

Khảo sát tác động của giá thể hydrogel màng ôi đến sự phát triển của nang tiền hóc ở mô hình chuột

Trịnh Ngọc Lê Vân, Trần Thị Kim Hằng, Võ Thụy Anh Thư, Lê Thị Vĩ Tuyết, Trần Lê Bảo Hà

Tóm tắt—Trên thế giới, tỷ lệ vô sinh ở trong khoảng 6 – 12 %; tại Việt Nam, tỷ lệ vô sinh này là 7,7 %. Vì vậy, nhu cầu điều trị vô sinh là rất lớn và đặc biệt phức tạp đối với vô sinh nữ. Nuôi trứng thành noãn trong ống nghiệm (IVM) được đánh giá là kỹ thuật hỗ trợ thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) phổ biến và tiềm năng hiện nay. Khi nuôi trong thời gian dài, nang noãn thường có hiện tượng bị trải rộng, việc sử dụng thêm khung nâng đỡ trong quá trình nuôi nang giúp duy trì cấu trúc hình cầu tự nhiên, từ đó giúp nang noãn phát triển hoàn thiện. Màng ôi là một màng vô mạch, có thành phần chính là collagen, fibronectin, nidogen, proteoglycan, ... có chứa nhiều nhân tố tăng trưởng, có đặc tính kháng khuẩn, kháng viêm, tính sinh miễn dịch thấp, có độ đàn nhót tự nhiên. Hydrogel màng ôi có cấu trúc mạng lưới được hình thành từ các sợi dài mảnh, bảo toàn được thành phần chính là collagen, có thể chuyển pha và tạo thành dạng gel. Từ những đặc điểm trên, hydrogel màng ôi thể hiện tiềm năng trong việc sử dụng làm khung nâng đỡ nuôi nang noãn. Khi sử dụng hydrogel màng ôi làm khung nâng đỡ nuôi nang thứ cấp (100 – 130 μm), kích thước noãn và nang tăng sau 12 ngày nuôi, bên cạnh đó, còn có sự hình thành hóc. Những kết quả thu được cho thấy có thể sử dụng hydrogel màng ôi làm khung nâng đỡ cho nang noãn thứ cấp phát triển.

Từ khóa—Nang tiền hóc, hydrogel màng ôi, nuôi trứng thành noãn trong ống nghiệm, giá thể, collagen

Ngày nhận bản thảo: 10-01-2018; Ngày chấp nhận đăng: 05-7-2018; Ngày đăng: 15-10-2018.

Tác giả Trịnh Ngọc Lê Vân, Trần Thị Kim Hằng, Võ Thụy Anh Thư, Lê Thị Vĩ Tuyết, Trần Lê Bảo Hà - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM (e-mail: tnlvn@hcmus.edu.vn).

1 MỞ ĐẦU

Hiện nay việc sử dụng giá thể trong nuôi nang tiền hóc trên thế giới đã trở nên phổ biến. Nhiều thành công tích cực trên các loại giá thể tự nhiên như agar, alginate, collagen, fibronectin, ... và polymer nhân tạo như polyethyleneglycol và polyvinylalcohol [2, 3, 5]. Tuy nhiên, trên mỗi loại vật liệu lại có điểm mạnh và điểm yếu riêng, việc giải phóng nang sau khi nuôi cấy đối với polymer nhân tạo là khó khăn. Đối với polymer tự nhiên có nhiều tác động sinh học lên nang như trên giá thể alginate, noãn trưởng thành nhưng trong giảm phân gây ra sự sắp xếp thoi vô sắc bất thường, nồng độ đậm đặc của collagen gây ức chế sự phát triển của nang dẫn đến hiện tượng thoái hóa nang. Vì vậy cần đảm bảo sự cân bằng giữa tính chất vật lý và thành phần hóa học của khung nền ngoại bào. Dịch chiết từ khung nền ngoại bào là một xu hướng nghiên cứu đang được chú ý, mang nhiều tiềm năng [19, 23]. Việc tạo nên khung nâng đỡ có thể điều tiết tự nhiên nhờ chất tiết của tế bào đồng thời chứa các loại nhân tố tăng trưởng, là tiêu chuẩn mong muốn để chọn vật liệu tạo giá thể nuôi nang noãn. Trong đó, màng ôi là một màng vô mạch, có thành phần chính là collagen, fibronectin, nidogen, proteoglycan... có chứa nhiều nhân tố tăng trưởng, có đặc tính kháng khuẩn, kháng viêm, giảm miễn dịch, có tính đàn hồi tự nhiên [13]. Hydrogel màng ôi cũng có những tính chất tương đồng với màng ôi, và có thể tạo hình dễ dàng trong nuôi cấy *in vitro*. Nhiều nghiên cứu về dịch chiết ngoại bào khác có tác dụng tích cực đối với sự phát triển của nang thứ cấp [9]. Tuy cùng là dịch chiết ngoại bào nhưng tỷ lệ các loại protein và thành phần nhân tố tăng trưởng là khác nhau, nên thử nghiệm trên đa dạng các loại dịch chiết, giúp có cái nhìn bao quát hơn

về tác động của ECM đến sự phát triển của tế bào. Bên cạnh đó, màng ối lại có tính chất kháng khuẩn đặc thù hỗ trợ cho việc nuôi cấy *in vitro*[11], tính kháng viêm và tính sinh miễn dịch thấp cũng là một tiềm năng sử dụng trong *in vivo*. Đồng thời, đây là loại cơ chất chưa được nghiên cứu tác động đến nang trứng trên thế giới và Việt Nam.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Xác định nhiệt độ chuyển pha của hydrogel màng ối

