

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★



LÂM THỊ NGỌC THANH

**ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ
SINH HỌC LÊN CHẤT LƯỢNG NOÃN CHÓ
TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI CHÍN *IN VITRO***

**LUẬN VĂN KỸ SƯ
CHUYÊN NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★



**ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ
SINH HỌC LÊN CHẤT LƯỢNG NOÃN CHÓ TRONG
ĐIỀU KIỆN NUÔI CHÍN *IN VITRO***

**LUẬN VĂN KỸ SƯ
CHUYÊN NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Giáo viên hướng dẫn
PGS. TS. TRẦN THỊ DÂN
BSTY. QUÁCH TUYẾT ANH
KS. NGUYỄN VĂN ÚT**

**Sinh viên thực hiện
LÂM THỊ NGỌC THANH
KHÓA: 2002 - 2006**

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2006

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY, HCMC
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★



**EVALUATE THE EFFECT OF SOME
BIOLOGICAL FACTORS IN CANINE OOCYTE
QUALITY IN *IN VITRO* CONDITION**

**GRADUATION THESIS
MAJOR: BIOTECHNOLOGY**

Professor

**PhD. TRAN THI DAN
Vet. QUACH TUYET ANH
Eng. NGUYEN VAN UT**

Student

**LAM THI NGOC THANH
TERM: 2002 - 2006**

HCMC, 09/2006

LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn:

- Ban Giám Hiệu trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt thời gian học tập.
- PGS. TS. Trần Thị Dân, người thầy đáng kính đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ cũng như động viên tôi lúc tôi gặp khó khăn.
- Thầy Nguyễn Văn Thuận, thầy Nguyễn Thanh Bình đã dành thời gian quý báu để cung cấp cho tôi những kinh nghiệm quý báu.
- BSTY. Quách Tuyết Anh, KS. Nguyễn Văn Út đã trực tiếp hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài tốt nghiệp.
- Th.S. Trần Thị Bích Liên và cô Hồ Thị Nga cùng các thầy cô khoa chăn nuôi thú y đã tạo mọi điều kiện để tôi hoàn thành tốt đề tài.
- Các anh chị ở trung tâm phân tích đã tận tình giúp đỡ trong lúc tôi thực tập tại đây.
- Cùng toàn thể lớp CNSH28 đã hỗ trợ, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt thời gian làm đề tài.

Khắc ghi công ơn ba mẹ cùng những người thân trong gia đình đã luôn bên cạnh cổ vũ động viên con trong suốt quá trình học tập tại trường.

Chân thành cảm ơn.

**Sinh viên thực hiện
Lâm Thị Ngọc Thanh**

TÓM TẮT

LÂM THỊ NGỌC THANH, Đại học Nông Lâm TP.HCM, tháng 9/2005. “ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ SINH HỌC LÊN CHẤT LƯỢNG NOÃN CHÓ Ở ĐIỀU KIỆN *IN VIRO*”.

Giáo viên hướng dẫn

PGS. TS. TRẦN THỊ DÂN

BSTY. QUÁCH TUYẾT ANH

KS. NGUYỄN VĂN ÚT

Các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản như IVM, IVF, IVD đã trở nên phổ biến trên thế giới. Đã có nhiều nghiên cứu trên các đối tượng heo, bò, cừu, chuột... đạt được những thành tựu đáng kể. Trên chó, các kỹ thuật này còn nhiều hạn chế do cơ chế trưởng thành của noãn có nhiều khác biệt so với các loài động vật khác. Do đó, kỹ thuật nuôi noãn chín cần được hoàn thiện, làm nền tảng cho các nghiên cứu kế tiếp. Đề tài được thực hiện và đạt được những kết quả sau:

- ❖ Chó nhỏ hơn 5 tháng tuổi không thể cung cấp noãn cho IVM. Số noãn lấy được trên mỗi chó cái ở giai đoạn này là 2,31 noãn, chất lượng noãn cũng không ổn định. Chỉ nên lấy noãn của chó đã trên 5 tháng tuổi. Ở độ tuổi này, tỉ lệ noãn lấy được trên mỗi chó cái là 25,38 noãn.
- ❖ Tỉ lệ IVM thành công 0.75% trên buồng trứng lấy ở giai đoạn 1(chó vừa bị đập chết). Buồng trứng ở giai đoạn 2 và 3 trong quy trình giết mổ (sau khi thui lửa gas) không thể dùng cho IVM.
- ❖ Theo giai đoạn sinh sản, buồng trứng ở giai đoạn có xoang nang là nguồn cung cấp noãn dồi dào nhất cho IVM(42,41 noãn/chó). Noãn cũng đạt được hình thái tốt nhất ở giai đoạn này. Ngược lại, chó ở giai đoạn nuôi con là có số noãn thấp nhất(9,8 noãn/chó), có lẽ do prolactin đã ức chế sự phát triển của nang noãn. Số noãn thu được trên các giai đoạn còn lại là: thể vàng (13.63), nghi ngơi (14,2) và mang thai (15,88).

SUMMARY

LÂM THỊ NGỌC THANH, Nong Lam University, september 2005.
“EVALUATE THE EFFECT OF SOME BIOLOGICAL FACTORS IN CANINE
OOCYTE QUALITY IN *IN VITRO* CONDITION”

Guided staff

TRAN THI DAN, Ph.D

QUACH TUYET ANH, Vet

NGUYEN VAN UT, B.A

Assisted reproductive technologies such as IVM, IVF, IVD.. have become popular over the world. There were many achievements in bovine, mouse, porcine...In canine species, these techniques have many limits because canine oocyte maturation mechanism different from other mammalian species. For this reason, improvement in oocyte maturation technologies may be expected as procedures for future researches . This study is carried out and have some results.

❖ The bitch that younger than 5 months old can't provide oocytes for IVM. The number of oocytes collected per bitch in this age are too low (2.31). The oocyte quality isn't stable either. We should collect oocytes from bitches that older than 5 months old. In this age, we could collect 25.38 oocytes per bitch.

❖ Maturation rate is 0.75% in dogs that have just been beaten, lower than Rodrigues's result with the same media. The dog that has been dip in hot water can't use for IVM.

❖ Ovary in follicular phase is the best source for IVM (42,41 oocytes/bitch). The quality of oocytes in this phase is good, too. On the contrary, the number of oocytes collected from bitches that have cubs is very low (9.8 oocytes/ bitch). Prolactin may be the reason for this problem.

MỤC LỤC

CHƯƠNG	TRANG
Trang tựa	
Lời cảm ơn	iii
Tóm tắt	iv
Summary	v
Mục lục	vi
Danh mục các chữ viết tắt.....	ix
Danh mục các bảng	x
Danh mục các biểu đồ	x
Danh mục các hình.....	xi
1. MỞ ĐẦU	
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục tiêu.....	1
1.3. Yêu cầu.....	1
2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	
2.1. Cấu tạo và chức năng của hệ sinh dục của chó cái.....	3
2.1.1. Buồng trứng	3
2.1.2. Ống dẫn trứng	3
2.1.3. Tử cung	4
2.1.4. Cổ tử cung.....	4
2.1.5 Âm đạo.....	4
2.2. Quá trình trưởng thành và phát triển của tế bào trứng	5
2.2.1. Quá trình trưởng thành của nang noãn	5
2.2.2. Nội tiết của nang tăng trưởng	6
2.2.3. Sự trưởng thành của noãn	6
2.2.3.1. Trưởng thành nhân.....	6
2.2.3.2. Trưởng thành tế bào chất.....	7

2.3. IVM (<i>In vitro</i> maturation)	7
2.3.1. Lịch sử IVM.....	7
2.3.2. Hệ thống môi trường sử dụng trong nuôi noãn chó <i>in vitro</i>	7
2.3.2.1. Môi trường nang noãn	7
2.3.2.2. Môi trường giọt.	8
2.3.2.3. Môi trường tế bào một lớp.	8
2.3.2.4. Môi trường ống dẫn trứng tách biệt..	9
2.3.3. Môi trường sinh hóa cho sự trưởng thành <i>in vitro</i> của noãn chó.....	10
2.3.3.1. Môi trường nuôi cấy.....	10
2.3.3.1. Các chất bổ sung vào môi trường.....	10
2.3.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến IVM.....	11
2.3.4.1. Thời gian	11
2.3.4.2. Chất lượng noãn và kích thước nang noãn.....	12
2.3.4.3. Tuổi và tình trạng sinh dục chó cái	12
2.3.4.4. Nồng độ oxy và nhiệt độ	12
3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	
3.1. Thời gian và địa điểm thực hiện.....	13
3.2. Nội dung khảo sát.....	13
3.3. Vật liệu	13
3.3.1. Vật liệu.....	13
3.3.2. Hóa chất	13
3.3.2.1 Môi trường nuôi noãn.....	13
3.3.2.1 Môi trường rửa noãn PBS-PVA.	13
3.3.2.1 Các hóa chất nhuộm noãn.	14
3.3.3. Thiết bị.....	14
3.3.4. Dụng cụ.....	14
3.4. Phương pháp tiến hành.....	15
3.4.1. Thu nhận buồng trứng tại lò mổ	15
3.4.1.1 Xác định tuổi chó	15

3.4.1.2 Thao tác mổ buồng trứng	17
3.4.1.3 Thu nhận buồng trứng	17
3.4.2. Tìm và rửa noãn	19
3.4.3. Nuôi noãn	19
3.4.4 Thu nhận noãn sau khi nuôi	20
3.4.5. Đánh giá phân loại noãn	20
3.4.6. Nhuộm noãn	21
3.5. Xử lý thống kê	22
4. KẾT QUẢ THẢO LUẬN	
4.1. Thí nghiệm 1: ảnh hưởng của tuổi chó đến số lượng noãn thu được	23
4.2. Thí nghiệm 2: ảnh hưởng của nhiệt độ bên trong xoang bụng chó lên chất lượng và sự chín của noãn	23
4.2.1. Đặc điểm hình thái của buồng trứng	24
4.2.2. Đặc điểm hình thái của noãn	24
4.2.3. Kết quả IVM	25
4.3. Ảnh hưởng của chu kỳ động dục lên chất lượng và số lượng noãn thu hoạch	27
4.4. Kinh nghiệm trong IVM	28
5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	
5.1. Kết luận	30
5.2. Đề nghị	30
6. TÀI LIỆU THAM KHẢO	
7. PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

BAS (Bovine adult serum)	huyết thanh bò trưởng thành
BSA (Bovine serum albumin)	albumin huyết thanh bò
COC (cumulus oocyte complex)	phức hợp noãn và tế bào hạt tụ
ECS (estrus cow serum)	huyết thanh bò động dục
FCS (fetal calf serum)	huyết thanh thai bò
FSH (follicle stimulating hormone)	hormon kích thích nang noãn
GH (growth hormone)	hormon tăng trưởng
GV (germinal vesical)	giai đoạn túi mầm
GVBD (germinal vesical breakdown)	giai đoạn vỡ túi mầm
hCG (human chorionic gonadotropin)	kích dục tổ của nhau thai người
HESPES	hydroxyethylpiperazine ethanesulfonic acid (môi trường rửa trứng)
hMG (human menopausal gonadotropin)	kích dục tổ của phụ nữ mãn kinh
IVM (<i>in vitro</i> maturation)	trưởng thành trong ống nghiệm
IVF(<i>in vitro</i> fertilization)	thụ tinh trong ống nghiệm.
LH (luteinizing hormone)	hormon thể vàng
MI (metaphase I)	trung kỳ I
MII (metaphase II)	trung kỳ II
MPF (maturation promoting factor)	yếu tố khởi động trưởng thành
NST	nhiễm sắc thể
PBS	phosphate buffer saline
PGC (primordial germ cell)	noãn nguyên bào
PVA	polyvinyl alcohol
SOF (synthetic oviductal fluid)	dịch ống dẫn trứng tổng hợp
TCM 199 (tissue cultured medium 199)	môi trường nuôi cấy mô

