

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



TRƯƠNG XUÂN ĐẠI

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN VI TRỌNG LỰC MÔ
PHỎNG LÊN SỰ TĂNG SINH VÀ CẤU TRÚC KHUNG XƯƠNG CỦA
TẾ BÀO HẠT NANG NOÃN HEO**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9 42 02 01

TPHCM – 2023

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn: TS. LÊ THÀNH LONG- Viện Sinh học nhiệt đới
2. Người hướng dẫn: GS.TS. HOÀNG NGHĨA SƠN- Viện Sinh học nhiệt đới

Phản biện 1: PGS.TS. NGUYỄN TRỌNG HỒNG PHÚC

Phản biện 2: PGS.TS. NGUYỄN VŨ PHONG

Phản biện 3: PGS.TS. NGUYỄN THANH BÌNH

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ, ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Trong những thập kỉ gần đây, nhiều thí nghiệm đã được thực hiện với các loại thiết bị mô phỏng vi trọng lực cùng với rất nhiều loại sinh vật khác nhau. Các hệ thống mô phỏng vi trọng lực được thiết kế để mô phỏng tình trạng gần như không trọng lực hoặc rơi tự do trong các phòng thí nghiệm ngay trên mặt đất nhằm nghiên cứu ảnh hưởng của tình trạng vi trọng lực lên sự thay đổi về các quá trình sinh lý của cơ thể các phi hành gia khi thực hiện các nhiệm vụ ngoài không gian. Các nghiên cứu này được thực hiện không chỉ khảo sát sự thay đổi về mặt sinh lý mà còn tìm hiểu sâu hơn những thay đổi ở cấp độ tế bào nhằm từng bước hiểu rõ được sự chi phối của tình trạng vi trọng lực lên các loại tế bào chuyên biệt trong các mô khác nhau. Nhiều nghiên cứu của các tác giả trên thế giới đã chỉ ra rằng, có những thay đổi, ảnh hưởng nhất định về mặt sinh lý nói chung cũng như sức khỏe sinh sản nói riêng đối với các phi hành đặc biệt là phi hành gia nữ, sự thay đổi dễ nhận biết và được ghi nhận đó là một loạt thay đổi về chất lỏng, cân bằng điện giải, thay đổi mạch máu, tim, giảm mật độ khoáng trong xương, tăng tỷ lệ mỡ trong cơ thể, kháng insuline, thay đổi cảm giác bao gồm cả thị giác chức năng tiền đình, thay đổi dung tích phổi, tăng mức lọc cầu thận, giảm mồ hôi, giảm thể tích tâm thất trái, giảm huyết áp, tăng tần suất rối loạn nhịp tim, tăng căng thẳng oxy hóa.... Tuy nhiên, do có sự đa dạng về các loại tế bào, kèm theo những thay đổi liên quan đến giới tính, các ảnh hưởng của vi trọng lực lên các tế bào sẽ rất đa dạng và phức tạp. Để hiểu rõ hơn những tác động và ảnh hưởng đó, chúng ta cũng cần phải hiểu vi trọng lực ảnh hưởng thế nào đối với sinh vật ở mức độ tế bào. Gần đây, các nghiên cứu về sự ảnh hưởng của vi trọng lực đến sự phát triển của tế bào cũng như những đổi ở mức độ phân tử bên trong tế bào đang là một trong những chủ đề hấp dẫn được các nhà nghiên cứu đặc biệt chú ý và tìm hiểu. Dựa theo kết quả tìm kiếm trên

PubMed tại thời điểm 20.3.2023, có khoảng 9.798 kết quả liên quan đến thuật ngữ “weightlessness”, 12.722 kết quả liên quan đến “microgravity” và 4.219 kết quả liên quan đến vi trọng lực và tế bào”. Tuy nhiên tại Việt Nam, hiện nay ngoài nhóm nghiên cứu của tác giả Hoàng Nghĩa Sơn các cộng sự tại Viện Sinh học Nhiệt Đới chưa có nhiều nghiên cứu liên quan đến chủ đề này, các kết quả tìm kiếm có được rất hạn chế. Ngay cả trên thế giới các nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực mô phỏng trên đối tượng pGC ở thời điểm hiện tại cũng chưa có kết quả nghiên cứu công bố về vấn đề này. Nhằm từng bước nghiên cứu sâu hơn về vai trò của vi trọng lực đối với sự tăng sinh các tế bào phát triển trong môi trường vi trọng lực, cũng như những tác động, thay đổi có thể diễn ra làm ảnh hưởng đến sự thay đổi cấu trúc bên trong tế bào trong điều kiện vi trọng lực so với điều kiện bình thường.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Từ những lý do được đề cập liên quan đến tính cấp thiết của luận án, mục tiêu của nghiên cứu tìm ra phương thức tác động của điều kiện vi trọng lực mô phỏng lên sự phát triển của tế bào pGC trong điều kiện *in vitro*. Cụ thể tìm hiểu sự khác biệt của các tiêu chí liên quan đến sự tăng sinh, apoptosis của tế bào trong điều kiện bình thường và vi trọng lực mô phỏng. Khảo sát ảnh hưởng của vi trọng lực mô phỏng lên sự biểu hiện của các protein điều hòa chu kỳ tế bào Cyclin A, Cdk4, Cdk6. Ngoài ra khảo sát cũng tập trung đánh giá các biểu hiện của các protein cấu trúc như α -tubulin và β -actin trong việc tái cấu trúc khung xương tế bào.

3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

- Phân lập và nuôi cấy tế bào pGC
- Đánh giá sự tăng sinh tế bào của pGC
- Đánh giá quá trình apoptosis.
- Đánh giá sự thay đổi hình thái tế bào của pGC
- Đánh giá sự thay đổi cấu trúc khung xương tế bào của pGC.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về vi trọng lực và vi trọng lực mô phỏng

Phần này này nêu các khái niệm cơ bản về vi trọng lực và vi trọng lực mô phỏng.

1.2. Các thí nghiệm không gian

Đề cập các vấn đề khó khăn gặp phải liên quan đến việc thực hiện các thí nghiệm trong không gian.

1.3. Những thay đổi diễn ra trong các chuyến bay ngoài không gian

Phần này nêu các vấn đề ảnh hưởng đến sức khỏe của phi hành gia khi thực hiện nhiệm vụ ngoài không gian, bao gồm sức khỏe sinh sản.

