Thiết lập qui trình trữ lạnh mô buồng trứng trên mô hình bò

- **Nguyễn Thị Phương Dung**
- **Nguyễn Thị Thu Lan**
- **Hồ Mạnh Tường**
  Đơn vị hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện An Sinh (IVFAS)
- **Nguyễn Minh Tài Lộc**
  Trung tâm nghiên cứu di truyền và sức khỏe sinh sản (CGRH), Khoa Y, ĐHQG-HCM
- **Nguyễn Nhật Quang**
- **Huỳnh Chí Thiện**
  Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 07 tháng 09 năm 2015, nhận đăng ngày 06 tháng 05 năm 2016)

TÓM TẮT

Trữ lạnh mô buồng trứng là một giải pháp phù hợp nhằm bảo tồn khả năng sinh sản ở phụ nữ trước khi điều trị bệnh lý có nguy cơ ảnh hưởng đến chức năng buồng trứng và khả năng sinh sản về sau. Toàn bộ hoặc một phần buồng trứng có thể được bảo quản lạnh để sử dụng trong tương lai. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm thiết lập qui trình trữ lạnh mô buồng trứng trên mô hình bò để ứng dụng trên người. Phương pháp tiến hành bao gồm thu nhận buồng trứng bò từ lò mổ và bảo quản ở 4 °C tối đa 12 giờ trước khi tiến hành thí nghiệm. Phần vỏ mô buồng trứng được xử lý để thu nhận các mảnh mô với kích thước 10x10x1 mm. Các mảnh vỏ mô buồng trứng được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm: (1) mẫu mô trước đông lạnh (đối chứng), (2) mẫu mô được đông lạnh bằng phương pháp đông lạnh chậm và (3) mẫu mô được đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa. Sau đó, các mảnh mô buồng trứng được xử lý với men Collagenase Ia để phân lập nang noãn và nhuộm với Neutral Red. Tỉ lệ nang noãn sống sót sau đông lạnh và rã đông mô buồng trứng được sử dụng làm chỉ tiêu đánh giá hiệu quả của qui trình đông lạnh. Kết quả về tỉ lệ nang noãn sống sót ở nhóm đông lạnh chậm và thủy tinh hóa so với nhóm chứng lần lượt là 72,46 ± 6,11 % và 59,09 ± 7,08 %. Đây là nghiên cứu đầu tiên thiết lập thành công qui trình đông lạnh mô buồng trứng trên mô hình bò tại Việt Nam. Tuy nhiên, các qui trình thiết lập này cần được cải tiến để ứng dụng điều trị trên người trong tương lai.

Từ khóa: *nang noãn, trữ mô buồng trứng, đông lạnh chậm, thủy tinh hóa*

MỞ ĐẦU

Bảo tồn khả năng sinh sản là mục tiêu quan trọng trong ứng dụng công nghệ hỗ trợ sinh sản (HTSS) trên động vật và đặc biệt là trên người. Với mục tiêu này, các phương pháp trữ lạnh khác nhau được thực hiện trên nhiều đối tượng như giao tử (tinh trùng/noãn), phôi và mô (tinh hoàn/buồng trứng). Trong những năm gần đây, trữ lạnh mô buồng trứng (MBT) người đang được rất nhiều quốc gia trên thế giới quan tâm nhằm bảo tồn khả năng sinh sản ở những bé gái trước tuổi dậy thì hoặc phụ nữ trong độ tuổi sinh sản mắc các bệnh lý có nguy cơ ảnh hưởng đến chức năng buồng trứng.

