

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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TP. Hồ Chí Minh – Năm 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

TRƯỜNG XUÂN ĐẠI

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ



Người hướng dẫn 1

TS. Lê Thành Long

Người hướng dẫn 2

GS.TS. Hoàng Nghĩa Sơn

TP. HỒ CHÍ MINH – 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "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" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 13 tháng 11 năm 2023

Tác giả luận án



Trương Xuân Đại

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc của cá nhân tôi đến TS. Lê Thành Long, một người thầy, người bạn đã trực tiếp hướng dẫn và hỗ trợ nhiệt tình trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu từ thời gian đầu với nhiều bỡ ngỡ, khó khăn cho đến khi hoàn thành luận án.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Sinh học nhiệt đới, đặc biệt là thầy GS.TS. Hoàng Nghĩa Sơn, thầy hướng dẫn khoa học, mặc dù rất bận rộn với công việc nhưng thầy luôn quan tâm chỉ đạo, hướng dẫn, cũng như tạo mọi điều kiện cho tôi được học tập nghiên cứu và thực hiện đề tài tại Viện Sinh học nhiệt đới. Đồng thời cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Thị Phương Thảo, người luôn đưa ra những lời khuyên, góp ý quý báu và chỉ dẫn chi tiết các vấn đề liên quan đến kiến thức, qui trình trong suốt quá trình học tập tại viện.

Xin chân thành cảm ơn ban lãnh đạo, phòng đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam. Tôi cũng xin chân thành cảm ơn 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 đã hỗ trợ cho nghiên cứu này.

Ngoài ra gửi lời cảm ơn chân thành đến tất cả các anh, chị, em Viện Sinh học Nhiệt Đới đã hỗ trợ góp ý chỉ dẫn và hỗ trợ trong quá trình thực hiện luận án.

Cảm ơn chị Hồ Thị Uyên Khương- Giám đốc Văn phòng đại diện Becton-Dickinson Việt Nam đã động viên và khích lệ trong quá trình công tác và học tập.

Đặc biệt xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới các thành viên trong gia đình Ba, Má, em trai, Bố, Mẹ, vợ Lê Thụy Hồng Khả, con Trương Thụy Xuân Hồng, Trương Xuân Phúc đã luôn quan tâm, khích lệ, động viên trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu, viết bài để hoàn thành cuốn luận án này.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 13 tháng 11 năm 2023



Trương Xuân Đại

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	vii
DANH MỤC BẢNG	viii
DANH MỤC HÌNH	ix
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	4
1.1. Giới thiệu về vi trọng lực và vi trọng lực mô phỏng.....	4
1.1.1. Vi trọng lực.....	4
1.1.2. Vi trọng lực mô phỏng.....	4
1.2. Các thí nghiệm không gian	5
1.3. Những thay đổi diễn ra trong các chuyến bay ngoài không gian.....	5
1.3.1. Ảnh hưởng của vi trọng lực lên sức khỏe sinh sản	6
1.3.2. Ảnh hưởng đối với cá thể cái	7
1.4. Ảnh hưởng của vi trọng lực lên sự thụ tinh và thai kỳ	9
1.5. Các thiết bị vi trọng lực mô phỏng.....	12
1.5.1. Clinostat	14
1.5.2. Buồng quay.....	15
1.5.3 Máy định vị ngẫu nhiên.....	15
1.5.4. Hệ thống nâng nghịch từ.....	17
1.6. Tổng quan về noãn và tế bào hạt nang noãn heo	17
1.6.1. Sơ lược về cấu tạo buồng trứng	17
1.6.2. Sự hình thành và trưởng thành của noãn.....	18
1.6.3. Sự hình thành và phát triển của nang noãn	18
1.6.3.1 Sự hình thành của nang noãn	18
1.6.3.2 Sự phát triển của nang noãn.....	19
1.6.4. Tế bào hạt nang noãn.....	20
1.6.4.1 Nguồn gốc và cấu tạo.....	20
1.6.4.2 Chức năng	20