1.4. Ảnh hưởng của vi trọng lực lên sự thụ tinh và thai kỳ

Phần này trình bày ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực mô phỏng dẫn đến những tác động bất thường đến sự thụ tinh và thai kỳ.

1.5. Các thiết bị vi trọng lực mô phỏng

Giới thiệu các thiết bị tạo điều kiện vi trọng lực thường được sử dụng trong nghiên cứu.

1.6. Tổng quan về noãn và tế bào hạt thành nang noãn

Phần này trình bày khái niệm, cấu tạo sự hình thành và phát triển của tế bào hạt thành nang noãn.

1.7. Sự tăng sinh và chu kỳ tế bào

Phần này trình bày khái niệm và đặc điểm về sự tăng sinh của tế bào.

Phần này đề cập khái niệm và các giai đoạn trong chu kỳ tế bào nhân chuẩn, cũng như các kinase phụ thuộc cyclin điều khiển chu kỳ tế bào.

1.8. Khung xương tế bào

Phần này mô tả chức năng và cấu trúc khung xương tế bào chu kỳ tế bào.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

- Tế bào bào hạt nang noãn heo được phân lập từ buồng trứng heo.
- Hệ thống tạo vi trọng lực mô phỏng Gravite tạo môi trường vi trọng lực mô phỏng sử dụng cho đề tài “Nghiên cứu sự thay đổi cấu trúc bộ khung và tăng sinh của tế bào hạt buồng trứng heo trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng” Mã số ĐL.03/20-21.

2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi cấy tế bào

2.2.1.1. Thu mẫu buồng trứng

Mẫu buồng trứng được thu thập tại lò mổ, bảo quản trong nước muối sinh lý và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 2 giờ.

2.2.1.2. Thu nhận nang noãn đơn

Nang noãn đơn được rửa sạch nhiều lần bằng môi trường DMEM 10%FBS và 1% kháng sinh Pen/Strep (Capricorn Scientific, Đức). Nang này sẽ được sử dụng để thu nhận và nuôi cấy pGC.

2.2.1.3. Phương pháp thu nhận và nuôi cấy pGC

Nang noãn đơn sau khi được thu nhận sẽ được xử lý với pronase để loại bỏ hết tế bào ngoài nang. Dịch chứa tế bào hạt sẽ được ly tâm 1500 vòng/phút để thu tủa tế bào. Tủa tế bào được huyền phù hóa và được chuyển vào bình nuôi cấy chứa môi trường DMEM 10% FBS và 1% kháng sinh Pen/Strep (Capricorn Scientific, Đức) Tế bào được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂.

2.2.1.4. Phương pháp cấy chuyển pGC

Tế bào được xử lý với 1mL trypsin-EDTA 0,25% (Capricorn Scientific, Đức) ù 3 phút ở 37°C, 5% CO₂. Huyền phù hóa tế bào bằng 2mL môi trường DMEM 10% FBS và 1% kháng sinh Pen/Strep và chuyển vào ống ly tâm 15mL, quay 1500vòng/phút trong 5phút loại bỏ dịch nổi và tế bào. Tủa tế

bào được huyền phù hóa và chuyển vào bình nuôi cấy mới chứa môi trường DMEM 10% FBS và 1% kháng sinh Pen/Strep (Capricorn Scientific, Đức).

2.2.2. Phương pháp nhuộm nhân pGC

Tế bào được xử lý với Triton X-100 0,1% (Merck, Đức) qua đêm ở 4°C. Sau đó đem nhuộm tế bào với Hoechst 33342 (14533 Sigma Aldrich, Munich) 2µg/ml trong 30 phút và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang để đánh giá.

2.2.3. Phương pháp thử nghiệm vi trọng lực

Các tế bào được chia làm 2 nhóm: Nhóm đối chứng, được nuôi cấy trong điều kiện bình thường và nhóm môi trường vi trọng lực mô phỏng (SMG) được nuôi cấy trên hệ thống vi trọng lực mô phỏng Gravite. Các tế bào được đánh giá và so sánh sau khi nuôi cấy 72 giờ. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.4. Phương pháp đánh giá sự tăng sinh tế bào

2.2.4.1. Đánh giá mật độ tế bào bằng WST-1

pGC được xử lý với dung dịch WST-1 (11644807001, Roche, Thụy Sĩ) trong 3,5 giờ ở 37°C, 5% CO₂. Giá trị OD mỗi giếng được đo bởi máy quang phổ GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader (Promega, Mỹ) ở bước sóng 450 nm.

2.2.4.2. Đánh giá chu kỳ tế bào, biểu hiện dịch mã

Thu hoạch tế bào: Mỗi bình nuôi tế bào được ủ với 1mL dung dịch Trypsin 0,25% (TRY-2B, Capricorn Scientific, Đức) trong 5 phút ở 37°C. Sau đó, cho thêm 1mL môi trường vào bình nuôi tế bào để bất hoạt Trypsin. Tế bào được thu hoạch và ly tâm với tốc độ 1500 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ thường nhằm thu tủa của tế bào.

Đánh giá tỉ lệ các pha của tế bào trong chu kỳ tế bào bằng hệ thống Cytell: pGC được nuôi cấy trong môi trường DMEM/Ham's F12 với 15% FBS và 1% Pen/ Strep trên đĩa 96 giếng ở mật độ 1×10^3 tế bào/ giếng ở điều kiện đối chứng và hệ thống vi trọng lực mô phỏng trong thời gian 72 giờ. Nhuộm nhân.

Tế bào được đếm bằng phần mềm ứng dụng trên kính Cytell (GE Healthcare, Mỹ)

Đánh giá biểu hiện phiên mã các gene CDK4, CDK6, Cyclin A, Cyclin D1 điều hòa chu kỳ tế bào: Phương pháp real-time PCR được sử dụng để đánh giá biểu hiện mức độ phiên mã của các gene liên quan đến điều hòa chu kỳ tế bào là CDK4, CDK6, Cyclin A, Cyclin D1. Gene GAPDH được sử dụng để làm đối chứng.

Tách chiết RNA tổng của tế bào: RNA tổng của pGC được tách bằng kit ReliaPrep™ RNA Cell miniprep RNA system (Z6011, Promega, Mỹ). Các mẫu RNA thu được được trữ trong nitor lỏng trước khi tiến hành chạy Realtime qRT-PCR.