Kỹ thuật trữ lạnh MBT cùng với cấy ghép mô sau trữ lạnh - rã đông nhằm phục hồi khả năng sinh sản đã được báo cáo trên chuột cách đây hơn 50 năm. Trải qua hơn 30 năm sau đó, kỹ thuật này tiếp tục được thử nghiệm trên nhiều mô hình động vật. Trong đó, thử nghiệm thành công cấy ghép MBT sau trữ lạnh bằng phương pháp hạ nhiệt độ chậm giúp hồi phục chức năng buồng trứng và khả năng mang thai, sinh con trên cừu. Sau đó, trường hợp sinh con đầu tiên sau khi cấy ghép MBT trữ lạnh cũng được báo cáo trên tinh tinh vào năm 2004 [1]. Đến năm 1996, trữ lạnh MBT đầu tiên được thực hiện thành công trên người. Ca đầu tiên cấy ghép thành công MBT trữ lạnh trên người được báo vào năm 2000. Từ năm 2004, một số trung tâm trên thế giới đã lần lượt công bố những trường hợp em bé được sinh ra sau khi người mẹ hồi phục sau điều trị ung thư và cấy ghép thành công MBT đã qua trữ lạnh – rã đông. Cho đến nay, có ít nhất 24 trường hợp sinh con sau cấy ghép MBT trữ lạnh ở người trên thế giới [2, 3].

Tại Việt Nam, một khảo sát tại Bệnh viện Ung bướu Thành phố Hồ Chí Minh cho thấy tỉ lệ phụ nữ mắc bệnh lý ác tính về buồng trứng ngày càng gia tăng, riêng năm 2013 có 22.000 bệnh nhân được chẩn đoán ung thư buồng trứng và 1/8 trong số bệnh nhân này ở độ tuổi dưới 45. Đồng thời, tỉ lệ phụ nữ trong độ tuổi sinh sản mắc các bệnh lý lành tính ở buồng trứng cũng ngày càng tăng. Trên thực tế, quá trình điều trị các bệnh liên quan đến buồng trứng có thể dẫn đến chỉ định cắt bán phần hoặc toàn bộ buồng trứng. Đồng thời, quá trình xạ trị, hóa trị ở phụ nữ mắc các bệnh ung thư khác cũng gây ảnh hưởng đến chức năng buồng trứng về sau nếu buồng trứng vẫn được bảo tồn trong cơ thể [4]. Như vậy, bảo quản lạnh MBT là giải pháp duy nhất "trả lại" cơ hội làm mẹ cho những đối tượng bệnh nhân trong tương lai, giúp nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân sau điều trị. Bên cạnh đó, kỹ thuật HTSS tại Việt Nam, đặc biệt là kỹ thuật bảo quản lạnh, đã được thực hiện từ năm 1998 và hiệu quả ứng dụng có thể ngang tầm với nhiều nước trên thế giới. Tuy nhiên, kỹ thuật trữ lạnh MBT người hiện vẫn chưa được triển khai tại các trung tâm HTSS trong nước. Trước nhu cầu đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm thiết lập qui trình trữ lạnh MBT trên mô hình bò nhằm tiến đến ứng dụng trên người. Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên về lĩnh vực này tại Việt Nam, gắn kết việc nghiên cứu cơ bản với ứng dụng trong điều trị lâm sàng tại bệnh viện có chương trình HTSS.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thu nhận và xử lý buồng trứng bò

Buồng trứng bò được thu nhận tại lò mổ thuộc công ty Việt Nam Kỹ nghệ Súc sản (VISSAN). Tại thời điểm thu nhận, buồng trứng được rửa bằng dung dịch muối sinh lý, bổ sung kháng sinh penicillin (100 IU/mL) và bảo quản trong môi trường Flushing (Medicult, Origio) ở 4 ^{o}C tối đa 12 giờ trước khi tiến hành thí nghiệm. Tại phòng thí nghiệm của CGRH, dao mổ y tế và dụng cụ cố định mẫu mô buồng trứng (Kitazato, Nhật) được sử dụng để cắt phần vỏ MBT thành từng mảnh mô có kích thước 10x10x1 mm. Các mảnh mô được giữ trong môi trường TCM-199 (Sigma) ở nhiệt độ phòng và tiến hành phân lập nang noãn (mẫu đối chứng) hoặc trữ lạnh ngay sau đó.