Hydrogel màng ối sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Bộ môn Sinh lý học – Công nghệ Sinh học Động vật, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

Khả năng chuyển pha của hydrogel màng ối được đánh giá thông qua hệ thống Rheology HAAKE Stress 6000 dạng nón/tấm (1 Å) với phương pháp quét nhiệt độ dao động (oscillatory temperature sweep) với tần số không đổi (1 Hz), nhiệt độ tăng từ 4 °C lên 45 °C với tốc độ 1 °C/ phút, cài đặt lặp lại 3 lần. Thông số đo như sau: đo hình học: C35/4° Ti (L06002), yếu tố A: 88.998.000 Pa/Nm, yếu tố M: 14,370 (1/s)/(rad/s), quán tính: $-3,003e^{-05}$ kg.m², độ nhớt 30,00, hệ số nở nhiệt: 2.000 $\mu\text{m}/^{\circ}\text{C}$, tính thuận: 0,003157 rad/Nm, mô mem xoắn: không mở, khoảng cách giữa đỉnh nón và vật đo là 0,139 mm.

Thử nghiệm đảo ngược (inversion test) được thực hiện ở 37⁰ nhằm kiểm tra khả năng hình thành gel của hydrogel màng ối.

Xác định cấu trúc bề mặt của giá thể hydrogel màng ối

Xác định cấu trúc khối hydrogel màng ối bằng kỹ thuật chụp trên kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscope – SEM). Kính hiển vi điện tử có thể tạo ra ảnh với độ phân giải cao bằng cách sử dụng một chùm điện tử hẹp quét trên bề mặt mẫu. Việc tạo ảnh của mẫu vật được thực hiện thông qua việc ghi nhận và phân tích các bức xạ phát ra từ tương tác của chùm điện tử với bề mặt mẫu.

Xác định thành phần chính của giá thể hydrogel màng ối

Collagen được dự đoán là thành phần chính trong hydrogel màng ối. Do đó phương pháp nhuộm với trichrome được sử dụng để kiểm tra thành phần của hydrogel màng ối. Sau khi nhuộm, collagen bắt màu xanh, tế bào chất bắt màu đỏ hoặc hồng, nhân bắt màu nâu sẫm đến đen.

Thu nhận và nuôi cấy nang noãn

Nang noãn được thu nhận từ buồng trứng chuột nhắt trắng cái. Sau khi thu nhận, buồng trứng được chuyển sang giếng chứa 1 mL dung dịch collagenase 2 mg/mL và dùng kim thủy tinh để thu nhận nang noãn nguyên vẹn.

Nang noãn nguyên vẹn được nuôi trong môi trường MediCultIVM®System (80 μL /giếng) (lô 2D) và trên giá thể hydrogel màng ối với cùng môi trường MediCultIVM®System (lô 3D). Mỗi lô thí nghiệm được thực hiện với 30 nang noãn và điều kiện nuôi được duy trì ở 37⁰, 5 % CO₂.

Khảo sát tác động của hydrogel màng ối đến sự phát triển của nang tiền hóc

Sự phát triển của nang tiền hóc được đánh giá thông qua các tiêu chí cụ thể như sau: sự ổn định hình dạng nang (quan sát dưới kính hiển vi), tỉ lệ sống của nang (sử dụng thuốc nhuộm trypan blue để đánh giá), sự tăng kích thước và hình thành hóc của nang khi nuôi trong môi trường MediCultIVM®System ở điều kiện bình thường (2D) và trên giá thể hydrogel màng ối (3D).