Real time qRT-PCR: sử dụng kit 2x qPCR SyGreen 1-Step Go Hi-ROX kit (PB25.32.03, PCRBiosystem, Anh). Mỗi phản ứng có tổng thể tích là 20µl bao gồm 1µl RNA mẫu, 2µl mỗi xuôi và ngược, 10µl 2X Mix Hi-ROX, 1µl RTase, và 6µl dH₂O. Chu trình nhiệt của phản ứng được tiến hành như sau: 45°C trong 15 phút, 95°C trong 2 phút, 40 chu kỳ gồm 95°C trong 10 giây và 60°C trong 15 giây, 71 bước 60°C trong 15 giây, 4°C trong 30 phút. Các cặp môi đặc trưng cho các gen khảo sát gồm: CDK4 F: 5'-TTCGAGCATCCCAATGTTGTC-3', R: 5'-GTCTCGATGAACGATGCAGTTG-3'; CDK6 F: 5'-TTGGCTTTGGTGGGTAGTTCT-3', R: 5'-TGAATGTCGGGTAGGAAGATTG-3'; Cyclin D1 F: 5'-TGCATCTACACCGACAACCTCCA-3', R: 5'-GTTGGAAATGAACTTCACGTCTGT-3'; Cyclin A F: 5'-GATTTACATCTTAGAAAACAAAGG-3'; GADPH F: 5'-ATGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3', R: 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGT-3'

Đánh giá mức độ biểu hiện dịch mã các gene CDK4, CDK6, Cyclin A, Cyclin D1 điều hòa chu kỳ tế bào:

Mức độ biểu hiện của các protein liên quan đến chu kỳ tế bào bao gồm: CDK4, CDK6, Cyclin A1, Cyclin A2 được đánh giá bằng phương pháp Western Blot. Protein GAPDH được sử dụng làm đối chứng. Trình tự các bước thực hiện như mô tả bên dưới: Ly giải protein → Điện di SDS-PAGE → Chuyển màng PVDF → Khóa màng → Ủ kháng thể sơ cấp → Ủ kháng thể thứ cấp.

2.2.5. Phương pháp đánh giá quá trình apoptosis

2.2.5.1. Đánh giá tỉ lệ apoptosis bằng phương pháp tế bào dòng chảy

pGC sau khi thu hoạch được xử lý với FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, Mỹ) và được phân tích bởi hệ thống máy BD Accuri C6 flow cytomete (BD Biosciences, Mỹ).

2.2.5.2. Đánh giá biểu hiện phiên mã của các gene apoptosis

Các gene *Bax* và *Bcl-2* được đánh giá biểu hiện mức phiên mã bằng phương pháp Realtime qRT-PCR. Quy trình thu nhận RNA tổng và phản ứng Realtime qRT-PCR được thực hiện như Mục 2.2.4.2. Chu trình nhiệt được tiến hành như sau: 45°C trong 15 phút, 95°C trong 2 phút, 40 chu kỳ gồm 95°C trong 10 giây và 52,2°C trong 15 giây, 71 bước 60°C trong 15 giây, 4°C trong 30 phút. Các cặp mồi đặc trưng cho các gene khảo sát bao gồm:

Bax F: 5'-CCAGGAGTCCCAATGTTGTC-3', R: 5'-TTCATCCAGGGGAGGTACAAC-3';
Bcl-2 F: 5'-TCTTCATTACACCGAGTAGTGC-3', R: 5'-TGAGGTTAGAGCCATCTGGAAA-3';
GAPDH F: 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3', R: 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'.

2.2.6. Phương pháp đánh giá sự thay đổi hình thái nhân và tế bào chất

2.2.6.1. Phương pháp đánh giá hình thái nhân

pGC được nhuộm nhân bằng Hoechst 33342 (14533, Sigma-Aldrich, Mỹ) và quan sát dưới hệ thống kính hiển vi huỳnh quang Cytell (GE Healthcare, Mỹ). Ứng dụng Cell Cycle App được sử dụng để đánh giá hình thái nhân, bao gồm diện tích, cường độ và giá trị hình dạng nhân (nuclear shape value).

2.2.6.7. Phương pháp đánh giá hình thái tế bào chất

Phần mềm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Mỹ) được dùng để đánh giá diện tích tế bào. Kích thước của hucMSC cũng được đánh giá bằng phương pháp flow cytometry thông qua kết quả đo chỉ số FSC (Forward Scatter).

2.2.7. Đánh giá sự thay đổi cấu trúc khung xương tế bào

2.2.7.1. Đánh giá biểu hiện mức phiên mã các gene mã hóa vi ống, vi sợi

Các gene gồm α -tubulin 3 và β -actin được đánh giá biểu hiện mức phiên mã bằng phương pháp Realtime qRT-PCR như Mục 2.2.4.2. Chu trình nhiệt được tiến hành như sau: 45°C trong 15 phút, 95°C trong 2 phút, 40 chu kỳ gồm 95°C trong 10 giây và 60°C trong 15 giây, 71 bước 60°C trong 15 giây, 4°C trong 30 phút. Các cặp mồi đặc trưng cho các gene khảo sát bao gồm:

α -tubulin 3 F: 5'-CATTGAAAAGTTGTGGTCTGATCA-3', R: 5'-GCTTGGGTCTGTAACAAAGCAT-3';

β -actin F: 5'-GAGCACAGAGCCTCGCCTTT-3', R: 5'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA-3';

$GAPDH$ F: 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3', R: 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'.

2.2.7.2. Đánh giá biểu hiện mức dịch mã các gene mã hóa vi ống, vi sợi

Mức độ biểu hiện của các protein α -tubulin và β -actin, được đánh giá bằng phương pháp Western Blot như ở Mục 2.2.4.2. Các kháng thể được sử dụng bao gồm: Anti-beta Actin antibody (ab8226, Abcam, Mỹ), Anti-alpha

Tubulin antibody (ab52866, Abcam, Mỹ), Anti-GAPDH antibody (ab181602, Abcam, Mỹ).