DANH MỤC CÁC BẢNG

	trang
Bảng 3.1: Thời gian mọc răng của chó	16
Bảng 4.1: Số lượng noãn thu được trên mỗi chó theo độ tuổi	23
Bảng 4.2: Tỷ lệ các loại noãn sau khi nuôi cấy	26
Bảng 4.3: Số lượng noãn thu được trên mỗi chó theo giai đoạn sinh sản	28

DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ

	trang
Biểu đồ 4.1: So sánh tỷ lệ % các loại noãn sau khi nuôi	26
Biểu đồ 4.2: Số lượng noãn thu được trên mỗi chó theo giai đoạn sinh sản	28

DANH MỤC CÁC HÌNH

	Trang
Hình 3.1: Các loại kính hiển vi và tủ ấm CO ₂	14
Hình 3.2: Dao cắt trứng và thao tác cắt trứng.....	15
Hình 3.3: Thao tác mổ cắt buồng trứng	17
Hình 3.4: Phân loại noãn.....	20
Hình 3.5: Sự giãn nở của tế bào cumulus	21
Hình 3.6: Các giai đoạn của nhiễm sắc thể.....	21
Hình 4.1: Buồng trứng của chó nhỏ hơn 5 tháng tuổi.....	23
Hình 4.2: Buồng trứng được lấy ở giai đoạn 1	24
Hình 4.3: Buồng trứng lấy ở giai đoạn 2 và 3.....	24
Hình 4.4: Noãn khi vừa được cắt ra khỏi buồng trứng	24
Hình 4.5: . Noãn sau khi nuôi. (a) giai đoạn 1 ; (b) giai đoạn 2	25
Hình 4.6: Nhuộm noãn. (a) noãn vỡ; (b) Noãn nguyên.....	25

PHẦN 1. MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Ngày nay, khi khoa học về sinh sản đã đạt được những tiến bộ vượt bậc, các kỹ thuật công nghệ sinh học hỗ trợ sinh sản ra đời không những chỉ áp dụng đối với con người mà còn áp dụng cho những động vật quý hiếm.

Các loài chó quý hiếm cũng là đối tượng cho các kỹ thuật này. Sự hoàn thiện của kỹ thuật nuôi chín noãn chó trưởng thành là một điều kiện tiên quyết cho tạo phôi *in vitro* trong các chương trình bảo vệ các loài chó có nguy cơ tuyệt chủng (Bogliolo và cs, 2002). Tuy nhiên, hiệu quả của việc nuôi trứng chín *in vitro* của các loài chó còn rất thấp so với các loài động vật hữu nhũ khác. Điều này làm hạn chế sự phát triển của các kỹ thuật liên quan khác như: tạo phôi, xác định trước giới tính hay kỹ thuật chuyển nhân.

Mặc dù con chó cái mang thai đầu tiên từ kỹ thuật thụ tinh *in vitro* đã được báo cáo bởi Hewitt vào năm 2001, nhưng quy trình nuôi noãn và phôi trên chó vẫn còn nhiều vấn đề chưa thể giải thích được (Gaia và cs, 2004). Một môi trường nuôi cấy noãn *in vitro* cần dựa vào những điều kiện *in vivo* để tạo nên một môi trường tương tự cho sự phát triển sinh lý bình thường của noãn. Nhưng hiện nay các cơ chế điều hòa sự trưởng thành của trứng chó vẫn chưa được hiểu rõ. Trên cơ sở đó, đề tài “Đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố sinh học lên chất lượng noãn chó trong điều kiện nuôi chín *in vitro*” được tiến hành.

1.2. Mục tiêu

Cải tiến qui trình nuôi trứng chín trên chó để góp phần xây dựng hệ thống qui trình nuôi cấy phôi trong điều kiện Việt Nam.

1.3. Yêu cầu

Tiến hành 3 thí nghiệm độc lập nhau để:

- So sánh số lượng và chất lượng noãn thu được bằng phương pháp cắt nhỏ dựa theo tuổi chó.
- Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ trong quy trình giết mổ đến tỉ lệ noãn chín.
- So sánh số lượng và chất lượng noãn thu được bằng phương pháp cắt nhỏ trên chó ở các giai đoạn sinh sản.

PHẦN 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Cấu tạo và chức năng của hệ sinh dục của chó cái

2.1.1. Buồng trứng

Đây là cơ quan sản xuất ra noãn và một số hormone sinh dục. Noãn ở buồng trứng phát triển trong một bao chứa đầy dịch gọi là nang noãn

Buồng trứng của chó cái có dạng hình oval, nằm trong hai túi buồng trứng, ở phía sau thận, khoảng đốt sống lưng thứ 3 - 4, buồng trứng phải nằm cao hơn buồng trứng trái.

Chó cái có trọng lượng 12,5 kg thì buồng trứng có chiều dài 1.5 cm, chiều rộng 0.7 cm và chiều dày 0,5 cm. Kích thước của buồng trứng phụ thuộc vào trọng lượng cơ thể nhưng sự chênh lệch không quá 0,2 cm và kích thước của buồng trứng chó thay đổi qua từng giai đoạn của chu kỳ động dục (Luvoni và cs, 2003).

Chức năng của buồng trứng: vừa là tuyến ngoại tiết sản xuất tế bào sinh dục cái, vừa là tuyến nội tiết tổng hợp và phân tiết estrogen, progesteron, androgen và oxytocin (Charlotte, 2000).

2.1.2. Ống dẫn trứng

Là phần nối giữa buồng trứng với tử cung, phần nối với buồng trứng loe rộng có dạng hình phễu được gọi là vòi Fallope, phần nối với tử cung gọi là vòi tử cung.

Ống dẫn trứng chia làm ba phần: phần phễu, phần rộng, phần eo.

+ Phần phễu hay vòi Fallope tiếp xúc và bao bọc buồng trứng bằng những tua vòi. Vào giai đoạn xuất noãn, phần phễu sẽ bao chặt buồng trứng và di chuyển đến vị trí nang Graff để hứng các noãn bào rụng.

+ Phần rộng ở vị trí 1/3 ống dẫn trứng, nơi đây xảy ra hiện tượng thụ tinh.

+ Phần eo nối tiếp với sừng tử cung có cấu tạo bởi lớp cơ trơn dày giúp di chuyển trứng đã thụ tinh đi về phía sừng tử cung.

Chức năng: là nơi để noãn di chuyển từ buồng trứng đến tử cung. Thời gian di chuyển này khoảng 2 ngày. Ống dẫn trứng còn là nơi để noãn trưởng thành, cũng là nơi hiện tượng thụ tinh xảy ra.

2.1.3. Tử cung

Tử cung chó có dạng hình chữ Y cấu tạo gồm: hai sừng, thân và cổ tử cung. Thân tử cung định vị ở mặt dưới của bàng quang, một phần nằm trong xoang bụng, một phần nằm trong xoang chậu. Kích thước của tử cung rất thay đổi, tùy thuộc nhiều vào trọng lượng của chó cái, số lần mang thai, tình trạng viêm nhiễm của tử cung và các giai đoạn của sự mang thai. Một con chó cái nặng 12,5 kg có chiều dài phần sừng tử cung từ 10 - 15 cm, chiều dài phần thân tử cung từ 1,4 - 3 cm, có đường kính cổ tử cung là 0,8 cm [25].

- Sừng tử cung là phần nối giữa ống dẫn trứng và thân tử cung, nó nằm hoàn toàn trong xoang bụng, sừng bên phải thường dài hơn sừng bên trái.

- Thân tử cung là phần nối giữa sừng tử cung và âm đạo thông qua cổ tử cung.

Chức năng của tử cung:

- + Tiếp nhận tinh trùng của chó đực.
- + Vận chuyển tinh trùng đến ống dẫn trứng.
- + Cung cấp môi trường thuận lợi cho sự định vị và phát triển của phôi thai trong suốt giai đoạn mang thai.
- + Bảo vệ và tổng bào thai ra ngoài.

2.1.4. Cổ tử cung

Cấu trúc này như một cái vòi hẹp nối tử cung với âm đạo.

Chức năng: suốt thời kỳ mang thai, cổ tử cung rất gần với lỗ ra của đường sinh dục. Nó có chức năng như một rào cản chống lại sự xâm nhập của vi sinh vật vào tử cung.

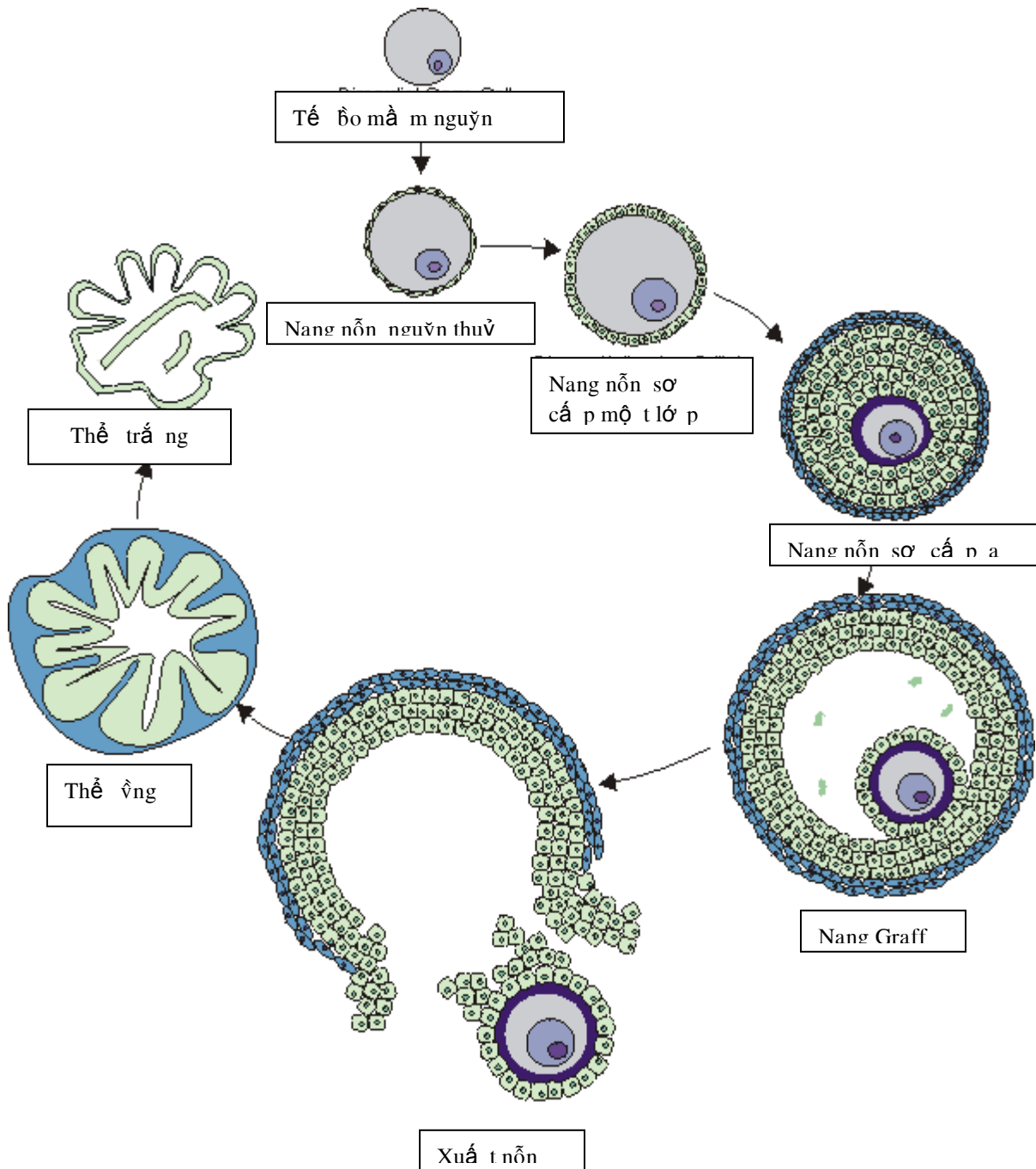
2.1.5. Âm đạo

Cơ quan rỗng này kéo dài từ cổ tử cung tới âm hộ, nằm hoàn toàn trong xoang chậu. Lớp lót bên trong của âm đạo được cấu thành từ những tế bào thay đổi đặc biệt suốt chu kỳ động dục.