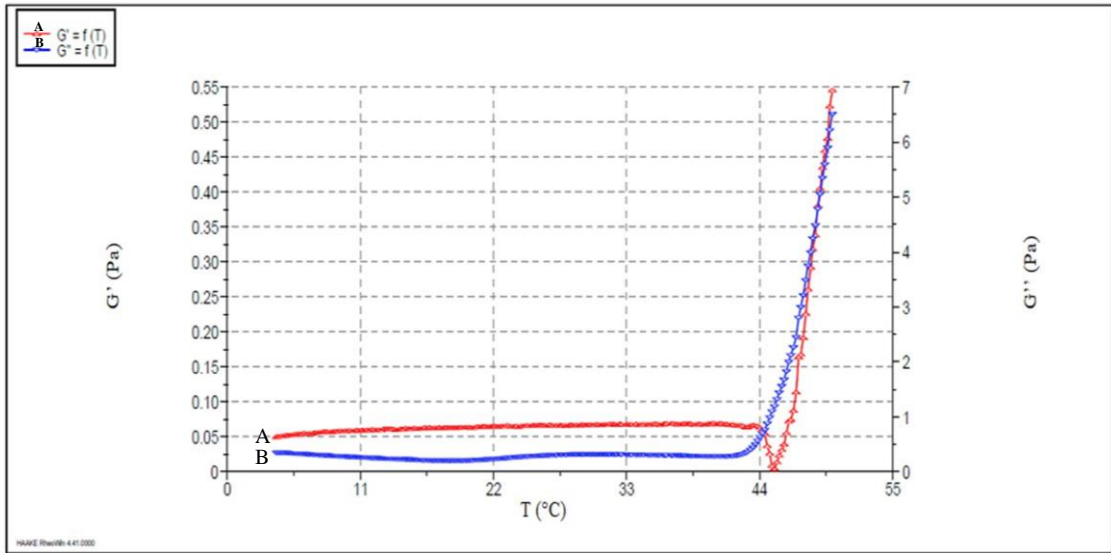
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả xác định nhiệt độ chuyển pha của hydrogel màng ối

Giản đồ về giá trị G' (mô đun đàn hồi) và G'' (mô đun nhớt) theo sự biến thiên về nhiệt độ (hình 1) cho thấy cả 2 đường biểu diễn đều có sự thay đổi hình dạng (cụ thể là hướng lên) vào khoảng nhiệt độ từ 40 – 45⁰. Điều này cho thấy hydrogel màng ối có khả năng chuyển pha từ trạng thái lỏng sang trạng thái gel, và nhiệt độ chuyển pha được xác định vào khoảng từ 40 – 45⁰. Nhiệt độ này được cho là cao hơn so với nhiệt độ chuyển pha dự đoán của hydrogel màng ối (khoảng 37⁰). Điều này được

lí giải là do trong quá trình quét, lực tác dụng lên hydrogel của hệ thống Rheology HAAKE Stress 6000 dạng nón/ tấm (1 Å) đã phá vỡ một số liên

kết giữa các phân tử protein trong hydrogel, khiến cho nhiệt độ chuyển pha khi xác định bằng hệ thống này có xu hướng tăng lên.

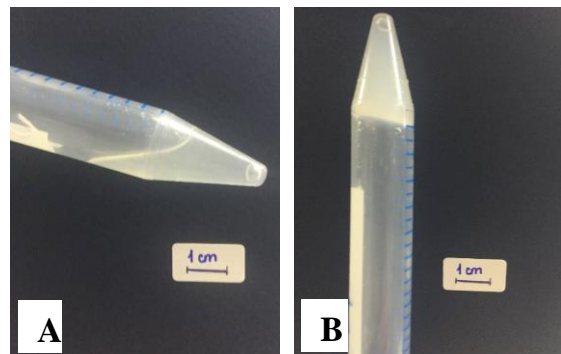


Hình 1. Biểu đồ thể hiện giá trị G' (mô đun đàn hồi) và G'' (mô đun nhớt) của hydrogel màng ối

Thử nghiệm đảo ngược được thực hiện bổ sung để kiểm tra lại khả năng hình thành gel của hydrogel màng ối ở 37° (nhiệt độ nuôi nang ôn). Kết quả thử nghiệm đảo ngược cho thấy, hydrogel màng ối có thể chuyển thành trạng thái đông đặc (dạng gel) ở 37° (Hình 2).

Trong suốt quá trình phát triển của nang ôn, các tế bào trong nang liên kết với nhau qua liên kết khe, và phát triển nhờ các chất tiết của nhau [4, 14, 15]. Sự hình thành hóc và sự tiết steroid là hai khía cạnh cần quan tâm trong quá trình phát triển nang, chịu nhiều ảnh hưởng từ khung nâng đỡ. Nhiều nghiên cứu chứng minh, tính chất vật lý của khung nâng đỡ làm thay đổi tính chất mong muốn của vi môi trường của nang [22]. Cụ thể, là độ đặc, kích thước lỗ, độ phân hủy đều ảnh hưởng đến sự phát triển của nang. Khung nâng đỡ có mô đun đàn hồi thấp hơn 250 Pa tạo điều kiện tốt cho sự phát triển của nang, thể hiện thông qua số lượng nang lớn, chất lượng nang tốt và có khả năng tăng kích thước, hình thành hóc, tiết steroid tương tự như nang được nuôi trong *in vivo*, ôn có thể phát triển đến giai đoạn giảm phân II. Ngược lại, khung nâng đỡ có mô đun đàn hồi cao hơn 500 Pa, đây là đặc tính không mong đợi của vi môi trường nuôi nang. Nang nuôi trong khung

nâng đỡ này giảm phát triển, tỷ lệ nang xuất hiện hóc thấp, sự tiết steroid bất thường, đồng nghĩa với việc chất lượng nang không tốt [21]. Bên cạnh đó, nhiệt độ trong suốt quá trình nuôi cấy nên được duy trì ở 37° để đảm bảo sự phát triển tốt của nang. Do vậy, giá trị mô đun đàn hồi của mẫu hydrogel ở 37° được quan tâm hơn cả. Dựa theo hình 1, giá trị mô đun đàn hồi của hydrogel màng ối rất thấp, phù hợp để làm giá thể sinh học nuôi nang ôn.