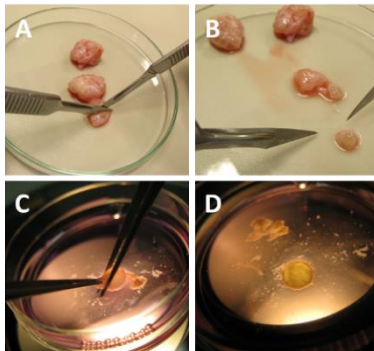
2.2.8. Phương pháp thống kê

Phần mềm Sigma Plot (SYSTAT Software, Mỹ) được dùng để phân tích số liệu trong nghiên cứu. Phương pháp One-way ANOVA được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm, trong đó $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ được xem là các khác biệt có ý nghĩa thống kê.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu nhận và nuôi cấy tế bào hạt thành nang noãn heo

3.1.1 Kết quả thu nhận nang trứng và pGC

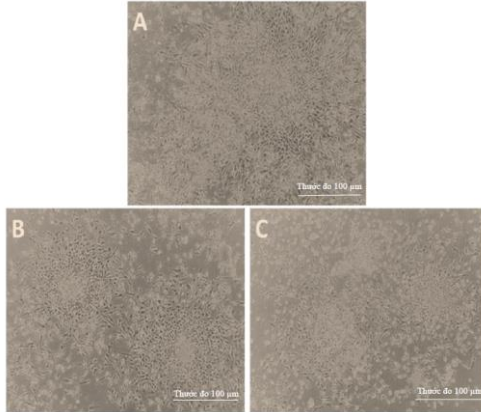


Hình 3.1. Tiến trình thu nhận nang noãn đơn từ buồng trứng heo. **A.** Buồng trứng được cắt thành các phần nhỏ. **B.** Nang đơn được cắt rời khỏi buồng trứng. **C.** Vỏ nang được bóc tách khỏi nang buồng trứng. **D.** Hình thái nang noãn heo đơn.

Hình 3.1 thể hiện quá trình thu nhận nang noãn bằng phương pháp cắt rời từng nang. Các nang này sẽ được sử dụng cho quá trình thu nhận tế bào hạt buồng trứng heo để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo như nuôi cấy sơ cấy, cấy chuyên và thử nghiệm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng.

Sau khi thu nhận các nang noãn, tế bào hạt sẽ được thu nhận bằng cách sử dụng ống mao quản hút dịch nang và tế bào bên trong nang noãn. Tế bào sẽ được chuyển vào các bình nuôi tế bào T25 với môi trường nuôi cấy DMEM bổ sung 10% huyết thanh bê và 1% kháng sinh. Sau 24 giờ nuôi cấy,

tế bào hạt phát triển và bám trải trên bề mặt bình nuôi cấy (hình 3.2). Tế bào hạt có hình dạng hình thoi sau 3 giờ và 12 giờ nuôi cấy. Tế bào hạt tăng sinh bình thường, không có biểu hiện phân mảnh của tế bào chất hay phân mảnh

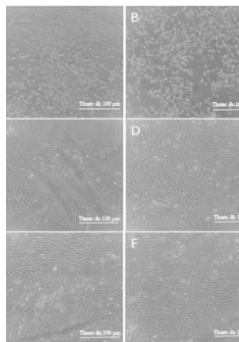


Hình 3.2. Kết quả nuôi cấy sơ cấp tế bào hạt. A, B, C: các quần thể tế bào hạt bám và tăng sinh trên bề mặt bình nuôi cấy sau 24 giờ.

3.1.2. Kết quả nuôi cấy, cấy chuyển và tăng sinh pGC

Trong nuôi cấy sơ cấp, tế bào hạt bám và phát triển trên bề mặt bình nuôi cấy. Từ lần cấy chuyển thứ 1 đến thứ 9 các tế bào vẫn thể hiện khả năng tăng sinh mạnh

Hình 3.3. Hình thái tế bào hạt thành nang noãn qua các lần cấy chuyển. A,



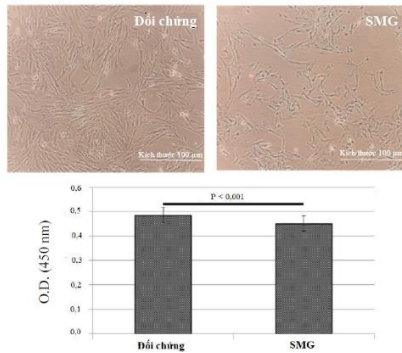
B. Tế bào hạt thành nang noãn lần cấy chuyển thứ 1. C, D. Các tế bào hạt thành nang noãn heo lần cấy chuyển thứ 3 và 5. E, F. Các tế bào hạt thành nang noãn heo lần cấy chuyển thứ 7 và 9 (X 200).

3.2. Kết quả đánh giá sự tăng sinh của pGC dưới điều kiện vi trọng lực

Mức độ tăng sinh của tế bào hạt thành nang noãn heo được đánh giá bằng hai phương pháp WST-1 và đếm mật độ tế bào bằng phần mềm trên hệ thống Cytell.

3.2.1. Kết quả đánh giá sự thay đổi mật độ tế bào bằng phương pháp WST-1

Sau thử nghiệm vi trọng lực, có thể nhận thấy sự khác biệt về mật độ tế bào hạt buồng trứng heo giữa hai nhóm thí nghiệm. Qua quan sát dưới kính hiển vi, các tế bào tế bào hạt buồng trứng heo ở nhóm SMG có phần mọc thưa hơn và mật độ thấp hơn so với nhóm đối chứng (hình 3.4).



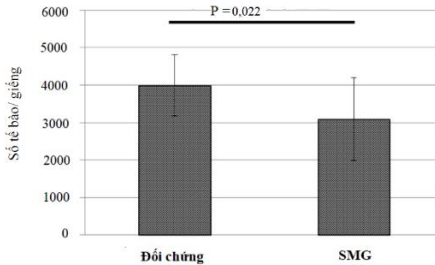
Hình 3.4. Thử nghiệm WST-1 đánh giá sự tăng sinh tế bào pGC giữa môi trường SMG và đối chứng

Kết quả đo mật độ quang hai nhóm thí nghiệm ở phương pháp WST-1 cũng cho thấy mật độ quang tế bào pGC trong nhóm SMG là $0,45 \pm 0,03$; thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng ($0,49 \pm 0,03$; $P < 0,001$) (hình 3.4)

3.2.2.1. Tỷ lệ các pha trong chu kỳ tế bào

Kết quả đếm mật độ tế bào bằng phần mềm Cytell ở hình 3.5 càng khẳng định sự ức chế của điều kiện SMG lên sự tăng sinh tế bào pGC. Cụ thể, mật độ tế bào pGC trung bình ở nhóm SMG là 3095 ± 1108 tế bào/giếng, thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng là 3995 ± 815 tế bào/giếng ($P = 0,022$). Những kết quả trên cho thấy rằng điều kiện SMG đã gây ảnh hưởng

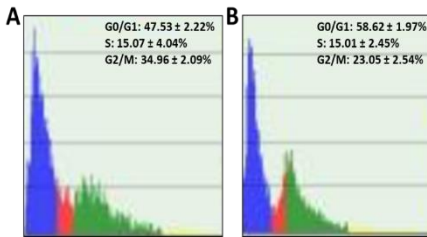
lên quá trình phát triển của dòng tế bào pGC bằng cách ức chế sự tăng sinh của chúng.



