 giờ và 72 giờ so với lô 48 giờ.

Cùng sử dụng nguồn trứng thu nhận từ buồng trứng cho giai đoạn không động dục và được nuôi thành thực trong ống nghiệm, kết quả nghiên cứu của nhóm cho thấy tỉ lệ thụ tinh cao hơn Hatoya và ctv (2006) đạt tỉ lệ hình thành tiền nhân là 8%; nhưng thấp hơn một số tác giả: Saikhun và ctv (2008) đạt tỉ lệ tạo thành phôi 2 tế bào là 33,6%, tỉ lệ tạo thành phôi 8-16 tế bào là 4,1%; Cui và ctv (2006) đạt tỉ lệ hình thành tiền nhân được ở lô trứng nuôi thành thực 48 giờ là 32%; ở lô trứng nuôi 72 giờ là 28%. Điều này cho thấy, việc thụ tinh cho trứng chó nuôi thành thực bằng phương pháp nuôi cấy 2 bước ở các khoảng thời gian khác nhau đã cho những thành công nhất định song không phải là quy trình thành công nhất, hiệu quả nhất cho tạo phôi chó.

Thí nghiệm đã thu được kết quả thụ tinh đạt 22,86% và tạo được phôi chó song không có phôi nào vượt qua giai đoạn 4 tế bào. Do đó, cần có thêm những nghiên cứu để tăng tỷ lệ thụ tinh cũng như môi trường nào phù hợp cho nuôi phôi chó trong ống nghiệm.



Hình 2: (A) trứng trước khi nuôi cấy; (B) trứng sau khi nuôi cấy; (C) trứng thành thực với thể cực ; (D) trứng với 2 tiền nhân; (E) phôi giai đoạn 4 tế bào

IV. KẾT LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam công bố thành công trong việc tạo phôi chó trong ống nghiệm.

Tỷ lệ trứng chó thụ tinh đạt cao hơn ở thời điểm 60 giờ và 72 giờ sau nuôi thành thực so với thời điểm 48 giờ.

LỜI CẢM ƠN

Xin cảm ơn Sở khoa học và công nghệ Tp . Hồ Chí Minh , Chương trình Vườn ươm khoa học đã cấp kinh phí thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1.Ngô Thị Mai Hương , Trần Thanh Tiêng , Nguyễn Thanh Bình , Trần Thị Dân , Phan Kim Ngọc. (2011), Nuôi trưởng thành trứng chó nhà (*Canis domesticus*) bằng phương pháp nuôi cấy 2 bước. *Tạp chí khoa học kỹ thuật chăn nuôi*, 148, 34-39.
- 2.Doak R.L, Hall, and Dale E. (1967), Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *J Reprod Fertil* 13, 51–58.
- 3.Farstad W. (2000), Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim Reprod Sci* 60(1), 375–387.
- 4.Hatoya S, Sugiyama Y, Torii R, Wijewardana V, Kumagai D, Sugiura K, Kida K, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Inaba T. (2006), Effect of co-culturing with embryonic fibroblasts on IVM, IVF and IVC of canine oocytes. *Theriogenology* 66, 1083–1090.
- 5.Mahi C.A, Yanacgimachi, (1976), Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. *J Exp Zool* 16, 189–193.
- 6.Quach Tuyet Anh, Tran Thi Dan, Nguyen Van Ut and Nguyen Van Thuan (2006), Some factors affecting oocyte maturation and sperm capacitation in canine, Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture. Nong Lam University, HCMC, 45-47.
- 7.Rodrigues B.A, Santos LC, Rodrigues JL. (2004), Embryonic development of in vitro matured and invitro fertilized dog oocytes. *Molecular Mol. Reprod. Dev.* 67, 215–223.
- 8.Rodrigues, Rodrigues J.L. (2006), Responses of canine oocytes to in vitro maturation and in vitro fertilization outcome, *Theriogenology* 66, 1667–1672.
- 9.Saint-Dizier M, Renard J.P, and Chastant-Maillard S. (2001) Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction* 121, 97–105.
- 10.Songsasen N, Wildt D.E. (2007), Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science* 98, 2–22.