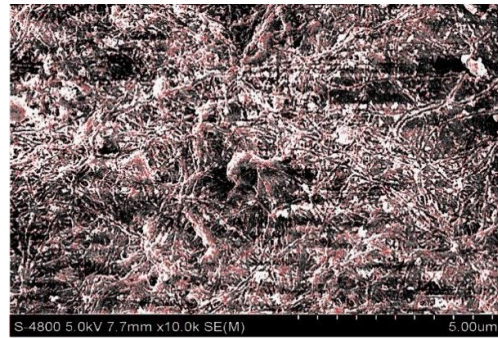
Hình 2. Kết quả thử nghiệm đảo ngược của hydrogel màng ối.
A: Hydrogel ở trạng thái lỏng ở 4° C;
B: Hydrogel chuyển sang trạng thái gel ở 37° C

Kết quả chụp SEM

Kết quả chụp SEM cho thấy hydrogel màng ối được cấu tạo từ các sợi dài và mảnh, sắp xếp ngẫu

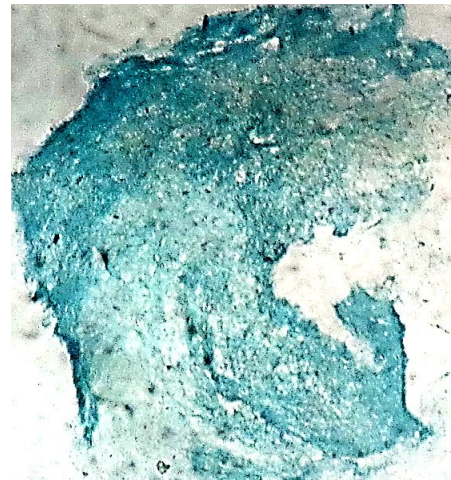
nhiên và đan xen nhau tạo thành mạng lưới có các mắt lưới đa dạng về hình dạng và kích thước (Hình 3). Hydrogel có bản chất là protein, được tạo khối bằng cách ủ hydrogel ở 37⁰ tạo điều kiện thuận lợi để các protein sợi sắp xếp ngẫu nhiên với nhau. Cụ thể, khi nhiệt độ tăng, sợi protein thay đổi cấu trúc không gian bằng cách tạo các nếp gấp, khi nhiệt độ tiếp tục tăng, các sợi này cuộn xoắn, đồng thời do sự tương tác ngẫu nhiên giữa các sợi protein nên các sợi được bện lại với nhau thành cấu trúc mạng lưới. Nghiên cứu về cấu trúc hydrogel từ dịch chiết khung nền ngoại bào của bàng quang, thận heo cũng chứng minh, hydrogel này là tập hợp các sợi protein có khả năng bện lại với nhau tạo nên cấu trúc mạng lưới không gian ba chiều [1]. Như vậy, kết quả chụp SEM này phù hợp với lý thuyết và các nghiên cứu về cấu trúc của hydrogel dịch chiết khung nền ngoại bào.

Hydrogel màng ối có dạng mạng lưới với mật độ sợi cao giúp hạn chế sự thất thoát của các yếu tố tiết (GDF-9 từ noãn; IGF, KL từ tế bào hạt, ...) [6, 7], qua đó nâng cao hiệu quả tác động của các chất này đến sự phát triển của nang. Bên cạnh đó, các yếu tố như FSH, LH và các loại yếu tố tăng trưởng khác được môi trường nuôi cung cấp cho nang, cần có con đường thích hợp để vận chuyển vào nang. Vì vậy, việc điều chỉnh dễ dàng kích thước lỗ của giá thể là một tiêu chuẩn đáng chú ý trong việc chọn lựa vật liệu. Hydrogel dịch chiết ngoại bào có thể thay đổi dễ dàng kích thước lỗ bằng cách thay đổi nồng độ của nó, điều này cũng chính là điểm mạnh của hydrogel màng ối [22]. Các loại giá thể thường được sử dụng trong nuôi nang noãn như alginate, fibrin, hyaluronan cũng được tạo khối có bản chất là mạng lưới sợi giữ nước [4, 8, 25]. Điều này chứng minh, hydrogel màng ối có tiềm năng sử dụng làm giá thể nuôi nang noãn.