Trữ lạnh và rã đông mô buồng trứng

Phương pháp hạ nhiệt độ chậm theo chương trình tự động (slow-freezing)

Đông lạnh: MBT bò được chuyển vào từng cryotube 1,8 mL (Nunc, Mỹ) có chứa 1 mL môi trường đông lạnh ES (EG 1,5 M; sucrose 0,1 M), đặt ở 4 ^{o}C trong 60 phút, lắc nhẹ. Sau đó, các cryotube chứa MBT được đặt vào máy hạ nhiệt độ tự động CL-8800 (CryoLogic, Úc) và thực hiện chương trình hạ nhiệt độ chậm: từ 24 ^{o}C đến -6,5 ^{o}C (tốc độ 2 ^{o}C/phút) → tạo mầm tinh thể đá (seeding) → giữ 10 phút → từ -6,5 ^{o}C đến -35 ^{o}C

(tốc độ -0,3 ^oC/phút) → từ -35 ^oC đến -122 ^oC (tốc độ -8 ^oC/phút) → giữ 10 phút →-196 ^oC (nhúng trực tiếp vào nitrogen lỏng). Kết thúc quá trình trên, cryotube chứa MBT được lưu giữ ở bình nitrogen lỏng (-196 ^oC) trong 1 tuần cho đến khi rã đông.

Rã đông: Cryotube chứa MBT bò trữ lạnh được lấy khỏi nitrogen lỏng và nhúng trực tiếp vào bể nước ấm 37 ^oC trong 2 phút. Sau đó, chuyển mô vào môi trường rã đông TS (EG 0,75 M; sucrose 0,25 M) trong 10 phút. Tiếp theo, rửa các mô trong môi trường rửa 1 (sucrose 0,1 M) và môi trường rửa 2 (TCM-199), 10 phút/bước. Giữ mô ổn định trong môi trường TCM-199 ở 37 ^oC, 5 % CO_2 trong 15 phút trước khi đánh giá tỉ lệ nang noãn sống.

Phương pháp thủy tinh hóa (vitrification)

Đông lạnh: MBT được chuyển vào ống nghiệm (BD Falcon, Mỹ) chứa 10 mL môi trường VS1 (7,5 % EG; 7,5 % DMSO) trong 25 phút. Sau đó, mô được chuyển sang ống nghiệm chứa 10 mL môi trường VS2 (20 % EG; 20 % DMSO, 0,5 M sucrose) trong 15 phút. Đặt mô lên dụng cụ trữ lạnh cryotissue (Kitazato, Nhật) hoặc thanh giấy nhôm tự chế (Việt Nam), nhanh chóng nhúng dụng cụ chứa mô vào nitrogen lỏng (-196 ^oC), đậy nắp bảo vệ và cất mẫu vào bình lưu trữ (-196 ^oC) cho đến khi rã đông.

Rã đông: Lấy dụng cụ chứa mô trữ lạnh ra khỏi nitrogen lỏng và nhúng trực tiếp vào ống nghiệm chứa 10 mL môi trường TS1 (1M sucrose) ở 37 ^oC trong 1 phút, các mảnh mô rơi khỏi dụng cụ trữ vào trong môi trường. Chuyển mô vào môi trường TS2 (0,5 M sucrose) trong 5 phút. Sau đó, rửa mô 2 lần trong môi trường TCM-199, 5 phút/lần. Mô sau rã đông được giữ ổn định trong môi trường TCM-199 ở 37 ^oC, 5 % CO_2 trong 15 phút cho đến khi được đánh giá nang noãn sống.

Phân lập nang noãn và nhuộm nang noãn

Các mảnh MBT trước đông lạnh (đối chứng) hoặc mô sau trữ lạnh – rã đông (thí nghiệm) được chuyển vào môi trường TCM-199 bổ sung men Collagenase Ia (1 mg/mL) trong 30 phút ở 37 ^oC. Dùng pippette Pasteur hút nhả mô nhiều lần, loại bỏ mảnh mô lớn và ly tâm dịch sau xử lý với tốc độ 2.500 vòng/phút/5phút. Loại dịch nổi, rửa huyền phù sau ly tâm và cấy vào môi trường TCM-199 bổ sung thuốc nhuộm Neutral Red (50 µg/l) trong 1 giờ ở 37 ^oC, 5 % CO_2 . Nang noãn sống sẽ bắt màu đỏ của Neutral Red khi quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược (ở độ phóng đại x20).