Chức năng: tiếp nhận dương vật chó đực trong quá trình giao phối và là đường tiếp dẫn thú con sinh ra.

2.2. Quá trình trưởng thành và phát triển của tế bào noãn

2.2.1. Quá trình trưởng thành của nang noãn



Hình 2.1. Quá trình phát triển của nang noãn
 (Nguồn: www.wisc.edu/.../lec/lec1/female - hist.html)

Trong suốt quá trình hình thành phôi, tế bào mầm nguyên thủy phát triển từ trung bì ở túi niệu, định vị tại buồng trứng, sau đó tăng lên về số lượng và biệt hóa thành nang noãn nguyên thủy. Nang noãn nguyên thủy ngừng phát triển đến giai đoạn cơ thể thành thực về mặt sinh dục. Vào đầu chu kỳ động dục, nang noãn nguyên thủy phát triển thành nang noãn sơ cấp. Dưới ảnh hưởng của gonadotropin và các hormone buồng trứng, nang noãn phát triển thành nang Graff, một số nang không phát triển trở thành nang noãn tịt. Khi nang Graff xuất noãn, noãn và một số tế bào hạt rơi vào màng bụng, trong khi các tế bào hạt còn lại vẫn ở trong buồng trứng. Các tế bào này và lớp tế bào vỏ sau đó phát triển thành thể vàng.

2.2.2. Nội tiết của nang tăng trưởng

Sự tăng trưởng, thành thực, rụng trứng và lutein hóa của nang Graff phụ thuộc vào các yếu tố: kiểu chế tiết thích hợp, hàm lượng đủ và tỉ lệ phù hợp của FSH và LH trong huyết thanh. Những hormone này gồm các steroid, các prostaglandin, các glycoprotein (những phức hợp của axit sialic và polypeptid chuỗi kép) và tất cả chúng đều được chế tiết từ những tế bào B của tiền yên.

FSH giữ vai trò chủ đạo cho việc khởi đầu sự hình thành xoang nang. Gonadotropin này kích thích quá trình phân bào nguyên nhiễm của tế bào hạt và quá trình hình thành dịch nang. Estradiol thúc đẩy tác dụng phân bào nguyên nhiễm của FSH. FSH kích thích những tế bào hạt thông qua các thể tiếp nhận màng, mà số lượng thể tiếp nhận của mỗi tế bào được duy trì ổn định trong giai đoạn tăng trưởng của nang.

Ngoài ra FSH làm tăng khả năng cảm ứng của tế bào hạt đối với LH bằng cách tăng số lượng các thể tiếp nhận LH. Ở heo, các thể tiếp nhận LH tăng từ 300 (trong các nang bé) lên 10000 (trong các nang lớn trước lúc rụng trứng). Việc tăng thể tiếp nhận LH như vậy chuẩn bị cho quá trình lutein hoá của các tế bào hạt trong việc đáp ứng sóng gây rụng trứng của LH.

Mặt khác các tế bào vỏ được kích thích chỉ bằng LH và những thể tiếp nhận LH hiện diện từ lúc bắt đầu hình thành tế bào vỏ. Ở heo cái, số lượng các thể tiếp nhận trên mỗi tế bào vỏ chỉ tăng lên gấp đôi vào cuối kỳ tăng trưởng của nang.

2.2.3. Sự trưởng thành của noãn

2.2.3.1. Trưởng thành nhân

Trưởng thành nhân là quá trình nhân của noãn phát triển từ giai đoạn túi mầm (GV) sang giai đoạn metaphase II. Trưởng thành nhân liên quan đến vỡ túi mầm (GVBD), nhiễm sắc thể cô đặc, sự hình thành thể thoi metaphase I (M I), sự phân ly nhiễm sắc thể đồng dạng với sự xuất hiện thể cực thứ nhất và ngừng lại ở giai đoạn metaphase II (M II) (Kubelka và cs, 2002). Màng nhân bắt đầu cuộn lại, lõi nhân biến mất và sau đó màng nhân vỡ ra từng mảnh và biến mất nhanh chóng. Thời gian cần thiết cho noãn bò hoàn thành quá trình trưởng thành nhân là 24 giờ. Thời gian trưởng thành nhân *in vivo* và *in vitro* là như nhau. Trưởng thành nhân liên quan đến những thay đổi trong khuôn mẫu tổng hợp protein. Noãn bò trải qua những biến đổi trong khuôn mẫu tổng hợp protein sau GVBD *in vitro* và *in vivo*, trong khi noãn ở giai đoạn GV có khuôn mẫu tổng hợp protein cố định.

2.2.3.2. Trưởng thành tế bào chất

Sự trưởng thành tế bào chất bao gồm cả sự thay đổi cấu trúc trong noãn từ giai đoạn GV sang MII và khả năng phát triển của noãn khi đạt giảm phân. Sự trưởng thành tế bào chất là yếu tố gián tiếp quyết định khả năng phát triển của noãn để có thể xảy ra hiện tượng thụ tinh bình thường, phân chia và phát triển tới phôi nang (blastocyst). Các thông số hình thái để đánh giá sự trưởng thành tế bào chất bao gồm sự giãn nở của tế bào hạt, xuất hiện thể cực thứ nhất và gia tăng khoảng không gian bao quanh noãn.

2.3. IVM (*In vitro maturation*)

2.3.1. Lịch sử IVM

Năm 1935, Pincus và Enzmann tách noãn thô chưa trưởng thành khỏi sự ức chế của nang noãn, cho phép noãn đạt tới trưởng thành khi nuôi cấy *in vitro*.

Năm 1983, Minato và Toyoda (Nhật) và Schroeder và Eppig (Mỹ) cho rằng noãn chuột được trưởng thành *in vitro* có khả năng tạo phôi nếu được thụ tinh.

Năm 1983, Lenz và cộng sự cho rằng 39°C là nhiệt độ tối ưu để noãn bò trưởng thành *in vitro*.

Năm 1988, Lu và cộng sự cho ra đời con bê từ kỹ thuật chín noãn và thụ tinh *in vitro*.

Năm 1996, Eppig và O'Brien cho ra đời chuột con sau khi dùng kỹ thuật IVM, thụ tinh *in vitro* và chuyển phôi vào tử cung chuột mẹ.

2.3.2. Hệ thống môi trường sử dụng trong nuôi noãn chó *in vitro*

2.3.2.1. Môi trường nang noãn

Sự duy trì cấu trúc 3 chiều của nang noãn cho phép bảo toàn chức năng và sự nguyên vẹn về mặt hình thái của những thành phần duy trì sự phát triển của noãn và sự trưởng thành *in vivo*. Bolamba và cs (1998) đánh giá sự trưởng thành nhân của noãn chó được lấy từ những nang nuôi cấy *in vitro* trong các đĩa nuôi cấy bằng nhựa phủ 0.6% agar tinh sạch để ngăn chặn sự mất mát của tế bào hạt. Kết quả đạt được cao nhất của quá trình từ MI đến MII xảy ra khi noãn được nuôi cấy trong 48 giờ trong những nang noãn ở giai đoạn tiền nang (11.5%) hay đầu giai đoạn xoang nang (8.7%). Nguyên nhân gây nên tỉ lệ thành công thấp này là do sự phân tách làm gián đoạn sự trao đổi sinh lý của những yếu tố bên trong nang noãn, điều này làm giảm khả năng hỗ trợ của nang noãn lên quá trình giảm phân của noãn.

2.3.2.2. Môi trường giọt

Hệ thống nuôi cấy phổ biến này thích hợp cho sự trưởng thành của noãn ở rất nhiều loài khác nhau, bao gồm các loài chó thuần hóa. Đây là một hệ thống các giọt môi trường được phủ bằng dầu khoáng. Trong hệ thống này, các yếu tố sinh hoá chính được đặc trưng bằng tỉ lệ thể tích của môi trường và số noãn nuôi cấy trong một giọt.

Quá nhiều noãn nuôi cấy trong một giọt nhỏ sẽ ức chế sự giảm phân. Ngoài ra, các chất do tế bào hạt tự tiết ra cũng là tác nhân ức chế sự giảm phân. Các yếu tố này có lẽ ức chế sự tách riêng ra của các vùng kết nối trên màng tế bào, do đó ngăn chặn noãn trải qua giai đoạn vỡ túi mầm (GVBD). Tóm lại, chính sự gián đoạn liên hệ giữa noãn và tế bào hạt đã ảnh hưởng đến sự giảm phân (Isobe và cs, 2001).

Noãn chó được nuôi cấy trong những thể tích môi trường khác nhau với mật độ khác nhau (số noãn : thể tích môi trường). Số liệu duy nhất liên quan đến sự tác động của mật độ noãn lên sự giảm phân được báo cáo bởi Otoi và cộng sự [36]. Kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng ảnh hưởng của mật độ noãn khác nhau tùy thuộc vào chu kỳ động dục của chó cái. Khi 10 phức hợp noãn_tế bào hạt (COC) lấy từ buồng trứng của chó ở giai đoạn nghỉ ngơi được nuôi cấy trong giọt 100 μ l, tỉ lệ noãn đạt MII cao hơn có ý nghĩa về mặt thống kê so với các nhóm 5 COC (10,2% so với 4.6%). Nhưng không có

sự khác biệt giữa các noãn lấy từ buồng trứng của chó ở giai đoạn sau động dục. Mật độ noãn phù hợp liên quan đến chu kỳ động dục của chó cái (tỉ lệ này ở giai đoạn nghỉ ngơi là 1:10, ở giai đoạn sau động dục là 1:7). Điều này có thể chứng minh rằng số lượng và ảnh hưởng của tế bào cumulus khác biệt giữa hai phase của chu kỳ động dục.

2.3.2.3. Môi trường tế bào một lớp

Tác động có lợi của môi trường đồng nuôi cấy lên sự phát triển của phôi đã được biết rõ từ sự sản xuất tạo phôi bò *in vitro* (Gordon, 1994)..

Trên chó, Otoi sử dụng hệ thống tế bào hạt của bò với môi trường nuôi cấy phôi trong IVM . Tỉ lệ noãn đạt MII tăng nhưng không tác động lên sự phát triển kế tiếp sau quá trình thụ tinh *in vitro*.

Hệ thống đồng nuôi cấy với tế bào ống dẫn trứng chó đơn lớp lần đầu tiên đã được thử nghiệm trong IVM trên chó bởi Hewitt và England, 1999. Kết quả chỉ ra rằng tế bào ống dẫn trứng đã không có tác động tích cực nào lên sự trưởng thành nhân sau 48 giờ đồng nuôi cấy. Chỉ sau 96 giờ, có một sự cải thiện nhỏ lên quá trình giảm phân. Gần đây Bogliolo và cs (2002) chứng minh rằng môi trường đồng nuôi cấy với tế bào ống dẫn trứng lấy từ vùng nang của chó cái ở giai đoạn động dục có tác động tích cực lên tỉ lệ trứng chín (MII). Tỉ lệ này đạt 16,7% (sau 48 giờ) và 23,2% (sau 72 giờ). Trong trường hợp này, có lẽ tình trạng của chu kỳ động dục và những vùng trên ống dẫn trứng (nơi lấy các tế bào để nuôi cấy) có tác dụng quyết định.