Hình 3.5. Thử nghiệm đánh giá mật độ tế bào pGC bằng Cell Cycle App của kính hiển vi huỳnh quang Cytell.

3.2.3 Kết quả đánh giá chu kỳ tế bào

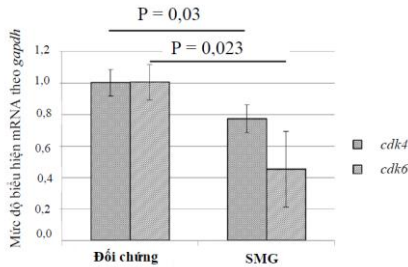
3.2.3.1. Kết quả đánh giá tỉ lệ các pha



Hình 3.6. Phân tích chu kỳ tế bào phần mềm Cell Cycle App của kính hiển vi huỳnh quang Cytell. Màu xanh dương thể hiện pha G0/G1, màu đỏ thể hiện pha S, màu xanh lá thể hiện pha G2/M. A. Nhóm đối chứng. B. Nhóm cảm ứng SMG

3.2.3.2. Kết quả đánh biểu hiện phiên mã *cdk4*, *cdk6*.

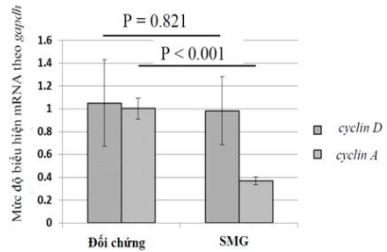
Phân tích real time RT-PCR cho thấy sự biểu hiện của gene *cdk4* trong pGC ở nhóm đối chứng cao hơn so với pGC trong nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng ($P = 0,03$). pGC trong nhóm đối chứng cũng cho thấy mức độ biểu hiện *cdk6* cao hơn so với nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng (Hình 3.7) ($P = 0,023$). Sự giảm biểu hiện của gene *cdk6* mức phiên mã của pGC ở nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng diễn ra mạnh hơn so với sự biểu hiện của gene *cdk4*.



Hình 3.7. Kết quả phân tích real-time qRT-PCR của gene *cdk4* và *cdk6* ở pGC.

3.2.3.3. Kết quả đánh giá biểu hiện phiên mã Cyclin A, và Cyclin D

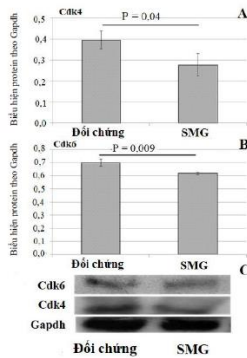
Phân tích real time qRT-PCR còn cho thấy sự biểu hiện của gene *cyclinA* trong pGC ở nhóm đối chứng cao hơn so với pGC trong nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng ($P < 0.001$). Tuy nhiên sự biểu hiện của *cyclinD* của pGC trong nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng không có sự khác biệt (hình 3.8) ($P = 0,821$).



Hình 3.8. Kết quả phân tích real-time qRT-PCR của gene *cyclin D* và *cyclin A* ở pGC

3.2.3.4. Kết quả đánh giá biểu hiện dịch mã của Cdk4 và Cdk6

Kết quả phân tích western blot sự biểu hiện của protein Cdk4 và Cdk6 được mô tả trong hình 3.9. Tế bào pGC đều cho thấy sự giảm biểu hiện của protein Cdk4 và Cdk6 khi được cảm ứng vi trọng lực mô phỏng. Sự thay đổi trong biểu hiện của Cdk4 và Cdk6 là nguyên nhân dẫn tới những biến đổi trong tiến trình phân chia của tế bào, đây là nguyên nhân làm thay đổi tỉ lệ tế bào trong các pha khác nhau của chu kì pGC khi phân tích tích bằng chương trình Cell cycle app.

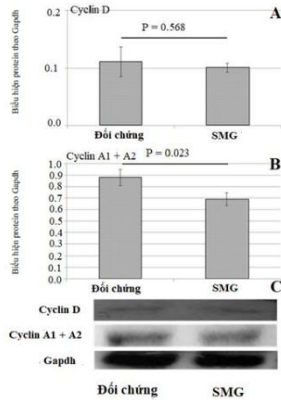


Hình 3.9. Sự biểu hiện protein Cdk4 và Cdk6.

A. Kết quả phân tích mức độ biểu hiện protein Cdk4. B. Kết quả phân tích mức độ biểu hiện protein Cdk6. C. Phân tích western blot protein Cdk4 và CDK6.

3.2.3.5. Kết quả đánh giá biểu hiện dịch mã của Cyclin A và Cyclin D

Sự biểu hiện của protein cyclin A1 + A2, và cyclin D được mô tả trong hình 3.10. Kết quả phân tích western blot cho thấy sự biểu hiện của cyclin D của tế bào pGC trong nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P = 0.568$). Trong khi đó tế bào pGC trong nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng lại giảm biểu hiện protein cyclin A1 và A2. Điều này chứng tỏ vi trọng lực mô phỏng làm thay đổi sự biểu hiện của protein điều hòa chu kỳ tế bào cyclin A1 và A2, dẫn đến ảnh hưởng lên tỉ lệ tế bào trong



Hình 3.10. Sự biểu hiện protein Cyclin D và cyclin A1 + A2. A. Kết quả phân tích mức độ biểu hiện protein Cyclin D. B. Kết quả phân tích mức độ biểu hiện protein Cyclin A1 + A2. C. Phân tích western blot protein Cyclin D và Cyclin A1 + A2.

các pha của chu kỳ tế bào pGC.