Xác định tỉ lệ nang noãn sống sót

Tỉ lệ nang noãn sống sau phân lập ở mỗi lô thí nghiệm và lô đối chứng được xác định bằng cách đếm bách phân số nang noãn sống và chết quan sát được sau tiến hành nhuộm với Neutral Red, đếm tối thiểu 200 nang noãn/lần và đếm 2 lần với mỗi lô thí nghiệm. Tỉ lệ nang noãn sống sót sau mỗi lô thí nghiệm được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ nang noãn sống sót} = \frac{\text{tỉ lệ nang noãn sống ở mẫu trữ – rã đông}}{\text{tỉ lệ nang noãn sống ở mẫu đối chứng}} \times 100\ (\%)$$

KẾT QUẢ

Đặc điểm mẫu mô buồng trứng sử dụng trong thí nghiệm

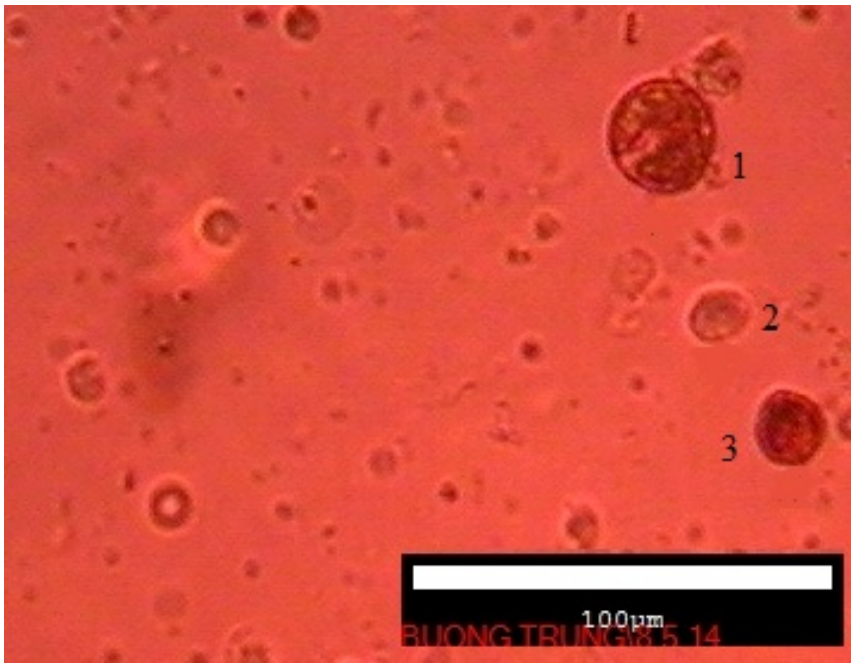
Trong 10 lô thí nghiệm, tổng cộng 37 buồng trứng bò được sử dụng để thu nhận mô vỏ buồng trứng. Đặc điểm buồng trứng ở mỗi lô thí nghiệm được đánh giá thông qua diện tích bề mặt buồng trứng (mô phỏng bằng chương trình Autocard 2007 dựa vào kích thước đo 3 chiều của buồng trứng), số lượng nang noãn phân lập trung bình ở mỗi mẫu mô và tỉ lệ nang noãn phân lập có đường kính ≥ 15 µm (Bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm mô buồng trứng bò ở các lô thí nghiệm

Lô thí nghiệm	Số buồng trứng	Diện tích bề mặt/ buồng trứng (cm^2)	Số nang noãn phân lập/mảnh mô (nang)	Tỉ lệ nang noãn phân lập có đường kính ≥ 15 µm (%)
1	3	12,15	18 982	7,21
2	4	10,17	31 637	11,20
3	6	13,27	31 637	4,60
4	3	18,43	50 619	15,24
5	4	9,43	71 184	19,69
6	4	22,80	71 184	20,50
7	5	21,29	71 184	2,33
8	4	12,54	55 365	10,32
9	2	14,24	15 818	5,43
10	2	10,07	23 728	2,87
Trung bình		14,44 ± 2,68	44 134 ± 13 899	9,94 ± 4,13

Tỉ lệ nang noãn sống sau trữ lạnh - rã đông mô buồng trứng

Tỉ lệ nang noãn sống ở mỗi lô thí nghiệm được xác định để tính tỉ lệ nang noãn sống sót sau trữ lạnh – rã đông MBT. Đây là thông số cuối cùng để đánh giá hiệu quả mỗi qui trình trữ lạnh – rã đông MBT (Bảng 2 và Bảng 3).