Môi trường đồng nuôi cấy noãn chó trên tế bào ống dẫn trứng đơn lớp là một nỗ lực để tạo các điều kiện sinh lý cho quá trình giảm phân. Tuy nhiên, mô hình này vẫn còn khác biệt so với môi trường ống dẫn trứng *in vivo* bởi vì trên chó có vài đặc tính riêng biệt có ích trong việc hỗ trợ sự trưởng thành và kéo dài khả năng phát triển của noãn.

2.3.2.4. Môi trường ống dẫn trứng tách biệt

Ống dẫn trứng tách biệt có lẽ cung cấp môi trường *in vitro* với những đặc điểm khác với tế bào ống dẫn trứng đơn lớp. Thực vậy, các tế bào được nuôi cấy đặc trưng bởi một số loại tế bào giới hạn (Hewitt và England, 1999), trong khi đó, trong ống dẫn trứng tách biệt, tất cả các loại tế bào đều hiện diện và có lẽ chúng được duy trì trong cùng tình trạng biệt hóa như trong cơ thể sống. Một lợi thế khác của hệ thống nuôi cấy này là sự bảo toàn cấu trúc không gian và sự tương tác giữa lớp niêm mạc và noãn. Điều

này tạo ra một vi môi trường khác với nuôi cấy trên tế bào đơn lớp hay trên môi trường giọt.

Luvoni và cs (2003) chứng minh rằng nuôi cấy noãn trong vùng eo-nang của ống dẫn trứng có ảnh hưởng tích cực lên sự sống sót của noãn và quá trình trưởng thành nhân có được trong vòng 30 giờ nuôi cấy, kết quả quá trình giảm phân (MI→MII) đạt từ 12,5 - 31,9%. Hệ thống này khó thực hiện trong thực tế. Tuy nhiên ống dẫn trứng tách biệt, bên cạnh sự hiện diện của tế bào ống dẫn trứng, có thể còn cung cấp chất tiết và các yếu tố khác (như nguyên liệu dinh dưỡng năng lượng hay các yếu tố khác) liên quan đến sự trưởng thành và khả năng sống sót của noãn chỏ.

2.3.3. Môi trường sinh hóa cho sự trưởng thành *in vitro* của noãn chỏ

2.3.3.1. Môi trường nuôi cấy

- Môi trường đơn giản: gồm dung dịch nước muối sinh lý và nguồn năng lượng như pyruvate, lactate và glucose.

- Môi trường phức tạp: là môi trường chứa thêm hỗn hợp amino acid, vitamin và các phân tử khác.

So sánh giữa môi trường đơn giản và môi trường phức tạp đối với sự trưởng thành của noãn chỏ đã không được báo cáo. Nhưng trong các môi trường phức tạp, TCM199 là môi trường tốt nhất hỗ trợ sự trưởng thành nhân của noãn chỏ.

2.3.3.2. Các chất bổ sung vào môi trường

Hormone

Sự cung cấp các chất ngoại bào rất cần thiết cho noãn chỏ để tiếp nhận các yếu tố của ống dẫn trứng, giúp cho quá trình giảm phân và trưởng thành của noãn. Thực vậy, ảnh hưởng của hormone trong nang noãn có lẽ là nhân tố chính giúp noãn đạt giảm phân ở giai đoạn MII rất cao (31,9%) khi lấy noãn ở chỏ cái đa xuất noãn (Yamada và cs, 1993).

Ở nhiều loài, người ta chứng minh rằng FSH giúp cho quá trình giảm phân *in vitro* bằng cách điều hoà mức độ cAMP trong phức hợp COC. Ngoài ra, FSH còn giúp quá trình giãn nở của tế bào cumulus, một trong những yếu tố liên quan đến khả năng giảm phân của noãn.

Nhưng trái lại, khả năng trưởng thành của noãn chó không liên quan đến mức độ giãn nở của tế bào cumulus. Sự hiện diện của gonadotropin (FSH/LH 1 μ g/ml kết hợp hoặc riêng lẻ) đã không làm tăng tỉ lệ giảm phân (Hewitt và England, 1999).

Nguồn protein

Huyết thanh bò mang thai (FBS) chỉ hỗ trợ khả năng phát triển của noãn chó in vitro khi thêm với nồng độ trên 10%, nhưng lại không giúp cho quá trình giảm phân (Hewitt và cs,1998).

Chất cung cấp năng lượng và chất chống oxy hoá

Sự sống sót của tế bào trong môi trường nuôi cấy đòi hỏi phải cung cấp một nguồn năng lượng thích hợp, nhưng tỉ lệ kết hợp tối ưu giữa các chất cung cấp năng lượng hỗ trợ cho quá trình giảm phân của noãn chó vẫn chưa được hiểu rõ.

Để ngăn chặn sự oxy hoá xảy ra trong quá trình nuôi cấy, các hợp chất chống oxy hoá cần được thêm vào môi trường. Beta-mercaptoethanol (β ME), một tiền chất của glutathione - hợp chất chống oxy hoá trong tự nhiên - tổng hợp bởi tế bào sống được thêm vào môi trường nuôi noãn. Sự hiện diện của β ME làm gia tăng tổng hợp glutathione và làm tăng tỉ lệ chín của noãn bò. Tuy nhiên, báo cáo duy nhất trên noãn chó cho thấy hợp chất chống oxy hoá này đã không làm tăng tỉ lệ giảm phân (Hewitt và cs, 1998).

Các hợp chất khác

Khi noãn bị phóng thích khỏi nang noãn, sự dịch mã dừng lại. Do đó, duy trì noãn bò trong tình trạng ngừng giảm phân bằng cách nuôi chúng trong chất ức chế giảm phân cho phép noãn hoàn thành quá trình dịch mã và trải qua quá trình biến đổi siêu cấu trúc. Điều này sẽ làm tăng tỉ lệ noãn chín sau khi noãn được đưa ra khỏi tình trạng ngừng giảm phân và nuôi cấy trong môi trường bình thường.

Dựa trên sự khám phá này, cơ chế tương tự đã được áp dụng cho noãn chó. Một chất tương tự như cAMP, ditutylryl cyclic adenosin monophosphate (dbcAMP) được sử dụng để duy trì noãn trong tình trạng ngừng giảm phân. Quá trình giảm phân của

noãn bị chặn lại. Tuy nhiên, nuôi cấy 2 bước (24 giờ với dbcAMP) và 48 giờ không có dbcAMP) đã không tăng tỉ lệ trứng đạt MII.

2.3.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến IVM

2.3.4.1. Thời gian

Thời gian cần thiết cho sự trưởng thành noãn in vitro ở loài chó vẫn còn là một câu hỏi chưa lời giải đáp. Vài tác giả báo cáo rằng quá trình trưởng thành đầy đủ của noãn xảy ra sau 24 - 48 giờ nuôi cấy trong khi một số nhà khoa học khác lại chỉ định rằng thời gian để đạt tỉ lệ noãn trưởng thành cao nhất là 72 - 96 giờ.

2.3.4.2. Chất lượng noãn và kích thước nang noãn

Theo Sorrensen và Wassaman, 1976, nang noãn nguyên thủy chứa noãn không có khả năng hỗ trợ quá trình giảm phân và phát triển của phôi. Tỉ lệ noãn có khả năng giảm phân và hỗ trợ quá trình phát triển của phôi tăng dần theo đường kính của noãn .

2.3.4.3. Tuổi và tình trạng sinh dục chó cái

Hewitt và England (1998) so sánh noãn chó từ 2 nhóm tuổi : từ 1 - 6 tuổi và trên 7 tuổi. Kết quả chứng minh rằng noãn từ các chó từ 1 - 6 tuổi đạt tỉ lệ trưởng thành nhiều hơn nhóm thứ hai.

Nghiên cứu của Rodrigues D.A và Rodrigues JL (2003) cho thấy rằng kết quả IVM trên noãn chó không ảnh hưởng bởi tình trạng sinh dục của chó cái. Chất lượng của noãn là yếu tố cần thiết trong IVM hơn là môi trường hormone của chó cái tại thời điểm thu nhận noãn.

2.3.4.4. Nồng độ oxy và nhiệt độ

Nồng độ oxy ảnh hưởng đến sự trưởng thành nhân của noãn chuột và bò. Vài tài liệu chứng minh rằng mức oxy 5% thích hợp hơn mức oxy bình thường trong không khí (20%) (Gordon, 2004).

Dữ liệu liên quan đến nồng độ oxy trong nuôi cấy noãn chó chỉ ra rằng mức oxy 5% hoặc 20% trong môi trường TCM199 hay CMRL 1066 đã không ảnh hưởng đến sự trưởng thành của nhân (Sorensen và Wassaman, 1976).

Về nhiệt độ, noãn chó đã được nuôi cấy trong khoảng nhiệt độ từ 37 - 39⁰C, nhưng không có bất cứ số liệu nào so sánh sự khác biệt giữa nhiệt độ trong tủ nuôi cấy.

PHẦN 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

3.1. Thời gian và địa điểm thực hiện

Thời gian: từ 6/2/2006 đến 18/6/2006.

Địa điểm: phòng thí nghiệm Sinh Lý Sinh Hoá, phòng Nuôi Cây Mô Tế Bào, khoa Chăn Nuôi Thú Y và trung tâm Phân Tích Thí Nghiệm Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM.

3.2. Nội dung khảo sát

- So sánh số lượng và chất lượng noãn thu được bằng phương pháp cắt nhỏ dựa theo tuổi chó.

- Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ trong quy trình giết mổ đến tỉ lệ noãn chín.

- So sánh số lượng và chất lượng noãn thu được bằng phương pháp cắt nhỏ trên chó ở các giai đoạn sinh sản.

3.3. Vật liệu

3.3.1. Vật liệu

Buồng trứng chó từ chó ở lò mổ.

3.3.2. Hóa chất

3.3.2.1. Môi trường nuôi noãn

TCM199	9,5g/l
HEPES	25mM/ml
FBS	10%
Gentamycin	50 µg/ml
NaHCO ₃	2.2 mg/ml
Pyruvic acid	22 µg/ml
Estradiol	1 µg/ml
FSH	0.5 µg/ml
hCG	0.03 UI/ml

3.3.2.2. Môi trường rửa noãn PBS-PVA

Nước cất	100 ml
NaCl	800 mg
KCl	20 mg
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	290 mg
KH ₂ PO ₄	20mg
Polyvinyl alcohol (PVA)	100 mg

PVA được pha riêng với nước cất, gia nhiệt khoảng 70⁰C đến khi PVA tan hết trong nước. Sau đó pha chung với các thành phần còn lại.

3.3.2.3. Các hóa chất nhuộm noãn

Ethanol tuyệt đối
Acetic acid
Acetol
Glycerine
Orcein.

3.3.3. Thiết bị

Kính hiển vi đảo ngược (Olympus)
Kính hiển vi soi nổi (Nikon SMZ800)
Tủ ẩm CO₂
Tủ thao tác vô trùng



Hình 3.1. Các loại kính hiển vi và tủ ẩm CO₂

3.3.4. Dụng cụ

Bình giữ nhiệt

Bộ ổn nhiệt

Dao cắt mẫu nhiều lưỡi (dao được ghép từ nhiều mảnh dao lam xếp song song nhau, được gắn trên một cán bằng kim loại).