Hình 3. Cấu trúc bề mặt của hydrogel màng ối (độ phóng đại 10000 lần)

Kết quả nhuộm Trichrome



Hình 4. Bề mặt lát cắt ngang của hydrogel màng ối sau khi nhuộm trichrome (độ phóng đại 40 lần)

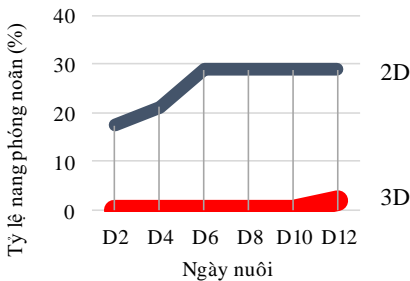
Lát cắt ngang của khối hydrogel màng ối (Hình 4) có dạng mạng lưới gồm nhiều sợi đan xen vào nhau, lớp màng mỏng hầu hết này bắt màu xanh. Điều này chứng tỏ thành phần chính của hydrogel màng ối là collagen. Thực tế, màng ối được cấu tạo từ nhiều loại protein cấu trúc như fibronectin, nidogen, laminin, collagen. Trong đó collagen tồn tại ở tất cả các lớp (màng nền, lớp đặc, lớp tế bào sợi, lớp xốp) của màng ối. Collagen loại IV, III tồn tại ở tất cả các lớp, collagen I tồn tại ở ba lớp kế cận lớp màng nền, collagen loại VI tồn tại ở lớp đặc và lớp tế bào sợi [12].

Collagen là một loại protein đặc biệt vừa có vai trò cấu trúc, tham gia hình thành khung nền ngoại bào, vừa có vai trò chức năng, trình tự bám dính integrin của collagen cho phép tế bào bám dính

trong quá trình tăng sinh. Cụ thể, collagen loại IV giúp tăng mật độ nang và tăng khả năng phát triển của nang ở buồng trứng của chuột năm ngày tuổi, collagen loại I tăng khả năng tiết estradiol của tế bào hạt ở người (estradiol hỗ trợ phát triển nang có hóc, củng cố các liên kết khe giữa tế bào hạt – trứng, và ngăn sự thoái hóa nang) [3, 18, 24]. Như vậy, hydrogel màng ối có nhiều tiềm năng hỗ trợ sự phát triển của nang noãn, phù hợp với định hướng sử dụng làm giá thể nuôi nang noãn.

Kết quả đánh giá sự ổn định hình dạng nang

Trong quá trình nuôi nang noãn, ghi nhận được nhiều trường hợp nang noãn bị trải ra bề mặt nuôi cấy, gây rụng trứng non. Vì vậy, khảo sát sự ổn định hình dạng của nang là một tiêu chí thể hiện ảnh hưởng của giá thể đến sự phát triển của nang. Khảo sát sự ổn định hình dạng của nang thứ cấp được thực hiện dựa trên tỷ lệ phóng noãn của lô 2D và lô 3D. Kết quả cho thấy tỷ lệ phóng noãn ở lô 2D lớn gấp 14,25 lần so với tỷ lệ phóng noãn ở lô 3D. Ở lô 2D, nang phóng noãn xuất hiện sớm, vào ngày thứ hai sau khi bắt đầu nuôi; còn ở lô 3D, nang phóng noãn muộn, vào ngày cuối cùng của quá trình nuôi (Hình 5).

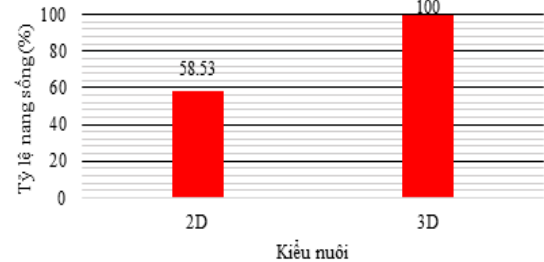


Hình 5. Biểu đồ thể hiện tỉ lệ phóng noãn khi nuôi nang trên môi trường thường (2D) và trên giá thể hydrogel màng ối (3D)

Nang noãn có dạng hình cầu, gồm một noãn được bao xung quanh là các tế bào vỏ. Do trong quá trình thu nhận nang từ buồng trứng, nang noãn chịu tác động của các tác nhân enzyme và lực cơ học gây ra sự nhiễu loạn màng đáy quanh nang. Màng đáy bị tổn thương dẫn đến các tế bào hạt nhanh chóng và dễ dàng tách nhau ra và tách rời khỏi trứng. Hiện tượng phóng noãn này thường gặp ở phương pháp nuôi trong môi trường 2D truyền thống. Khi nuôi nang noãn trong giá

thể, giá thể tạo một áp lực ngược lên nang noãn từ đó tăng sự tiếp giáp giữa tế bào hạt và noãn vì vậy ngăn ngừa sự rụng trứng non, cụ thể, hiện tượng phóng noãn chỉ xảy ra ở ngày cuối cùng của quá trình nuôi [5]. Như là, hydrogel màng ối được sử dụng để mô phỏng khung nền ngoại bào của buồng trứng, giúp giữ vững liên kết giữa khung nền với tế bào, từ đó tạo nền tảng duy trì các liên kết giữa các tế bào với nhau nên trứng khó khăn thoát ra khỏi nang. Kết quả thực tế phù hợp với lý thuyết về cấu tạo của một nang noãn, đồng thời phù hợp với các ghi nhận giảm tỷ lệ phóng noãn và phóng noãn ở thời gian muộn trong quá trình nuôi khi sử dụng giá thể để nuôi nang noãn.