3.3. Kết quả đánh giá quá trình apoptosis

3.3.1. Kết quả đánh giá tỉ lệ apoptosis

Sức sống và sự chết theo chương trình của tế bào tế bào hạt nang noãn heo được đánh giá bằng phương pháp flow cytometry. Phân tích flow cytometry cho thấy khả năng tồn tại của tế bào pGC ở nhóm SMG tăng nhẹ. Tỉ lệ sống của tế bào pGC ở nhóm đối chứng và SMG lần lượt là $95,73 \pm$

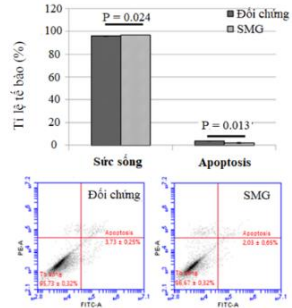
$0,32\%$ và

$96,67 \pm$

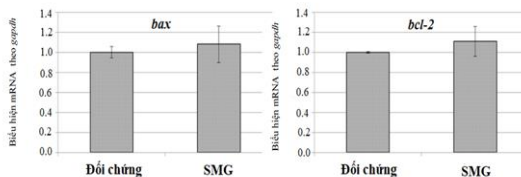
$0,32\%$ ($P = 0.024$). Ngoài ra, tỉ lệ apoptosis của tế bào pGC ở nhóm SMG thấp hơn so với nhóm chứng ($2,03 \pm 0,65\%$ so với $3,73 \pm 0,25\%$, $P = 0.013$) (hình 3.11). Những kết quả này cho thấy rằng điều kiện SMG có thể nâng cao khả năng tồn tại của pGC.

3.3.2. Kết quả đánh giá biểu hiện phiên mã của các gene apoptosis

Kết quả phân tích real-time qRT-PCR cho thấy sự biểu hiện của gene *bax* và *bcl-2* mức phiên mã không có sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng (hình 3.12). Điều đó chứng tỏ, tế bào pGC vẫn cân bằng được sự biểu hiện của hai gene này trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng.



Hình 3.11. Phân tích sức sống và quá trình apoptosis của pGC

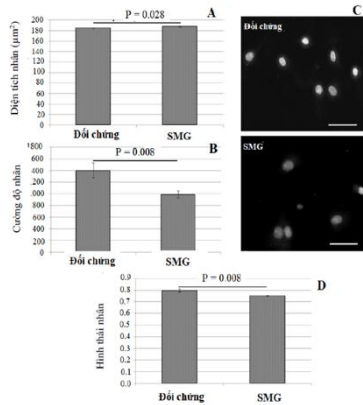


Hình 3.12. Kết quả phân tích real-time qRT-PCR gene *bax* và *bcl-2* của pGC

3.4. Kết quả đánh giá sự thay đổi hình thái tế bào

3.4.1. Sự thay đổi hình thái nhân

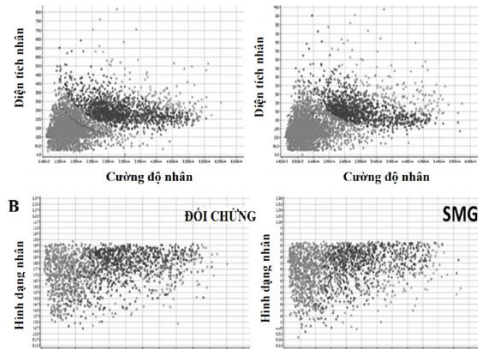
Phần mềm Cell Cycle App của hệ thống Cytell được sử dụng để đánh giá các chỉ tiêu về nhân của pGC ở hai nhóm thí nghiệm, bao gồm diện tích, cường độ nhân và hình dạng nhân (hình 3.13 và 3.14). Diện tích nhân trung bình của tế bào pGC ở nhóm đối chứng sau 3 ngày nuôi cấy $184,27 \pm 0,90 \mu\text{m}^2$. Trong khi



Hình 3.13. Đánh giá hình thái nhân pGC bằng phần A. Diện tích nhân tế bào. B. Cường độ nhân tế bào. C. Hình ảnh nhân được nhuộm bằng H33342. D. Giá trị hình thái nhân. mềm ứng dụng Cell Cycle

đó, chỉ số này ở nhóm SMG là $187,81 \pm 1,20 \mu\text{m}^2$; cao hơn so với nhóm đối chứng ($P = 0.028$) (hình 3.13A). Cường độ nhân trung bình của pGC ở nhóm SMG là 987 ± 62 , thấp hơn so với nhóm đối chứng (1404 ± 128) ($P = 0.008$). Kết quả này cho thấy rằng điều kiện SMG làm giảm cường độ nhân của pGC sau 3 ngày nuôi cấy. Hình 3.13 B cũng bổ sung cho các luận điểm này. Qua đó ta thấy nhân của các pGC trong nhóm đối chứng biểu hiện kích thước nhỏ hơn so với nhóm SMG. Đồng thời qua quan sát trong hình 3.13 C, cường độ phát huỳnh quang ở nhân pGC trong nhóm SMG cũng thấp hơn so với nhóm đối chứng.

Trong phần nghiên cứu này, chúng tôi cũng đánh giá giá trị hình dạng nhân của pGC bằng phần mềm ứng dụng Cell cycle. Kết quả từ hình 3.13D cho thấy giá trị hình dạng nhân của pGC ở nhóm đối chứng là $0,795 \pm 0,014$, cao hơn nhóm SMG ($0,750 \pm 0,005$, $P = 0.008$). Điều này chứng tỏ rằng điều kiện SMG đã làm giảm giá trị hình dạng nhân của pGC sau 3 ngày thử nghiệm. Nói một cách khác, trong điều kiện SMG, nhân của pGC có xu hướng kéo dài và bất đối xứng hơn so với điều kiện bình thường.

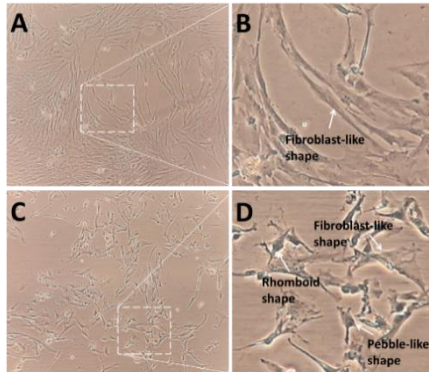


Hình 3.14. Giá trị hình thái nhân tế bào phân tích bằng Cytell.

- A. Sự phân bố diện tích nhân trong mối quan hệ với cường độ nhân.
 B. Sự phân bố hình dạng nhân trong mối quan hệ với cường độ nhân.