Kéo các loại

Khay

Becher 500 ml

Găng tay

Lọ cồn

Kẹp

Đầu tip các loại

Pipette Pasteur vô trùng

Micropipette

Màng lọc (0,2 μ m)

Đĩa petri nhựa (35 x 10 mm)

Đĩa petri thủy tinh

Lame và lamel



Hình 3.2. Dao cắt trứng và thao tác cắt trứng

3.4. Phương pháp tiến hành

3.4.1. Thu nhận buồng trứng tại lò mổ

Thí nghiệm 1: ảnh hưởng của tuổi chó đến số lượng và chất lượng noãn thu được
Thí nghiệm được bố trí trên 2 lô (13 chó cái nhỏ hơn 5 tháng tuổi và 42 chó lớn hơn 5 tháng tuổi) theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố với chỉ tiêu thống kê là số noãn thu được.

3.4.1.1. Xác định tuổi chó

Tuổi của chó có thể ảnh hưởng đến số lượng, chất lượng noãn. Do đó, có thể ảnh hưởng đến kết quả IVM. Chó nhỏ hơn 5 tháng tuổi, mặc dù buồng trứng đã phát triển

nhưng kích thước còn rất nhỏ. Do đó chúng tôi phân loại chó nhỏ hơn 5 tháng tuổi và chó lớn hơn 5 tháng tuổi .

Vì mẫu được lấy ở lò mổ, không thể biết được nguồn gốc nên việc đoán tuổi chó được dựa vào hình dạng của răng .

Công thức răng:

- Răng sữa: $2(3/3\text{cửa } 1/1\text{nanh } 3/3) = 28$

- Răng vĩnh viễn: $2(3/3\text{cửa } 1/1\text{nanh } 4/4 \text{ } 2/3\text{hàm}) = 42$

Bảng 3.1. Thời gian mọc răng của chó

Răng	Thời gian
Răng cửa sữa 1	4 – 5 tuần
Răng cửa sữa 2	4 – 5 tuần
Răng cửa sữa 3	5 – 6 tuần
Răng cửa 1	2 – 5 tháng
Răng cửa 2	2 – 5 tháng
Răng cửa 3	4 – 5 tháng
Răng nanh sữa	3 – 4 tuần
Răng nanh	5 – 6 tháng
Dp 2	4 – 6 tuần
Dp 3	4 – 6 tuần
Dp 4	6 – 8 tuần
P 1	4 – 5 tháng
P 2	5 – 6 tháng
P 3	5 – 6 tháng
P 4	4 – 5 tháng
Răng hàm 1	5 – 6 tháng
Răng hàm 2	6 – 7 tháng
Răng hàm 3	6 – 7 tháng

Hình dáng răng :

- 1 $\frac{1}{2}$ năm : đỉnh răng cửa dưới 1 mòn.
- 2 $\frac{1}{2}$ năm: đỉnh răng cửa dưới 2 mòn.

(Nguồn: The Merck Veterinary manual).

(<http://www.merkvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/20302.htm>).

Dựa vào độ tuổi của chó, tiến hành thí nghiệm 1.

3.4.1.2. Thao tác mổ buồng trứng

Đặt chó nằm ngửa, xác định vị trí cần mổ (từ rốn kéo dài xuống về phía đuôi khoảng 5 cm), dùng cồn sát trùng xung quanh vị trí đó. Sau đó, mổ một đường nhỏ ở giữa bụng, dùng ngón trỏ và ngón giữa tìm vị trí của buồng trứng. Buồng trứng nằm phía dưới thận, được kết nối bởi mô liên kết. Do kích thước buồng trứng rất nhỏ, khó phát hiện nên khi mổ ta tìm vị trí của thận, cách thận 2 cm về phía đuôi có một hạt nhỏ như hạt đậu, đó chính là buồng trứng.



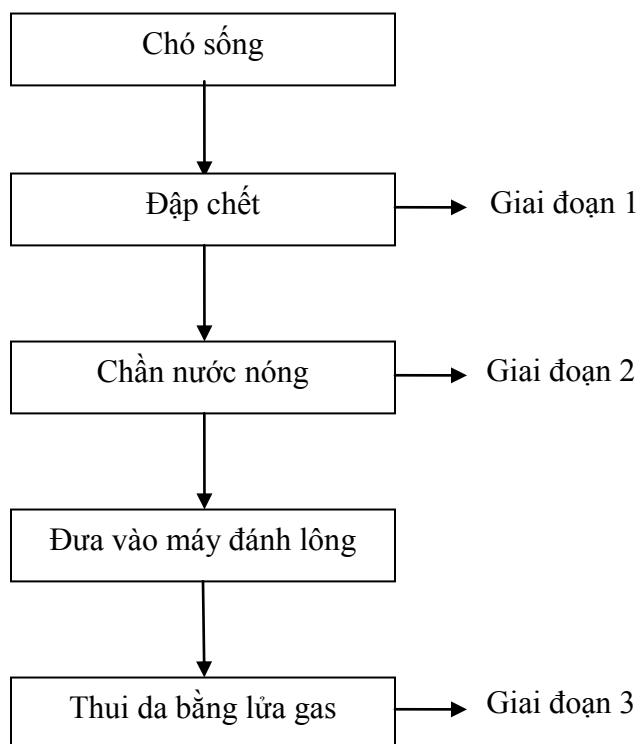
Hình 3.3. Thao tác mổ cắt buồng trứng

3.4.1.3. Thu nhận buồng trứng

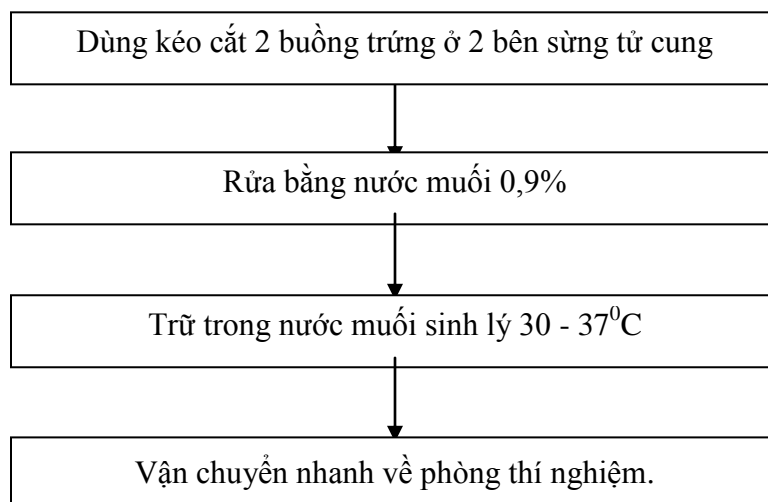
Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên chất lượng noãn và sự chín của noãn.

Thí nghiệm được bố trí trên 2 lô (chó vừa bị đập chết và chó được xử lý nhiệt) theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố, với chỉ tiêu thống kê là hình thái của noãn trước và sau khi nuôi.

Quy trình giết mổ tại lò mổ:



Quy trình thu buồng trứng (Nguyễn Bạch Thảo Vy, 2005)

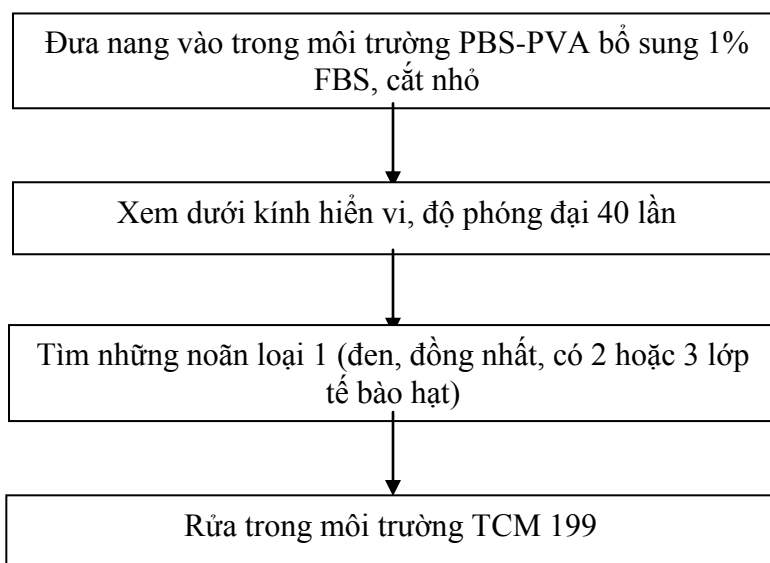


Trong quy trình giết mổ, giai đoạn 2 và 3 có sử dụng nhiệt. Điều này có thể làm ảnh hưởng đến chất lượng noãn thu được và khả năng chín của trứng. Do đó, chúng tôi tiến hành thí nghiệm 2, trong đó, lô 1 gồm 14 chó vừa bị đập chết, lô 2 gồm 12 chó đã qua xử lý nhiệt (đến giai đoạn 3).

3.4.2. Tìm và rửa noãn (theo Rodrigues, 2002)

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của giai đoạn sinh sản lên chất lượng và số lượng của noãn thu hoạch.

Thí nghiệm được bố trí trên 5 lô dựa vào các giai đoạn sinh sản theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố với chỉ tiêu thống kê là hình thái của noãn khi được tách ra khỏi buồng trứng.



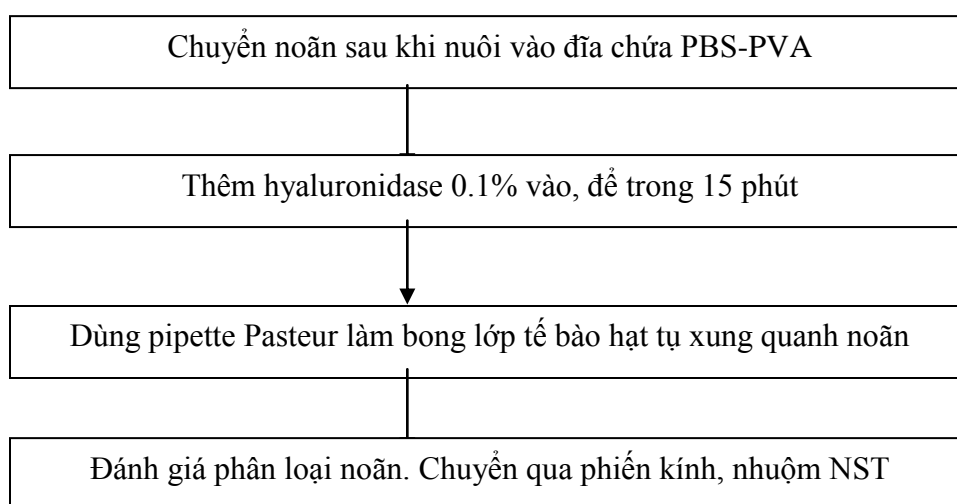
Hình dạng và kích thước buồng trứng ở các giai đoạn của chu kỳ động dục rất khác biệt nhau. Giai đoạn thể vàng, buồng trứng rất to nhưng nang noãn không hiện rõ. Giai đoạn xoang nang, kích thước buồng trứng trung bình nhưng nang noãn lại lộ rõ. Giai đoạn nghỉ ngơi, kích thước buồng trứng nhỏ nhất. Ngoài ra, chó được giết mổ còn ở giai đoạn mang thai hoặc nuôi con. Dựa vào sự khác biệt về giai đoạn sinh sản của chó, chúng

tôi tiến hành thí nghiệm 3, bao gồm 17 chó có xoang nang ở buồng trứng, 8 chó có thể vàng động dục ở buồng trứng, 5 chó ở giai đoạn nghỉ ngơi, 8 chó mang thai và 5 chó nuôi con

3.4.3. Nuôi noãn

Chuyển các noãn sau khi rửa vào môi trường nuôi noãn chín, nuôi ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ trong 72 giờ.