Kết quả đánh giá tỉ lệ sống của nang

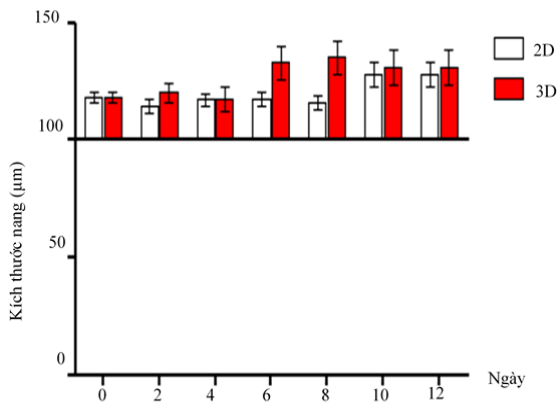


Hình 6. Biểu đồ thể hiện tỉ lệ sống của nang trên môi trường bình thường (2D) và trên giá thể hydrogel màng ối (3D)

Kết quả nhuộm trypan blue cho thấy, sau 12 ngày nuôi nang noãn, tỷ lệ nang sống ở lô 2D là 58,53 % thấp hơn so với tỷ lệ nang sống ở lô 3D là 100 % (Hình 6). Kết quả này rất đáng ghi nhận, khi một số loại vật liệu khác như alginate, fibrin, collagen, matrigel, ... chỉ giúp nang tồn tại ở tỷ lệ cao nhất là 93 % [5, 8, 10, 20, 25].

Kết quả sự gia tăng kích thước nang

Ở lô 2D và 3D, nang thứ cấp có kích thước khoảng 118,18 μm đều tăng kích thước sau 12 ngày nuôi. Ở lô 3D, kích thước trung bình lớn nhất mà nang tăng trưởng được là 135,27 μm vào ngày 6. Ở lô 2D, kích thước trung bình lớn nhất là 128,18 μm vào ngày 10 (hình 7).

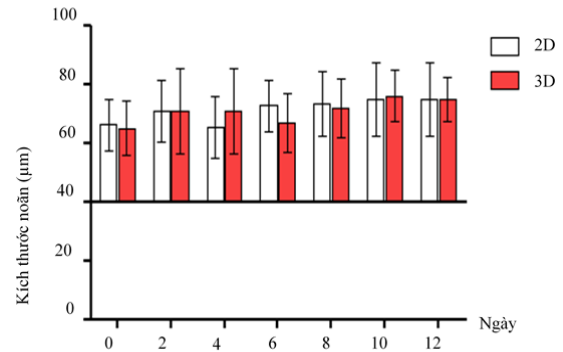


Hình 7. Biểu đồ thể hiện tỉ lệ sự gia tăng kích thước nang trên môi trường bình thường (2D) và trên giá thể hydrogel màng ối (3D)

Nang trứng phát triển qua ba giai đoạn điển hình, giai đoạn túi mầm thành nang sơ cấp là giai đoạn không phụ thuộc gonadotropin, giai đoạn nang có hóc hoàn chỉnh đến mức phóng trứng là giai đoạn phụ thuộc gonadotropin. Giai đoạn phát triển từ nang thứ cấp hai lớp thành nhiều lớp là giai đoạn đặc biệt được điều hòa dựa trên các tín hiệu tiết ra từ các tế bào trong nang. Trong đó sự tăng kích thước nang đồng nghĩa với sự tăng kích thước và số lượng các lớp tế bào hạt. Noãn làm nhiệm vụ tiết tín hiệu GDF – 9 kích thích sự tăng sinh và giảm sự apoptosis của tế bào hạt [15]. Trong hydrogel màng ối, sự tiếp giáp giữa noãn và tế bào hạt ổn định, đồng thời nồng độ GDF-9 tập trung tốt trong khối giá thể, tăng hiệu quả hỗ trợ sự phát triển của tế bào hạt. Ngược lại, môi trường nuôi 2D thông thường, pha loãng nồng độ GDF-9, đồng thời gián đoạn các liên kết khe giữa các tế bào trong nang vì vậy hạn chế sự phát triển của tế bào hạt. Bên cạnh đó, nang noãn thứ cấp hai lớp, có kích thước từ 100–130 µm sau 4 ngày nuôi *in vitro* phát triển được đến giai đoạn nang thứ cấp nhiều lớp, có kích thước 135–145 µm [20]. Như vậy, ở lô 3D, nang thứ cấp hai lớp đã phát triển thành nang thứ cấp nhiều lớp, còn lô 2D, nang vẫn giữ nguyên mức phát triển ở nang thứ cấp hai lớp.