Hình 1. Nang noãn sau khi phân lập và nhuộm với Neutral Red (X20)
1: Nang noãn sống có đường kính ≥ 15µm
2: Nang noãn không sống có đường kính < 15µm
3: Nang noãn sống có đường kính ≤ 15µm

Bảng 2. Tỉ lệ nang noãn sống sau phân lập ở các lô thí nghiệm

Lô thí nghiệm	Đối chứng	Đông lạnh chậm	Thủy tinh hóa dùng cryotissue	Thủy tinh hóa dùng giấy nhôm
1	41,51	32,35	27,57	29,43
2	49,75	38,78	28,84	25,09
3	38,17	29,75	18,45	21,55
4	39,25	18,59	18,51	16,16
5	31,75	20,74	17,92	18,5
6	41,21	33,11	26,14	23,26
7	61,83	45,19	40,90	34,95
8	23,83	18,57	15,54	17,45
9	29,33	20,86	16,56	18,55
10	43,67	33,04	27,67	24,53
Trung bình (%)	40,03 ± 6,65	29,10 ± 5,67	23,81 ± 7,92	22,95 ± 5,87

Bảng 3. Tỉ lệ nang noãn sống sót sau trữ lạnh – rã đông MBT ở các phương pháp

Lô thí nghiệm	Đông lạnh chậm	Thủy tinh hóa dùng cryotissue	Thủy tinh hóa dùng giấy nhôm
1	77,93	66,42	70,90
2	77,95	57,97	50,43
3	77,94	48,34	56,46
4	47,36	47,16	41,17
5	65,32	56,44	58,27
6	80,34	63,43	56,44
7	73,09	66,15	56,53
8	77,93	65,21	73,23
9	71,12	56,46	63,25
10	75,66	63,36	56,17
Trung bình (%)	72,46 ± 6,11	59,09 ± 7,08	58,28 ± 9,28

THẢO LUẬN

Buồng trứng bò được chọn làm đối tượng trong nghiên cứu trữ lạnh MBT do sự tương đồng về kích thước buồng trứng, cấu trúc mô học cũng như độ dài của chu kỳ sinh noãn ở bò và ở người [1]. Thực tế, phần vỏ MBT là nơi phân bố chủ yếu của nang noãn, trong đó nang noãn nguyên thủy chiếm khoảng 94,3 % nang noãn ở bò [5]. Số lượng nang noãn nguyên thủy phản ánh dự trữ noãn của buồng trứng và các nang noãn này sẽ trải qua quá trình chiêu mộ, chọn lọc, phát triển để đạt đến nang noãn trưởng thành, phóng noãn ở mỗi chu kỳ. Do đó, phần vỏ MBT thường được

trữ lạnh với mục đích bảo tồn khả năng sinh sản. Trong nghiên cứu này, nguồn mẫu thu nhận tại lò mổ thường là buồng trứng từ bò thịt ở các độ tuổi khác nhau hoặc bò sữa già nên chất lượng không ổn định. Điều này phản ánh thông qua sự dao động về kích thước buồng trứng, số lượng nang noãn phân lập và tỉ lệ nang noãn nguyên thủy đang phát triển (đường kính nang noãn ≥ 15 µm) ở các lô thí nghiệm. Theo nghiên cứu của tác giả Ingrid và Raymond vào năm 1996 thì nang nguyên thủy ở bò có dạng hình cầu dẹt với đường kính hai chiều trung bình là 38,0 ± 5,4 µm và 28,9 ± 4,3 µm [5]. Trong khi đó, nang noãn mà chúng tôi phân lập trong nghiên cứu hiện tại có đường kính dao động trong khoảng 10 µm đến 30 µm, rất ít nang noãn có đường kính ≥ 15 µm (9,94 ± 4,13 %). Sự khác biệt này có thể xuất phát từ giống bò khác nhau trong các nghiên cứu. Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên ghi nhận về đặc điểm nang noãn của giống bò tại Việt Nam, cung cấp thông tin cho những nghiên cứu cơ bản có liên quan về sau.