3.4.4. Thu nhận noãn sau khi nuôi (Nguyễn Bạch Thảo Vy, 2005)



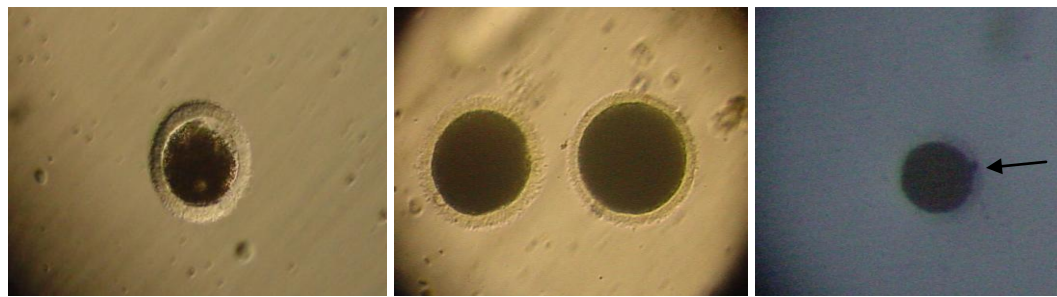
3.4.5. Đánh giá phân loại noãn

Noãn được phân loại, đánh giá sau khi nuôi 72 giờ.

Noãn được phân thành 3 loại: noãn xấu, noãn tốt và noãn chín.

Bảng 3.2. Phân loại noãn

Noãn xấu	Noãn tốt	Noãn chín
<ul style="list-style-type: none"> - Gồm những noãn thoái hoá - Tế bào chất không đồng nhất, bị co cụm hay phân tán - Không xuất hiện thể cực thứ nhất 	<ul style="list-style-type: none"> - Là các noãn chưa chín - Tế bào chất đồng nhất, chiếm hết xoang tế bào - Không xuất hiện thể cực thứ nhất 	<ul style="list-style-type: none"> - Là các noãn trưởng thành - Tế bào chất đồng nhất - Có sự xuất hiện thể cực thứ nhất



(a) Noãn xấu

(b) Noãn tốt

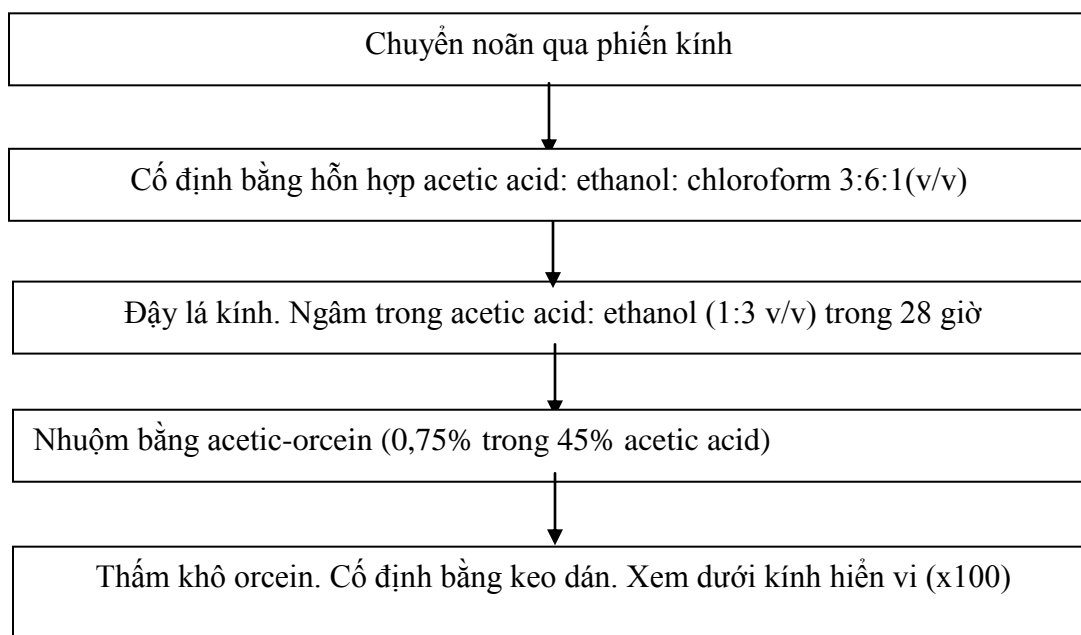
(c) Noãn chín

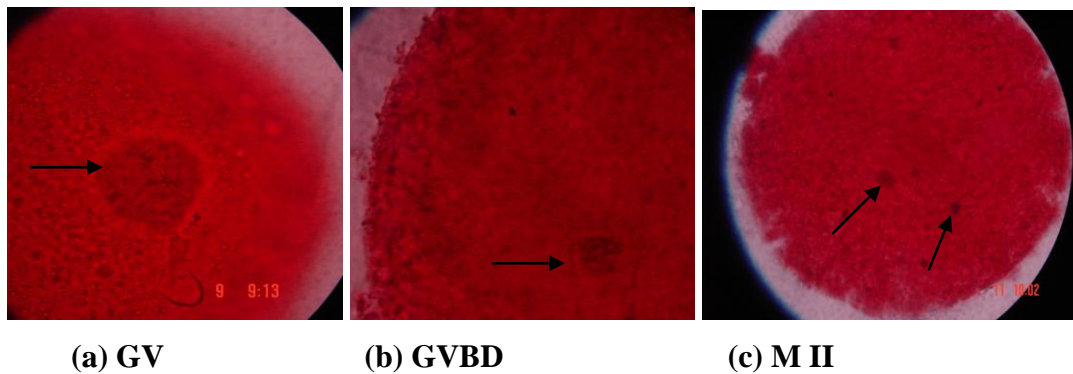
Hình 3.4. Phân loại noãn

Các noãn có tế bào cumulus giãn nở và tế bào chất đồng nhất là những noãn tốt và noãn chín.

**Hình 3.5. Sự giãn nở của tế bào cumulus**

3.4.6. Nhuộm noãn





Hình 3.6. Các giai đoạn của nhiễm sắc thể

3.5. Xử lý thống kê

Xử lý thống kê bằng trắc nghiệm F ở phần mềm Minitab 12.0.

PHẦN 4. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

4.1. Thí nghiệm 1: ảnh hưởng của tuổi chó đến số lượng noãn thu được

Chó trưởng thành về mặt sinh dục khi đạt 6 – 16 tháng tuổi. Do đó, buồng trứng được lấy ở chó thuộc 2 nhóm độ tuổi khác nhau:

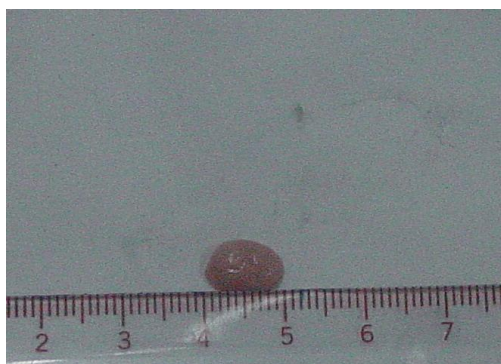
- Chó nhỏ hơn 5 tháng tuổi: chưa thành thực sinh dục.
- Chó lớn hơn 5 tháng tuổi: thành thực về mặt sinh dục.

Bảng 4.1 Số lượng noãn thu được trên mỗi chó theo độ tuổi

Phân loại	Chó nhỏ hơn 5 tháng tuổi	Chó lớn hơn 5 tháng tuổi
Số chó cái	13	42
Số noãn	30	1066
\bar{X}	2,31	25,38
p	0,005	

Số noãn thu được trên mỗi chó cái ở các độ tuổi lớn hơn 5 tháng tuổi và nhỏ hơn 5 tháng tuổi là rất khác biệt nhau về mặt thống kê ($p=0,005$). Trung bình là 25,38 đối với chó lớn hơn 5 tháng tuổi và 2,31 đối với chó nhỏ hơn 5 tháng tuổi.

Vì chó nhỏ hơn 5 tháng tuổi sẽ có kích thước buồng trứng rất nhỏ, nang noãn chưa phát triển, rất khó trong quá trình thao tác cắt noãn. Do đó, sẽ không lấy được noãn, nếu có lấy được thì tỉ lệ noãn lấy được rất thấp và chất lượng không ổn định.



Hình 4.1. Buồng trứng của chó nhỏ hơn 5 tháng tuổi

4.2. Thí nghiệm 2: ảnh hưởng của nhiệt độ trong xoang bụng chó lên chất lượng và sự chín của noãn

Nhiệt độ của nước nóng dùng để chần chó: 60°C .

Nhiệt độ bên trong xoang bụng chó ở các giai đoạn của quá trình giết mổ để lấy mẫu:

- ◆ Giai đoạn 1: 36°C (đập chết chó)
- ◆ Giai đoạn 2: 42°C - 43°C (chần nước nóng)
- ◆ Giai đoạn 3: 42°C - 43°C (thui da bằng lửa gas)

4.2.1. Đặc điểm hình thái của buồng trứng

Giai đoạn 1: Buồng trứng còn rất tươi, có màu vàng trong, thấy rõ nhiều mạch máu



Hình 4.2. Buồng trứng được lấy ở giai đoạn 1 của quy trình giết mổ

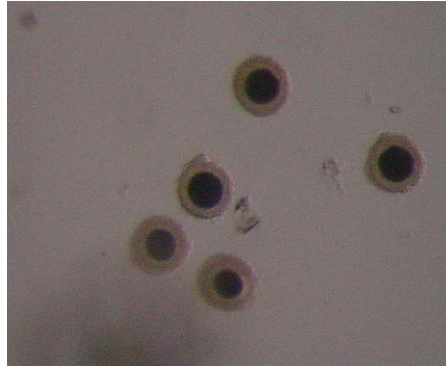
Giai đoạn 2 và 3: Buồng trứng có màu vàng đục, các mạch máu sẫm màu.



Hình 4.3. Buồng trứng lấy ở giai đoạn 2 và 3 của quy trình giết mổ

4.2.2. Đặc điểm hình thái của noãn

Ở tất cả các giai đoạn, không có sự khác biệt của noãn về mặt hình thái, noãn vẫn còn giữ được cấu trúc bình thường, các lớp tế bào cumulus vẫn bám chặt vào noãn

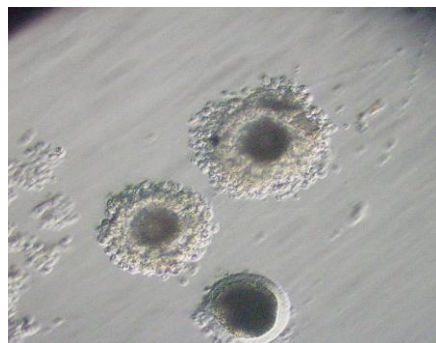


Hình 4.4. Noãn khi vừa được cắt ra khỏi buồng trứng

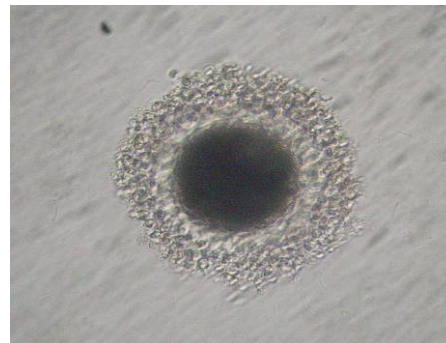
4.2.3. Kết quả IVM

Sự khác biệt giữa noãn được lấy khi giết mổ ở giai đoạn 1 và giai đoạn 2,3 sau khi nuôi cấy 72 giờ:

- Giai đoạn 1: phần lớn các noãn có tế bào chất màu đen, đồng nhất, tế bào cumulus giãn nở nhưng vẫn bám chặt vào noãn. Khi nhuộm noãn vẫn giữ nguyên cấu trúc, không bị vỡ.
- Giai đoạn 2: sau khi nuôi cấy, tế bào cumulus không còn bám vào noãn, tế bào chất không đồng nhất, có màu xám. Một số noãn có tế bào chất co cụm lại, tách khỏi lớp màng trong suốt tạo nên một khe trống. Khi nhuộm noãn bị vỡ, có lẽ do cấu trúc màng tế bào đã bị phá hủy.