Kết quả sự gia tăng kích thước noãn

Ở lô 2D và 3D, noãn có kích thước khoảng 65 – 66 µm đều tăng kích thước đến khoảng 74,8 µm sau 12 ngày nuôi. Kích thước trứng không có sự chênh lệch giữa 2D và 3D (hình 8).



Hình 8. Biểu đồ thể hiện tỉ lệ sự gia tăng kích thước noãn trên môi trường bình thường (2D) và trên giá thể hydrogel màng ối (3D)

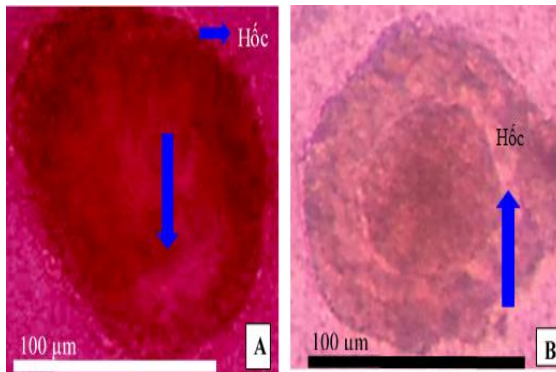
Ở chuột, kích thước noãn ở giai đoạn nang thứ cấp ở trong khoảng 53,8 – 67,4 µm đến giai đoạn nang có hóc hoàn chỉnh (có khả năng phóng noãn) từ 70 – 80 µm [16]. Như vậy noãn được nuôi ở lô 2D và 3D sau 12 ngày nuôi có kích thước của noãn trưởng thành. Đây là bước khởi đầu triển vọng để thực hiện các thử nghiệm khảo sát chất lượng của trứng.

Kết quả sự hình thành hóc

Trong buồng trứng, sự hình thành hóc xuất hiện trong giai đoạn cuối của nang thứ cấp, bắt đầu khi các ổ dịch nhỏ được tích lũy. Những ổ dịch nhỏ này được bao bọc bởi các tế bào hạt có liên kết lỏng lẻo với nhau, dịch chứa trong các ổ này có nguồn gốc từ sự apoptosis của tế bào hạt. Vùng đậm đặc chất hữu cơ này tạo một lực thẩm thấu lớn hút nước [17]. Sau đó dịch nang thẩm thấu từ các mao mạch xung quanh nang trứng vào ổ dịch này, làm tăng nhanh thể tích ổ dịch, đến kích thước 300 – 500 µm thì phóng noãn trưởng thành [16]. Trong *in vitro*, tuy không có mạng lưới mao mạch nhưng nang vẫn xuất hiện hóc bình thường, do nang có thể tiếp cận dễ dàng với môi trường nuôi xung quanh. Nhiều nghiên cứu nuôi nang noãn trên môi trường thường và giá thể như

alginate, fibrin, hyaluronan,...[8] nang đều có khả năng tăng trưởng đến mức có hóc.

Sự hình thành hóc được khảo sát trên kính hiển vi soi ngược, kết quả thu nhận được, nang thứ cấp ở lô 2D và lô 3D đều có khả năng hình thành hóc sau 12 ngày nuôi (Hình 9). Tuy nhiên, tại lô 3D, hóc xuất hiện sớm vào ngày 6; còn lô 2D, hóc xuất hiện muộn hơn vào ngày 10. Điều này có thể lí giải là do sự gián đoạn các liên kết giữa các tế bào của nang và sự pha loãng các tín hiệu tiết khi nuôi trong điều kiện môi trường 2D đều là các yếu tố làm chậm sự phát triển của nang. Như vậy, sự hình thành hóc và hình dạng nang ổn định trong lô 3D tốt hơn so với lô 2D, kết quả này phù hợp với lý thuyết và các nghiên cứu đã có trước đó.



Hình 9. A. Nang noãn biến dạng có hóc nuôi ở lô 2D (độ phóng đại 10 lần), B. Nang noãn có hóc có hình dạng bình thường ở lô 3D (độ phóng đại 10 lần).

4 KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, hydrogel màng ổi đã thể hiện được tiềm năng của mình trong việc có thể ứng dụng làm giá thể 3D nhằm nuôi trưởng thành nang tiền hóc *in vitro*. Hydrogel có độ đàn hồi phù hợp ở 37^o, cùng với thành phần chính là collagen đã hỗ trợ sự tăng trưởng và phát triển của nang. Mặc dù chưa đánh giá được khả năng thụ tinh của noãn, tuy nhiên với sự gia tăng kích thước của nang và xuất hiện hóc trong quá trình nuôi cho thấy triển vọng của phương pháp này.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ Đề tài Nghiên cứu khoa học cấp Trường của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia TP HCM