Hiện nay, bảo quản lạnh bằng phương pháp đông lạnh chậm (slow-freezing) và thủy tinh hóa (vitrification) là hai phương pháp bảo quản lạnh phổ biến nhất trong HTSS trên người. Trong lịch sử phát triển, đông lạnh chậm đã được áp dụng trước và trở thành phác đồ chuẩn cho trữ lạnh MBT [2]. Sau đó, sự phát triển của phác đồ thủy tinh hóa đã chứng minh hiệu quả vượt trội trên các đối tượng noãn và phôi. Vì vậy, thủy tinh hóa cũng đã được áp dụng trên MBT trong những năm gần đây [6]. Do nguyên lý của hai phương pháp trữ lạnh thủy tinh hóa và đông lạnh chậm khác nhau, chủ yếu dựa trên nồng độ chất bảo quản đông lạnh được sử dụng và tốc độ làm lạnh, quá trình rã đông được thực hiện trên mẫu tế bào hoặc mô sau khi đông lạnh bằng 2 phương pháp này cũng hoàn toàn khác nhau. Cụ thể, với phương pháp thuỷ tinh hoá, nồng độ chất bảo quản đông lạnh có thể lên đến 3 – 8 M, giúp quá trình trao đổi nước giữa tế bào, mô với môi trường xung quanh diễn ra thật nhanh và triệt để. Lúc này tốc độ làm lạnh cũng thật nhanh (25.000 – 40.000 ^oC/phút) nhằm giảm tác động bất lợi cho tế bào và mô khi phải tiếp xúc quá lâu với môi trường có nồng độ chất bảo quản đông lạnh cao. Điều này cũng xảy ra tương tự trong quá trình rã đông đối với phương pháp này, tốc độ rã đông cũng phải thật nhanh và nồng độ chất bảo quản đông lạnh trong môi trường dùng để rã đông cũng thường rất cao để giúp cho tế bào và mô nhanh chóng trở về nhiệt độ sinh lý, cũng như quá trình bù nước cho tế bào, mô cũng được diễn ra thật nhanh. Khác với thuỷ tinh hoá, phương pháp hạ nhiệt độ chậm lại sử dụng nồng độ chất bảo quản đông lạnh thấp (0,5 – 1,5 M) để giúp lấy nước khỏi tế bào, mô một cách từ từ trong quá trình đông lạnh, và do đó, tốc độ hạ nhiệt cũng được diễn ra chậm (0,3 ^oC/phút) để tế bào, mô vẫn có thời gian trao đổi nước với môi trường trong pha đầu của quá trình đông lạnh, cho đến trước khi các vật chất chuyển hoàn toàn sang trạng thái đông. Đó cũng là lý do mà tốc độ rã đông và nồng độ chất bảo quản đông lạnh được sử dụng trong phương pháp này cũng thấp hơn rất nhiều so với thuỷ tinh hoá, nhằm giúp tế bào, mô bù nước một cách từ từ như cách mà nước được rút ra trong quá trình đông lạnh. Để đánh giá hiệu quả của qui trình trữ lạnh, cấu trúc mô và nang noãn cũng như khả năng sống, phát triển của nang noãn ở MBT sau trữ lạnh – rã đông được ghi nhận. Khảo sát cho thấy không có sự khác biệt về cấu trúc mô cũng như sức sống của noãn ở MBT người sau trữ lạnh – rã đông bằng hai phác đồ trữ lạnh chậm và thủy tinh hóa [7]. Tuy nhiên, cho đến nay hầu hết các trường hợp sinh sau trữ lạnh – rã đông MBT người đều được ghi nhận từ việc sử dụng phác đồ trữ lạnh chậm [8]. Mặc dù vậy, hiện vẫn chưa đủ cơ sở để khẳng định phác đồ trữ lạnh chậm hay thủy tinh hóa tối ưu cho áp dụng trữ MBT.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng qui trình trữ lạnh MBT bò bằng cả hai phương