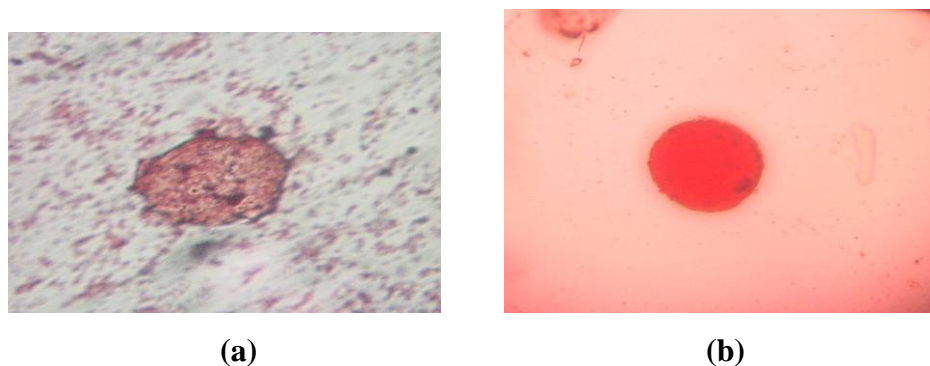
(a)



(b)

Hình 4.5. Noãn sau khi nuôi.

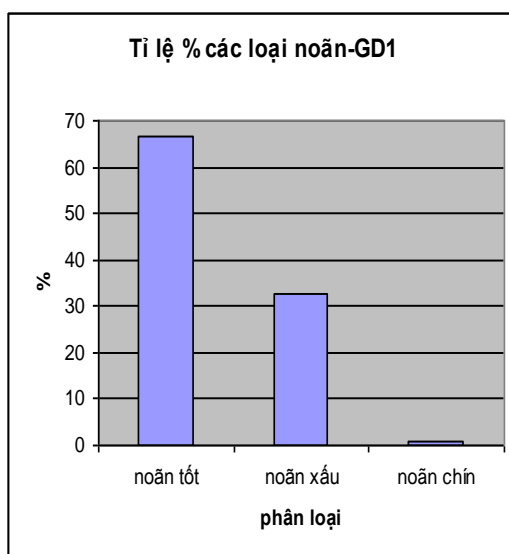
(a) chó giết mổ giai đoạn 1 ; (b) chó giết mổ giai đoạn 2 và 3



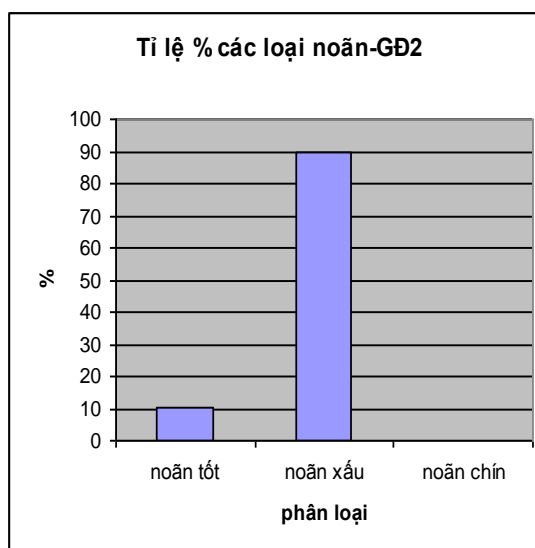
Hình 4.6. Kết quả nhuộm noãn. (a) noãn vỡ; (b) noãn nguyên

Bảng 4.2. Tỷ lệ các loại noãn sau khi nuôi cấy

Giai đoạn	Giai đoạn 1	Giai đoạn 2 và 3
Số đợt thí nghiệm	14	12
Số noãn tốt	266	10
Số noãn xấu	130	89
Số noãn chín	3	0
Tỷ lệ chín	0.75%	0%



(a)



(b)

Biểu đồ 4.1. So sánh tỷ lệ các loại noãn sau khi nuôi

(a) Lấy mẫu giai đoạn 1: chó vừa bị đập chết

(b) Lấy mẫu giai đoạn 2: chó đã bị chân nước nóng và thui

Hầu hết các thí nghiệm về IVM trên thế giới đều lấy mẫu (buồng trứng chó) khi chó còn sống, dùng thủ thuật cắt buồng trứng. Công việc này được thực hiện ở các phòng khám thú y. Một số khác lấy mẫu ở lò mổ, nhưng công việc này được thực hiện ở giai đoạn đầu của quy trình giết mổ. Ở Việt Nam, hầu như mẫu được lấy ở giai đoạn cuối, khi chó đã qua giai đoạn chân nước sôi và thui lửa gas. Chính vì lý do đó, mẫu đã bị giảm chất lượng.

Từ kết quả trên, chúng ta rút ra được một số nhận định:

- Khi chó đã chân nước nóng và được thui bằng lửa gas thì noãn không còn khả năng phát triển. Do đó, không thể sử dụng mẫu ở giai đoạn này để nuôi cấy.

- Chỉ có mẫu được lấy ở giai đoạn 1 (chó vừa bị đập chết) thì noãn mới có khả năng phát triển và đạt metaphase II. Tuy nhiên, tỉ lệ noãn chín (MII) trong nghiên cứu của chúng tôi còn quá thấp (0,75%) so với tỉ lệ của Rodrigue (4.2% - 8.1%) với cùng môi trường nuôi cấy.

Một số lí do có thể gây nên tỉ lệ noãn chín thấp:

- Do môi trường làm việc chưa đạt được điều kiện vô trùng nên rất dễ bị tạp nhiễm trong quá trình thao tác.

- Trên thị trường nước ta, chúng tôi không tìm được ECS, nên đã thay thế bằng FBS. ECS là huyết thanh bò được lấy ở giai đoạn động dục, là giai đoạn chứa những thành phần thiết yếu cho sự phát triển của noãn. Trong khi đó, FBS là huyết thanh bò ở giai đoạn mang thai, tức là giai đoạn ức chế sự phát triển của noãn.

4.3. Thí nghiệm 3: ảnh hưởng của chu kỳ sinh sản lên chất lượng và số lượng noãn thu hoạch

Các nghiên cứu trước đây của Bolamba và cs (1998) chứng minh rằng nang noãn ở giai đoạn xoang nang chứa noãn phát triển với đặc điểm lớp lipid của tế bào chất cô đặc. Theo quan sát của chúng tôi, về mặt hình thái, nang noãn ở giai đoạn xoang nang chứa những đặc điểm đúng như Bolamba đã mô tả. Tuy nhiên, mục tiêu của nội dung nghiên cứu của thí nghiệm 3 không những xét đến chất lượng mà còn lưu ý số lượng noãn thu được.

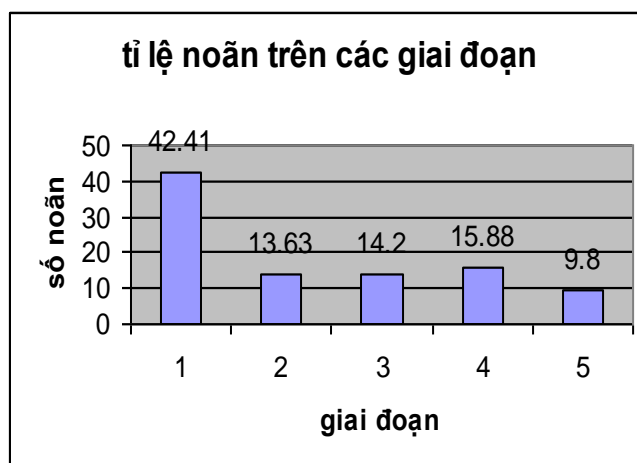
Theo Feldam và Nelson (1996), rất khó xác định chó đang ở giai đoạn động dục, giai đoạn nghỉ ngơi hay giai đoạn mang thai ở những ngày đầu. Do đó, cần dựa vào dấu

hiệu hình thái bên ngoài kết hợp với hình dạng của buồng trứng để biết được giai đoạn sinh sản của chó. Các chó khảo sát trong thí nghiệm 3 được chia làm các giai đoạn sau:

- Giai đoạn buồng trứng có nang noãn với xoang nang (động dục và trước động dục)
- Giai đoạn buồng trứng có thể vàng (sau động dục)
- Giai đoạn nghỉ ngơi
- Mang thai
- Nuôi con

Bảng 4.3 Số lượng noãn thu được trên mỗi chó theo giai đoạn sinh sản

Phân loại chó	Buồng trứng có xoang nang	Buồng trứng có thể vàng sau động dục	Nghỉ ngơi	Mang thai	Nuôi con
Số chó cái	17	8	5	8	5
Số noãn	721	109	71	127	49
\bar{X} (noãn)	42,41	13,63	14,2	15,88	9,8



Biểu đồ 4.2. Số lượng noãn thu được trên mỗi chó theo giai đoạn sinh sản

Kết quả trên ta thấy tỉ lệ noãn thu được ở pha nang noãn cao hơn ở các pha khác ($p=0,002$). Kết quả này trùng khớp với kết quả nghiên cứu của Rodrigues (2003) với số noãn thu được trên mỗi chó cái là 52.8 noãn/chó.

Ở giai đoạn nuôi con, tỉ lệ noãn thu được trên mỗi chó cái là thấp nhất (9,8 noãn). Điều này có lẽ do prolactin có trong sữa đã ức chế sự phát triển của nang noãn.

4.4. Một số kinh nghiệm trong IVM

a. Lấy mẫu

Tỉ lệ noãn lấy được cao nhất ở giai đoạn xoang nang, do đó nên lấy mẫu ở những chó đang giai đoạn trước động dục và động dục với những biểu hiện như sau:

- Giai đoạn trước động dục: chó cái có những dấu hiệu âm hộ sưng đỏ, chảy máu và dịch tiết
- Giai đoạn động dục: âm hộ giảm sưng, trở nên mềm nhẵn da, dịch tiết có màu hồng lợt, hơi dẻo và trong.

Thời kỳ động dục của chó nhiều nhất là vào các tháng 3, 5, 7.

b. Quản lý phòng thí nghiệm

Phòng thí nghiệm và tất cả dụng cụ phải được khử trùng trước khi nuôi cấy.

Dây hút trứng nên được kết nối với đầu lọc vô trùng để tránh sự tạp nhiễm.

Kháng sinh phải được pha ngay trước khi nuôi noãn, không được bổ sung trước vào môi trường vì kháng sinh là hợp chất hữu cơ, rất dễ bị biến tính khi pha chung với các chất khác.

Trong điều kiện phòng thí nghiệm hiện nay, thao tác cắt trứng không thể thực hiện được trong tủ cấy vô trùng nên trong quá trình thao tác, sử dụng ngọn đèn cồn trong quá trình thao tác để hạn chế vấy nhiễm.

c. Nhuộm noãn

Khi nhuộm noãn, không nên cho quá nhiều noãn vào một phiến kính, rất khó kiểm soát trong quá trình thao tác

Noãn chó có rất nhiều lipid nên khi nhuộm noãn, nên có thêm bước loại bỏ lipid bằng hỗn hợp acetic:ethanol:chloroform (3:6:1). Hỗn hợp này cũng có tác dụng cố định noãn, giúp noãn bám chặt vào phiến kính.