3.4.2. Kết quả đánh giá các dạng hình thái tế bào hạt

Quan sát các dạng hình thái tế bào hạt cho thấy nhóm đối chứng cho thấy cường độ nhân cao hơn và sự trải rộng của các pGCs hơn các tế bào nhóm vi trọng lực mô phỏng SMG (hình 3.15). pGCs từ nhóm đối chứng cho thấy hình dạng đồng nhất giống nguyên bào sợi (hình 3.15A, 3.15B). Tuy nhiên pGCs từ nhóm SMG cho thấy có nhiều sự khác biệt về hình thái dạng giống nguyên bào sợi cũng được phát hiện ở pGCs dưới điều kiện SMG. Ngoài ra, tế bào dạng hình thoi và dạng thon tròn cũng được tìm thấy ở nhóm này (hình 3.15C, 3.15D). Kết quả này chỉ ra rằng điều kiện SMG làm thay đổi hình thái của pGCs. Hình 3.15A minh chứng cho sự phân bố song song của các bó vi sợi ở pGCs từ nhóm đối chứng. Sự phân bố của các nhóm vi sợi làm ảnh hưởng đến sự thay đổi hình thái của pGCs dưới điều kiện SMG



Hình 3.15. Hình thái của các pGC

(A), (B) pGC của nhóm đối chứng cho thấy có dạng giống tế bào nguyên bào sợi; (C), (D) pGC từ nhóm SMG cho thấy có sự đa dạng về hình thái học, bao gồm giống nguyên bào sợi, hình thoi, dạng thon tròn.

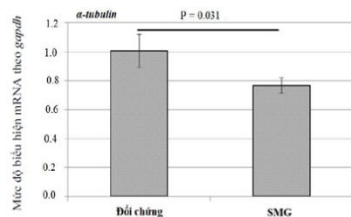
Độ phóng đại x 100 (A, C).

3.5. Kết quả đánh giá sự thay đổi cấu trúc khung xương tế bào

3.5.1. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của vi trọng lực lên vi ống

3.5.1.1 Đánh giá sự thay đổi của vi ống ở mức phiên mã.

Trong nghiên cứu này, những thay đổi trong sự biểu hiện mRNA của tubulin được mô tả bằng phương pháp real-time qRT-PCR (hình 3.16). Kết quả cho thấy, trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng, pGC giảm biểu hiện tubulin sau 3 ngày nuôi cấy. Mức độ giảm biểu hiện của gene tubulin của nhóm cảm



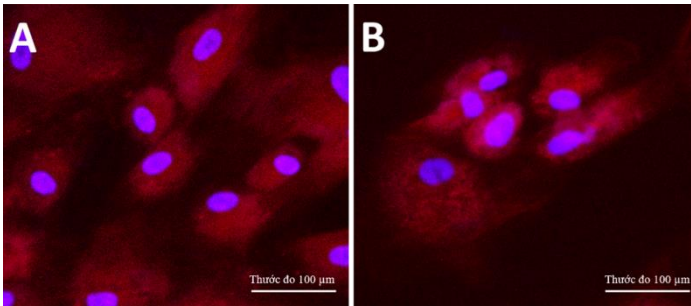
Hình 3.16. Sự biểu hiện gene *tubulin* của pGC

ứng điều kiện vi trọng lực mô phỏng là 23% so với nhóm đối chứng. Điều

này chứng tỏ điều kiện vi trọng lực mô phỏng cảm ứng sự giảm biểu hiện gene tubulin ở mức phiên mã.

3.5.1.2 Đánh giá sự thay đổi cấu trúc vi ống

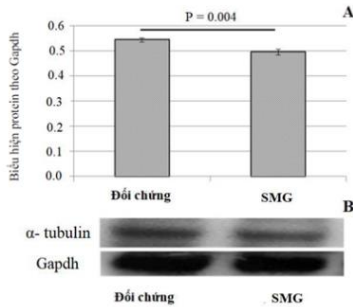
Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá sự phân bố của vi ống trong tế bào pGC được nuôi ở môi trường vi trọng lực so với điều kiện bình thường bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang protein vi ống tubulin. Như đã thấy trong hình 3.17, các sợi vi ống phân bố với mật độ dày hơn trong nhóm đối chứng so với ở nhóm vi trọng lực



Hình 3.17. Kết quả nhuộm protein tubulin cấu thành nên vi ống của pGC. A. Nhóm đối chứng. B. Nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng.

3.5.1.3 Đánh giá sự thay đổi của vi ống ở mức dịch mã

Phương pháp western blot được dùng để đánh giá biểu hiện mức dịch mã của α -Tubulin, protein cấu trúc vi ống ở tế bào pGC trong hai nhóm thí nghiệm. Kết quả so sánh với Gapdh ở hình 3.18 cho thấy trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng, tế bào pGC giảm biểu hiện tubulin.



Hình 3.18. Sự biểu hiện protein α -Tubulin.

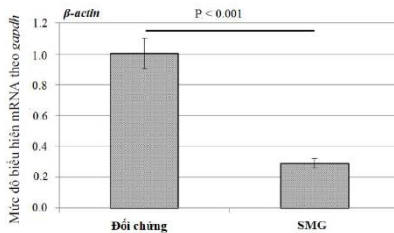
A. Kết quả phân tích mức độ biểu hiện protein α -Tubulin.

B. Phân tích western blot protein α -Tubulin.

3.5.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của vi trọng lực lên vi sợi

3.5.2.1 Đánh giá sự thay đổi của vi sợi ở mức phiên mã.

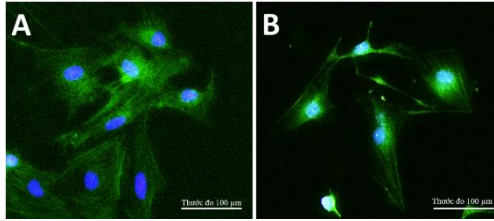
Sự đổi biểu hiện của actin mức phiên mã của pGC được mô tả trong hình 3.19. Kết quả phân tích real-time qRT-PCR cho thấy pGC giảm biểu hiện mRNA của actin trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Mức độ giảm actin diễn ra mạnh pGC giảm biểu hiện actin hơn 70% so với nhóm đối chứng. Điều này cho thấy sự thay đổi cấu trúc rỗ rết của pGC trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng.



Hình 3.19. Sự biểu hiện gen β -actin của pGC.

3.5.2.2. Đánh giá sự thay đổi cấu trúc vi sợi

Kết quả nhuộm vi sợi actin ở hình 3.20 cho thấy tế bào pGC ở nhóm đối chứng có sự phân bố song song các bó vi sợi, các bó vi sợi này kéo dài theo chiều dài tế bào. Trong nhóm vi trọng lực, vi sợi actin hiển thị với mật độ thấp hơn. Kết quả này cũng cho thấy các pGC trong môi trường vi trọng lực có xu hướng mở rộng ra thay vì kéo dài.