pháp đông lạnh chậm và thủy tinh hóa nhằm chọn phác đồ tối ưu để áp dụng trên người trong điều kiện Việt Nam. Kết quả cho thấy tỉ lệ nang noãn sống sót ở phác đồ trữ lạnh chậm khả quan hơn phác đồ thủy tinh hóa, 72,46 ± 6,11 % so với 59,09 ± 7,08 % (cryotissue) hoặc 58,28 ± 9,28 % (giấy nhôm). Báo cáo của Mikkel Rosendahl và đồng nghiệp vào năm 2011 khi sử dụng phác đồ trữ lạnh chậm MBT tương tự trên chuột cho kết quả tỉ lệ nang noãn sống ở mẫu đối chứng và mẫu sau trữ lạnh rã đông lần lượt là 97 ± 1,30 % và 63 ± 8,00 % (tỉ lệ nang noãn sống sót sau quá trình trữ lạnh – rã đông là 64,95%) [7]. Như vậy, tỉ lệ nang noãn sống sót sau quá trình trữ lạnh – rã đông MBT bò bằng phương pháp đông lạnh chậm trong nghiên cứu của chúng tôi khả quan hơn so với nghiên cứu của Mikkel Rosendahl và đồng nghiệp (2011), 72,46 ± 6,11 % so với 64,95 %. Qua đó cho thấy, phác đồ đông lạnh chậm MBT mà chúng tôi áp dụng có hiệu quả. Tuy vậy, một số vấn đề mà chúng tôi cần cải thiện hơn trong phác đồ hiện tại là việc thu nhận và bảo quản nguồn mẫu trước khi thí nghiệm để đảm bảo tỉ lệ nang noãn sống ban đầu tốt hơn. Đồng thời, việc xử lý mẫu MBT với men Collagenase Ia cũng cần được khảo sát thêm để đánh giá khả năng ảnh hưởng đến sức sống của nang noãn sau phân lập. Trong khi đó, kết quả từ báo cáo của Noriko Kagawa và đồng nghiệp vào năm 2009 khi áp dụng qui trình thủy tinh hóa MBT bò tương tự với nghiên cứu hiện tại cho thấy không có sự khác biệt về tỉ lệ nang noãn sống ở mẫu trước và sau trữ lạnh – rã đông, khoảng 89 %) [9]. Như vậy, phác đồ thủy tinh hóa MBT mà chúng tôi đang xây dựng cần được cải thiện hơn.

Bên cạnh đó, hiệu quả đông lạnh – rã đông MBT bò tương đương khi sử dụng giấy nhôm tự chế để làm dụng cụ trữ lạnh so với sản phẩm thương mại cryotissue trong nghiên cứu này cho thấy khả năng ứng dụng của vật liệu tự chế phù hợp với hoàn cảnh Việt Nam. Đây cũng là một sáng tạo trong quá trình tiếp cận qui trình mới. Hiện tại, chúng tôi chưa ghi nhận báo cáo nào khác về việc sử dụng giấy nhôm trong việc trữ lạnh MBT.

Đây là nghiên cứu đầu tiên xây dựng qui trình trữ lạnh MBT trên mô hình bò tại Việt Nam và kết quả thu nhận ban đầu khả quan. Để hoàn thiện hơn qui trình trữ lạnh MBT, chúng tôi sẽ tiếp tục triển khai theo hướng cải tiến công đoạn bảo quản mẫu MBT trước khi được trữ lạnh, cũng như mở rộng hướng đánh giá kết quả qui trình như khảo sát mô học và nuôi cấy nang noãn sau phân lập.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xây dựng thành công mô hình trữ lạnh MBT bò và cho kết quả nang noãn sống sót sau quá trình đông lạnh – rã đông ở mức chấp nhận trong điều kiện Việt Nam. Trong đó, qui trình trữ lạnh chậm MBT sử dụng máy hạ nhiệt độ theo chương trình cho tỉ lệ nang noãn sống sót cao hơn so với qui trình thủy tinh hóa. Thử nghiệm thành công giấy nhôm tự chế trong qui trình thủy tinh hóa MBT bò mở ra tiềm năng ứng dụng của vật liệu với giá thành thấp thay thế sản phẩm thương mại. Nghiên cứu sẽ tiếp tục được mở rộng nhằm cải thiện hiệu quả qui trình trữ lạnh MBT trước khi tiến đến ứng dụng trên người.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu được thực hiện bằng kinh phí của đề tài khoa học công nghệ cấp Đại học quốc gia TP. HCM.*