PHẦN 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

- Chó lớn hơn 5 tháng tuổi cho số noãn nhiều hơn chó nhỏ hơn 5 tháng tuổi (23,38 noãn/chó so với 2,31 noãn/chó).

- Noãn thu được từ chó vừa đập chết (giai đoạn 1 của quy trình giết mổ) có khả năng được nuôi chín. Trong khi đó, noãn được lấy khi chó bị chân nước sôi hoặc thui da (giai đoạn 2 và 3 của quy trình giết mổ) lại khó có khả năng nuôi chín.

- Chó ở các giai đoạn sinh sản khác nhau cho số lượng noãn thu được khác nhau, cao nhất ở chó có buồng trứng chứa nang noãn có xoang nang

- Tỷ lệ noãn đạt M II đạt 0,75%

5.2. Đề nghị

- Nghiên cứu nuôi noãn trong môi trường đồng nuôi cấy.

- Sử dụng bộ ổn nhiệt trong quá trình thao tác cắt noãn, giữ cho nhiệt độ của noãn luôn đạt 37⁰C.

- Đánh giá ảnh hưởng của các giống chó lên kết quả IVM.

- Sau khi đạt được tỷ lệ noãn chín ổn định, tiến hành IVF.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

[1] Nguyễn Tấn Anh, Nguyễn Quốc Đạt, 1997. *Thụ tinh nhân tạo gia súc-gia cầm*. NXB Nông Nghiệp.

[2] Thái Thị Mỹ Hạnh, 2005. *Khảo sát khả năng khai thác tinh trên chó và khả năng bảo quản của một số môi trường pha chế tinh*. Luận văn thạc sĩ khoa học nông nghiệp, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.

[3] Nguyễn Bạch Thảo Vy, 2005. *Áp dụng quy trình nuôi chín noãn in vitro trên heo và chó*. Khóa luận tốt nghiệp, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.

Tiếng nước ngoài

[4] Bogliolo L., Zedda M.T., Ledda S., Leoni G., Naitana S. and Paul S., 2002. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod. Nutr. Dev* 2002; 42:265 – 73 .

[5] Bolamba D., Borden-Russ K.D. and Durant B.S., 1998. In vitro maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 49: 933 – 942.

[6] Charlotte O., 2000. FRS the female reproduction system: function and histology. html. Histology of female reproduction system. <http://www.cvm.okate.edu>.

[7] Cole H.H. and Cupps, 1959. *Reproduction in domestic animals*. Academic press, New York and London, pp. 342 – 345, 369 – 374.

[8] De la Barre A.E., Gerson V., Gout S., Creaven M., Allis C.D. and Dimitrov S., 2000. Core histone N – termini play an essential role in meiotic chromosome condensation. *EMBOJ*, 19: 379 – 391.

[9] Downs S.M. and Hudson E.D., 2000. Energy substrates and the completion of spontaneous meiotic maturation. *Zygote*, 8: 339 – 351.

[10] Eppig J.J. and Wigglesworth K., 2002. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown *in vitro*: oxygen tension. *Mol. Reprod. Dev.*, 42: 447 – 456.

[11] Fair, T., Hyttel. P, and Greve. T, 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Repro. Dev.*, 42:437-442.

- [12] Fulka J.Jr., Moor R.M., Loi P. and Fulka J., 2003. Enucleolation of porcine oocytes. *Theriogenology*, 59: 179 – 1885.
- [13] Gaia C. Luvoni, Sara Chigioni, Elisa Allievi, Debora Macis, 2004. Factor involved in vivo maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, 63: 41-59.
- [14] Gordon I.,1994.Laboratory production of cattle embryo. Wallingford: Cab international.
- [15] Hewitt DA, Watson PF, England GCW.,1998. Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. 49:1083-101.
- [16] Hewitt DA, Watson PF, England GCW.,1998. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. *Theriogenology*, 49(5):957-66.
- [17] Hewitt DA, England GCW.,1999. Influence of gonadotropin supplementation on the in vitro maturation of bitch oocytes. *Vet Rec*, 144:237-9
- [18] Hewitt DA, England GCW.,1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell co-culture for canine oocyte maturation in vitro. *Anim. Repro. Sci.*, 55:63-75.
- [19] Hirano T. and Mitchison T.J., 1994. A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation *in vitro*. *Cell*, 79: 449 – 458.
- [20] Hong Thuy Bui, Emi Yamaoka and Takashi Miyano, 2004. Involvement of Histone H3 (Ser 10) phosphorylation in chromosome condensation without Cdc2 kinase and mitogen activated protein kinase activation in pig oocytes. *Biol. Reprod.*, 70: 319 – 326.
- [21] Isobe N, Terada T. Effect of factors inhibiting germinal vesicle breakdown on the disruption of gap junctions and cumulus expansion of pig cumulus-oocyte complexes cultured in vitro. *Reproduction*,121:249-57.
- [22] Kubelka M., Anger M., Kalous J., Schults R.M. and Motlik J., 2002. Chromosome condensation in pig oocytes: lack of a requirement for either cdc2 kinase or MAP kinase activity. *Mol. Reprod. Dev.*, 63: 110 – 118.
- [23] Liu X., Andoh K., Yokota H., Kobayashi J., Abe Y. and Yamada K., 1998. Effects of growth hormone, activin and follistatin on the development of preantral follicles from immature female mice. *Endocrinology*, 139: 2342 – 2347.
- [24] Luvoni G.C., Chigioni S., Allievi E. and Macis D., 2003. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod Domest Anim* 2003; 38: 410 – 414.

- [25] Luvoni G.C., Chigioni S., Allievi E., Macis D. and Perego L., 2003. Extension incubation time in a two-step culture system for the maturation of canine oocytes. Proc. 3rd EVSSAR Annual Congress, 123 – 124.
- [26] Mao J., Caamano T.N., Cantely T.C., Farwell R., Rieke, Smith M.F. and Day B.N., 2003. *Effect of follicular size on developmental competence of porcine oocytes in vitro*. American Dairy Science Association. Joint Annual Meeting, USA, [Abstract].
- [27] Masaya Geshi and Naoki Takenouchi, 2000. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 63: 1730 – 1734.
- [28] Masui Y. and Markert C.L., 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, 177: 129 – 145.
- [29] Matton J.S. and Nyland T.G., 1995. Veterinary diagnostic ultrasound. 2nd edition, W.B. Saunders Company, USA. Chapter 10. pp 130-151.
- [30] Mc Natty K.P., Fidler A.E., Juengel J.L., Quirke L.D., Smith P.R. and Heath D.A., 2000. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol. Cell Endocrinol*, 163: 11 – 20.
- [31] Min Kyu Kim, Yuda Heru Fibrianto, Hyun Ju Oh, Goo Jang, Hye Jin Kim, Kyu Seung Lee, Sung Keun Kang, Byeong Chun Lee and Woo Suk Hwang, 2004. Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on in vitro maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. *J. Vet. Sci.*, 5(3): 253 – 258.
- [32] Min Kyu Kim, Yuda Heru Fibrianto, Hyun Ju Oh, Goo Jang, Hye Jin Kim, Kyu Seung Lee, Sung Keun Kang, Byeong Chun Lee and Woo Suk Hwang, 2005. Effects of estradiol-17 β and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63 [Abstract].
- [33] Kane M.T, 2003. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. *Animal Reprod. Sci.*, 79: 171 – 190.
- [34] Nickson D.A., Boyd J.S., Eckersall P.D., Ferguson J.M., Harvey M.J.A., Renton J.P., Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and invitro fertilization in bitch, *J. Repro. Fertil. Suppl.* 47 (1993) 231-240.
- [35] Otoi T., Fujii M., Tanaka M., Ooka A. and Suzuki T., 1999. Effects of serum on the in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, 11:387 – 390.

- [36] Otoi T., Willingham L., Shin T, Kraemer D.C. and Westhusin M., 2002. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction*, 124:775–81.
- [37] Robert van den Hurk and Jia Zhao, 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63: 1717 – 1751.
- [38] Rodrigues B.A. and Rodrigues L.J., 2003. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology* 60: 59 – 66.
- [39] Sara C., Luvoni G.C., Elisa A. and Debora M., 2005. Factor involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63: 41 – 59.
- [40] Sawyer H.T., Smith P., Health D.A., Juengel J.L., Wakefield S.J. and Mc Natty K.P., 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol. Reprod.*, 66:1134 – 1150.
- [41] Songsasen N., Spindler R. and Wildt D.E., 2004. Follicular size, but not stage of reproduction or season, influences meiotic maturation of domestic dog oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 282 – 283 [Abstract].
- [42] Songsasen N., Yu I. and Leibo S.P., 2002. Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Mol. Reprod. Dev.*, 62:407 – 415.
- [43] Sorensen R.A., and Wassaman P.M., 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of mouse oocyte. *Dev. Biol.*, 50:531-536.
- [44] Sutani T., Yuasa T., Tomonaga T., Takio K. and Yanagida M., 1999. Fission yeast condensin complex essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/ SMC4. *Genes Dev.*, 13: 2271 – 2283.
- [45] Takashi Nagai, Misu Ebihara, Akira Onushi and Masanori Kubo, 1997. Germinal vesicle stages in pig follicular oocytes collected by different methods. *Journal of Reprod. Dev.*, 43: 340 – 342.
- [46] Van den Hurk R., Bevers M.M. and Dieleman S.J., 1999. *Comparative endocrinology and reproduction*. New Dehli. Narosa Publishing house, pp. 296 – 312.
- [47] Wei Y., Yu L., Bowen J., Gorovsky M.A. and Allis C.D., 1999. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, 97:99 – 109.
- [48] Yamada S, Shimazu Y, Kawano Y, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y., 1993. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocyte. *J Reprod.Fertil.Suppl.*, 47:227-9.

[49] [www.cytochemistry.net/.../022%20 %2019 15.jpg](http://www.cytochemistry.net/.../022%20%2019_15.jpg)

[50] <http://sprojects.mmi.mcgill.ca/menstrualcycle/primar>

[51] <http://www.theses.ulaval.ca>.

[52] www.wisc.edu/.../lec/lec1/female - hist.html

PHỤ LỤC: XỬ LÝ THỐNG KÊ

One-way Analysis of Variance

Analysis of Variance for so noan

Source	DF	SS	MS	F	P
giai doa	4	8593	2148	4.41	0.005
Error	38	18492	487		
Total	42	27086			

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----+
1	17	42.41	31.73	(-----*-----)
2	8	13.62	12.44	(-----*-----)
3	5	14.20	11.17	(-----*-----)
4	8	15.88	9.46	(-----*-----)
5	5	9.80	6.53	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+

Pooled StDev = 22.06 0 20 40 60

One-way Analysis of Variance

Analysis of Variance for so noan

Source	DF	SS	MS	F	P
tuoi	1	5285	5285	10.37	0.002
Error	53	26999	509		
Total	54	32284			

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----+
1	13	2.31	3.09	(-----*-----)
2	42	25.38	25.61	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+

Pooled StDev = 22.57 0 12 24

One-way Analysis of Variance

Analysis of Variance for noan tot

Source	DF	SS	MS	F	P
Giai doa	1	2132	2132	9.08	0.006
Error	24	5634	235		
Total	25	7766			

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----+
1	14	19.00	20.80	(-----*-----)
2	12	0.83	1.03	(-----*-----)