1.7. Sự tăng sinh và chu kỳ tế bào	20
1.7.1. Chu kỳ tế bào	21
1.7.2. Các giai đoạn trong chu kỳ tế bào nhân chuẩn	21
1.7.3. Các kinase phụ thuộc cycline điều khiển chu kỳ tế bào	21
1.7.4. Sự chết theo chương trình (apoptosis)	23
1.7.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của vi trọng lực lên sự tăng sinh của tế bào ..	25
1.8. Khung xương tế bào	25
1.8.1. Tổ chức và cấu trúc khung xương tế bào	26
1.8.2. Những nghiên cứu về ảnh hưởng của vi trọng lực lên khung xương tế bào	27
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
2.1. Đối tượng	30
2.1.1. Tế bào hạt nang noãn heo	30
2.1.2. Thiết bị và dụng cụ cần thiết	30
2.1.3. Hệ thống vi trọng lực mô phỏng	33
2.2. Phương pháp nghiên cứu	34
2.2.1. Nuôi cấy tế bào	34
2.2.1.1. Thu mẫu buồng trứng	34
2.2.1.2. Phương pháp thu nhận nang noãn đơn	34
2.2.1.3. Phương pháp thu nhận và nuôi cấy pGC	34
2.2.1.4. Phương pháp cấy chuyển pGC	34
2.2.2. Phương pháp nhuộm nhân pGC	35
2.2.3. Phương pháp thử nghiệm vi trọng lực	35
2.2.3.1. Tế bào nuôi trong đĩa 96 giếng	35
2.2.3.2. Tế bào nuôi trong đĩa T25	36
2.2.4. Phương pháp đánh giá sự tăng sinh tế bào	36
2.2.4.1. Đánh giá mật độ tế bào bằng phương pháp WST-1	36
2.2.4.2. Đánh giá chu kỳ tế bào, biểu hiện dịch mã	37
2.2.5. Phương pháp đánh giá quá trình tế bào chết theo chương trình	41
2.2.5.1. Đánh giá tỉ lệ tế bào chết theo chương trình bằng phương pháp tế bào dòng chảy	41

2.2.5.2. <i>Đánh giá biểu hiện phiên mã của các gen apoptosis</i>	42
2.2.6. <i>Phương pháp đánh giá sự thay đổi hình thái tế bào</i>	43
2.2.6.1. <i>Phương pháp đánh giá hình thái nhân</i>	44
2.2.6.2. <i>Phương pháp đánh giá hình thái tế bào chất</i>	44
2.2.7. <i>Phương pháp đánh giá sự thay đổi cấu trúc khung xương tế bào</i>	44
2.2.7.1. <i>Đánh giá biểu hiện phiên mã các gene vi ống, vi sợi</i>	44
2.2.7.2. <i>Đánh giá biểu hiện dịch mã các gene vi ống, vi sợi</i>	45
2.2.8. <i>Phương pháp thống kê</i>	46
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	47
3.1. <i>Kết quả thu nhận và nuôi cấy tế bào pGC</i>	47
3.1.1. <i>Kết quả thu nhận nang trứng và tế bào pGC</i>	47
3.1.2. <i>Kết quả nuôi cấy, cấy chuyên và tăng sinh tế bào pGC</i>	49
3.2. <i>Kết quả đánh giá sự tăng sinh của pGC dưới điều kiện vi trọng lực</i>	51
3.2.1. <i>Kết quả đánh giá sự thay đổi mật độ tế bào bằng WST-1</i>	51
3.2.2. <i>Kết quả đánh giá sự thay đổi mật độ tế bào bằng phần mềm Cytell</i> ...	51
3.2.3. <i>Kết quả đánh giá chu kỳ tế bào</i>	52
3.2.3.1. <i>Kết quả đánh giá tỉ lệ các pha</i>	52
3.2.3.2. <i>Kết quả đánh giá biểu hiện phiên mã cdk4, cdk6</i>	53
3.2.3.3. <i>Kết quả đánh giá biểu hiện phiên mã cyclin A, cyclin D</i>	54
3.2.3.4. <i>Kết quả đánh giá dịch mã của Cdk4 và Cdk6</i>	55
3.2.3.5. <i>Kết quả đánh giá dịch mã của Cyclin A, Cyclin D</i>	57
3.3. <i>Kết quả đánh giá quá trình apoptosis</i>	59
3.3.1. <i>Kết quả đánh giá tỉ lệ apoptosis</i>	59
3.3.2. <i>Kết quả đánh giá biểu hiện phiên mã của các gene apoptosis</i>	60
3.4. <i>Kết quả đánh giá sự thay đổi hình thái tế bào</i>	61
3.4.1. <i>Kết quả đánh giá sự thay đổi hình thái nhân</i>	61
3.4.2. <i>Kết quả đánh giá các dạng hình thái tế bào hạt</i>	63
3.5. <i>Kết quả đánh giá sự thay đổi cấu trúc khung xương tế bào</i>	64
3.5.1. <i>Kết quả đánh giá ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực lên vi ống</i>	64
3.5.1.1. <i>Đánh giá sự thay đổi của vi ống ở mức phiên mã</i>	64
3.5.1.2. <i>Đánh giá sự thay đổi cấu trúc vi ống</i>	65