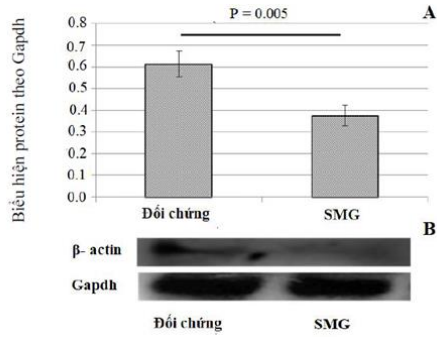


Hình 3.20. Kết quả nhuộm hệ thống vi sợi của tế bào pGC bằng Hoechst 33342

A. Nhóm đối chứng. B. Nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng.

3.5.2.3. Đánh giá sự thay đổi của vi sợi ở mức dịch mã

Trong nghiên cứu, biểu hiện actin đã được phân tích để đánh giá tác động của vi trọng lực mô phỏng lên cấu trúc vi sợi pGC. Các kết quả western blot cho thấy sự giảm biểu hiện actin trong pGC từ nhóm SMG (hình 3.21). Mức độ điều chỉnh giảm biểu hiện actin mạnh hơn biểu hiện Tubulin trong pGC. Kết quả phân tích western blot củng cố cho kết quả phân tích real-time qRT-PCR và nhuộm huỳnh quang cấu trúc vi sợi. Sự biểu hiện của actin giảm ở cả mức phiên mã và dịch mã trong pGC được cảm ứng điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Điều đó cho thấy điều kiện vi trọng lực mô phỏng không chỉ ảnh hưởng đến sự biểu hiện gene actin, mà còn ảnh hưởng tới thành phần, hàm lượng actin có trong tế bào, từ đó cho thay đổi cấu trúc vi sợi cũng như sự phân bố của các vi sợi trong pGC.



Hình 3.21. Sự biểu hiện protein β -actin.

A. Kết quả phân tích mức độ biểu hiện protein β -actin.

B. Phân tích western blot protein β -actin.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Nghiên cứu này cho thấy, sau 72 giờ nuôi cấy và so sánh giữa điều kiện trên trái đất và điều kiện vi trọng lực mô phỏng, kết quả cho thấy vi trọng lực mô phỏng làm giảm sự biểu hiện của các protein điều hòa chu kỳ tế bào chính như Cyclin A1 và A2, CDK4, CDK6 trong tế bào hạt thành nang noãn heo. Đây chính là nguyên nhân dẫn tới sự thúc đẩy tế bào đi vào pha nghỉ.

Hơn nữa, nghiên cứu cũng đã chứng minh được vi trọng lực mô phỏng làm giảm sự biểu hiện của các protein cấu trúc như β -actin và α -tubulin của tế bào pGC, dẫn đến sự thay đổi quá trình tổng hợp hệ thống vi sợi, vi ống và cảm ứng sự tái cấu trúc bộ khung xương tế bào.

Sự suy giảm của các protein điều hòa liên quan đến chu kỳ tế bào và các protein cấu trúc khung xương tế bào là nguyên nhân gây ra sự ức chế tăng sinh tế bào hạt pGC trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng.

Kiến nghị

Cần có sự khảo sát đánh giá thêm với các tế bào hạt thành nang noãn ở người nhằm so sánh và đánh giá sự tương đồng cũng như những ảnh hưởng về mặt sinh lý đối với nữ phi hành gia khi thực hiện các sứ mệnh trong không gian ở điều kiện vi trọng lực.

Tiếp tục nghiên cứu cơ chế điều hòa hormone của tế bào hạt trên đối tượng ở heo và người.

Nghiên cứu sự tương tác giữa tế bào hạt và tế bào noãn cũng như các tế bào khác trong buồng trứng.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Luận án là công trình nghiên cứu đầu tiên đánh giá về sự thay đổi ở mức độ hình thái và phân tử trên đối tượng tế bào pGC tại Việt Nam và trên thế giới (tính đến thời điểm nghiên cứu được công bố). Qua đó bổ sung vào sự hiểu biết về đặc tính cũng như sự ảnh hưởng của tế bào pGC dưới tác động của điều kiện vi trọng lực sẽ làm thay đổi một loạt các yếu tố liên quan đến mật độ tế bào, chu kỳ và quá trình apoptosis của tế bào. Ngoài ra cũng ảnh hưởng đến các chỉ thị phân tử biểu hiện của các yếu tố phiên mã và dịch mã và cấu trúc khung xương của tế bào pGC.

Từ những kết quả nghiên cứu thu được cho thấy vi trọng lực mô phỏng làm giảm sự biểu hiện của các protein điều hòa chu kỳ tế bào chính như Cyclin A1 và A2, Cdk4, Cdk6 của tế bào pGC. Nghiên cứu cũng đã chứng minh được vi trọng lực mô phỏng làm giảm sự biểu hiện của các protein cấu trúc như β -actin và α -tubulin của pGC, dẫn đến thay đổi quá trình tổng hợp hệ thống vi sợi, vi ống và cảm ứng sự tái cấu trúc bộ khung xương tế bào.

Sự suy giảm của các protein điều hòa liên quan đến chu kỳ tế bào và các protein cấu trúc khung xương tế bào là nguyên nhân gây ra sự ức chế tăng sinh tế bào pGC trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng

**DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Truong Xuan Dai, Hoang Nghia Son, Ho Nguyen Quynh Chi, Hoang Nghia Quang Huy, Nguyen Thai Minh, Nguyen Thi Thuy Tram, Nguyen Thi Thuong Huyen, To Minh Quan, Doan Chinh Chung, Truong Hai Nhung, Tran Hong Diem, Nguyen Thi Phuong Mai, Le Thanh Long. “*Simulated microgravity induces the proliferative inhibition and morphological changes in porcine granulosa cells*”. Current Issues in molecular biology, 2021, 43(3) pp 2210-2219 doi: 10.3390/cimb43030155.
2. Truong Xuan Dai, Hoang Nghia Son, Le Thanh Long. “*Simulated microgravity altered the cell cycle progression of porcine granulosa cells*”. Vietnam Journal of Biotechnology, 2022, 20 (3):pp 445-451 doi.org/10.15625/1811-4989/16510.