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. S.F. Badylak, D. Freytes, Extracellular Matrix-Derived Gels and Related Methods, Google Patents, 2014.
- [2]. B. Rafael, Z., et al., Collagen matrix influences the morphologic features and steroid secretion of human granulosa cells, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 159, 6, 1570–1574, 1988.
- [3]. C.B. Berkholtz, L.D. Shea, T.K. Woodruff. Extracellular matrix functions in follicle maturation. in Seminars in reproductive medicine, NIH Public Access, 2006.
- [4]. N. Desai et al., Three dimensional culture of fresh and vitrified mouse pre-antral follicles in a hyaluronan-based hydrogel: a preliminary investigation of a novel biomaterial for in vitro follicle maturation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10, 1, 1, 2012.
- [5]. D.S. Buttke, P., et al, Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary, *Journal of cell science*, 121, 23, 3890-3900, 2008.
- [6]. J.J. Eppig, E.E. Telfer, Isolation and culture of oocytes. *Methods in Enzymology*, 225, 77, 1993.
- [7]. J.J. Eppig, K. Wigglesworth, F.L. Pendola, The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 5, 2890–2894, 2002.
- [8]. Heise, M., et al., Calcium alginate microencapsulation of ovarian follicles impacts FSH delivery and follicle morphology, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 1, 1, 2005.
- [9]. O. Hovatta, et al., Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Human Reproduction*, 12, 5, 1032–1036, 1997.
- [10]. P.K. Kreeger, et al., The in vitro regulation of ovarian follicle development using alginate-extracellular matrix gels. *Biomaterials*, 27, 5, 714–723, 2006.
- [11]. S.B. Lee, et al., Suppression of TGF- β signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Current Eye Research*, 20, 4, 325–334, 2000.
- [12]. A. Mamede, et al., Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell And Tissue Research*, 349, 2, 447–458, 2012.
- [13]. H. Niknejad et al., Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cells Mater*, 15, 88–99, 2008.
- [14]. M. Orisaka, et al., Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of Ovarian Research*, 2, 1, 1, 2009.
- [15]. S.A. Pangas et al., Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell-oocyte complexes. *Tissue Engineering*, 9, 5, 1013–1021, 2003.
- [16]. H. Peters, The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinologica*, 62, 1, 98–116, 1969.
- [17]. R.J. Rodgers, H.F. Irving-Rodgers, Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction*, 82, 6, 1021–1029, 2010.

- [18]. R.J. Rodgers, H.F. Irving-Rodgers, D.L. Russell, Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction*, 126, 4, 415–424, 2003.
- [19]. M.W. Tibbitt, K.S. Anseth, Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 103, 4, 655–663, 2009.
- [20]. J. Vanacker, et al., Transplantation of an alginate–matrigel matrix containing isolated ovarian cells: first step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells. *Biomaterials*, 33, 26, 6079–6085, 2012.
- [21]. E.R. West, Engineering the in Vitro Ovarian Follicle Microenvironment: Developmental Regulation by the Culture Matrix and Translational Approaches for Human Fertility Preservation, ProQuest, 2008.
- [22]. E.R. West et al., Physical properties of alginate hydrogels and their effects on *in vitro* follicle development. *Biomaterials*, 28, 30, 4439–4448, 2007.
- [23]. M.T. Wolf et al., A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix, *Biomaterials*, 33, 29, 7028–7038, 2012.
- [24]. T.K. Woodruff, L.D. Shea, The role of the extracellular matrix in ovarian follicle development, *Reproductive Sciences*, 14, 8 suppl, 6–10, 2007.
- [25]. J. Xu, et al., Fibrin promotes development and function of macaque primary follicles during encapsulated three-dimensional culture. *Human Reproduction*, 28, 8, 2187–2, 2013.

Evaluation of amniotic hydrogel's impact on the development of murine pre-antral follicles in mouse model

Trinh Ngoc Le Van*, Tran Thi Kim Hang, Vo Thuy Anh Thu, Le Thi Vi Tuyet, Tran Le Bao Ha
University of Science, VNUHCM

*Corresponding author: tnivan@hcmus.edu.vn

Received: 10-01-2018, Accepted: 05-7-2018, Published: 15-10-2018.

Abstract—Global average infertility rate is about 6–12%, and in Vietnam at around 7.7%. As a result, there is a high demand for treatment, especially for female infertility. *In vitro* maturation (IVM) was evaluated and proven to be the most popular and promising at the moment. In long-term cultivation, the follicle was observed to extend, therefore, the usage of a supporting frame is quite necessary to maintain follicle's natural sphere structure as well as completing the mature process. Amniotic membrane is an avascular membrane, composed of collagen, fibronectin, nidogen, proteoglycan, containing a big number of growth – factors with

antimicrobial, anti-inflammatory, low immunogenicity and viscoelasticity properties. Amniotic hydrogel owns structure formed with thin fibers to help preserve the main component as collagen, which can turn to gel form at 37 degree Celsius. With those properties, amniotic hydrogel showed high potential as a scaffold for the follicle. When amniotic hydrogel is used as a scaffold for cultivating of secondary follicle (100 – 130 μm), the size of oocyte and follicle increased after 12 days of culturing, along with the formation of antrum. The results demonstrated the possibility to use amniotic hydrogel as a scaffold for the development of the secondary follicle.

Index Terms— Pre-antral follicles, amniotic hydrogel, in vitro maturation, scaffold, collagen