Establishment of the ovarian tissue cryopreservation protocol on bovine model

- **Nguyen Thi Phuong Dung**
- **Nguyen Thi Thu Lan**
- **Nguyen Nhat Quang**
- **Ho Manh Tuong**
  The IVF center, An Sinh Hospital (IVFAS)
- **Nguyen Minh Tai Loc**
  The Research Center for Genetics and Reproductive Health (CGRH), Department of Medicine, VNU-HCM
- **Huynh Chi Thien**
  University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Ovarian tissue cryopreservation is a suitable method for fertility preservation on women receiving treatment that may threaten the ovarian function and subsequent fertility. The whole ovarian or a part of ovarian can be cryopreserved for future use. This study was aimed to establish ovarian tissue cryopreservation protocols on bovine model for human application in Vietnam. In this method, bovine ovarians were collected from a slaughter-house and kept at 4 ^oC up to a maximum of 12 hours before doing experiments. The ovarian cortex was cut into pieces of 10x10x1 mm. These pieces were randomly divided into 3 groups: (1) fresh species (control group), (2) species were freezed by slow-freezing method and (3) pieces were freezed by vitrification. After thawing, ovarian cortex pieces were treated with Collagenase Ia for the follicle isolation. The isolated follicles then were stained with Neutral Red. The rate of viable follicles was used as the outcome measure to assess the efficiency of the cryopreservation protocol. In results, the rates of viable follicles were 72.46 ± 6.11 % and 59.09 ± 7.08 % after slow-freezing and vitrification comparing to the control group, respectively. This was the first study which successfully established a protocol of ovarian tissue cryopreservation on bovine model in Vietnam. The protocol should be improved for further application to human treatment in the near future.

Key words: *follicle, ovarian tissue cryopreservation, slow-freezing, vitrification*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. R.R. Santos, C. Amorim, S. Cecconi, M. Fassbender, M. Imhof, J. Lornage, M. Paris, V. Schoenfeldt, B. Martinez-Madrid, Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of dangered species and breeds, *Reprod. Sci*. doi: 10.1016/j.anireprosci..08.010 (2010).

[2]. J. Donnez, B. Martinez-Madrid, P. Jadoul, A. Van Langendonckt, D. Demylle, M.M. Dolmans, Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review, *Hum Reprod Update*, 12, 519–35 (2006).

[3]. M. Rosendahl, K.T. Schmidt, E. Ernst, P.E. Rasmussen, A. Loft, A.G. Byskov, A.N. Andersen, C.Y. Andersen,

Cryopreservation of ovarian tissue for a decade in Denmark: a view of the technique, *Reproductive BioMedicine Online*, 22, 162 – 171 (2011).

[4]. D. Meirow, D. Nugent, The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction, *Hum Reprod Update*, 27, 535-43 (2001).

[5]. I.L.V. Wezel, R.J. Rodgers, Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo, *Biology Of Reproduction*, 55, 1003-1011 (1996).

[6]. C.A. Amorim, M. Curaba, A. Van Langendonckt, M.M. Dolmans, J. Donnez, Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue, *ReprodBiomed Online*, 23, 160–86 (2011).

[7]. V. Keros, S. Xella, K. Hultenby, K. Pettersson, M. Sheikhi, A. Volpe, J. Hreinsson, O. Hovatta, Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue, *Hum Reprod*, 24, 1670-83 (2009).

[8]. J. Donnez, M.M. Dolmans, A. Pellicer, C.D. Garcia, M.S. Serrano, K.T. Schmidt, E. Ernst, V. Luyckx, C.Y. Andersen, Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation, *Fertil Steril*, 99, 1503–13 (2013).

[9]. N. Kagawa, S. Silber, M. Kuwayama, Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue, *Reprod Biomed Online*, 18, 4, 568-77 (2009).