3.5.1.3. <i>Đánh giá sự thay đổi của vi ống ở mức dịch mã</i>	66
3.5.2. <i>Kết quả đánh giá ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực lên vi sợi</i>	66
3.5.2.1. <i>Đánh giá sự thay đổi của vi sợi ở mức phiên mã</i>	66
3.5.2.2. <i>Đánh giá sự thay đổi cấu trúc vi sợi</i>	67
3.5.2.3. <i>Đánh giá sự thay đổi của vi sợi ở mức dịch mã</i>	68
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	73
KẾT LUẬN	73
KIẾN NGHỊ	73
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	74
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	75
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
Bax	Bcl-2-associated X protein	Protein X liên kết Bcl-2
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	Protein lymphoma tế bào B-2
CCs	Cumulus Cells	Tế bào cumulus
CDK	Cycline Dependent Kinases	Kinase phụ thuộc Cycline
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit Deoxyribonucleic
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium	Môi trường Dulbecco's modified Eagle
eCG	Equine chorionic gonadotropin	Huyết thanh thai ngựa
FSH	Follicle Stimulating Hormone	Hormone kích thích nang noãn
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh thai bò
GC	Granulosa Cell	Tế bào hạt nang noãn
HZE	High Energy	Năng lượng cao
ISS	International Space Station	Trạm vũ trụ quốc tế
LET	Linear Energy Transfer	Chuyển năng lượng tuyến tính
LH	Luteinizing Hormone	Hormone tạo hoàng thể
NASA	National Aeronautics and Space Administration	Cơ quan hàng không và vũ trụ Hoa Kỳ
pGC	Porcine Granulosa Cell	Tế bào hạt nang noãn heo
PI	Propidium Iodide	Thuốc nhuộm Propidium I ốt
RPM	Random Positioning Machine	Máy định vị ngẫu nhiên
RWV	Rotating wall vessel	Buồng quay
RNA	Ribonucleic Acid	Axit Ribonucleic
SMG	Simulated microgravity	Vi trọng lực mô phỏng
WST-1	Water soluble tetrazolium salt	Muối tetrazolium tan trong nước

DANH MỤC CÁC BẢNG

<i>Bảng 1.1.</i> Chi phí cho các nghiên cứu thí nghiệm không gian	5
<i>Bảng 1.2.</i> Cyclin và CDK: Tên gọi và vai trò trong chu kỳ tế bào	22
<i>Bảng 2.1.</i> Danh mục các thiết bị dùng trong nghiên cứu	30
<i>Bảng 2.2.</i> Danh mục các dụng cụ dùng trong nghiên cứu	31
<i>Bảng 2.3.</i> Danh mục hóa chất môi trường dùng trong nghiên cứu	32
<i>Bảng 2.4.</i> Thành phần cấu tạo của hệ thống Gravite tại Viện sinh học nhiệt đới.....	33
<i>Bảng 2.5.</i> Chu trình nhiệt của phản ứng real-time qRT-PCR cho các gene liên quan đến điều hòa chu kỳ tế bào	39
<i>Bảng 2.6.</i> Trình tự môi các gene điều hòa chu kỳ tế bào	39
<i>Bảng 2.7.</i> Chu trình nhiệt của phản ứng real-time qRT-PCR cho các gene liên quan đến apoptosis	43
<i>Bảng 2.8.</i> Trình tự môi các gene liên quan đến apoptosis	43
<i>Bảng 2.9.</i> Chu trình nhiệt của phản ứng real-time qRT-PCR cho các gene lên mã hóa khung xương tế bào	45
<i>Bảng 2.10.</i> Trình tự môi các gene mã hóa khung xương tế bào	45

DANH MỤC CÁC HÌNH

<i>Hình 1.1.</i> Skylab trạm không gian vũ trụ đầu tiên của Hoa Kỳ	4
<i>Hình 1.2.</i> Các vấn đề liên quan đến sức khỏe của phi hành gia ngoài không gian.....	6
<i>Hình 1.3.</i> Ảnh hưởng của HZE với noãn hoặc tế bào hạt	7
<i>Hình 1.4.</i> Khảo sát ảnh hưởng sức khỏe của phi hành gia nữ.....	9
<i>Hình 1.5.</i> Ảnh hưởng liên quan đến thụ tinh và thai kỳ ở phi hành gia nữ.....	12
<i>Hình 1.6.</i> Một số thiết bị mô phỏng vi trọng lực được sử dụng nghiên cứu.....	13
<i>Hình 1.7.</i> Thiết bị clinostat 1 trục quay	14
<i>Hình 1.8.</i> Mô hình cấu tạo của buồng quay	15
<i>Hình 1.9.</i> Máy định vị trí ngẫu nhiên với 2 trục vuông góc với nhau.....	16
<i>Hình 1.10.</i> Một số nhóm hệ thống tạo vi trọng lực mô phỏng điển hình.....	16
<i>Hình 1.11.</i> Vị trí và hình dạng buồng trứng heo	17
<i>Hình 1.12.</i> Cấu trúc của nang noãn trưởng thành	18
<i>Hình 1.13.</i> Các giai đoạn hình thành và phát triển của nang noãn	19
<i>Hình 1.14.</i> Vị trí tế bào hạt nang noãn	20
<i>Hình 1.15.</i> Chu kỳ tế bào	21
<i>Hình 1.16.</i> Phức hợp Cyclin – Cdk trong chu kỳ tế bào	22
<i>Hình 1.17.</i> Quá trình chữa lành các vết thương qua da của các tế bào trong điều kiện ảnh hưởng của vi trọng lực.....	24
<i>Hình 1.18.</i> Cấu trúc khung xương tế bào	26
<i>Hình 1.19.</i> Thành phần cấu trúc khung xương tế bào	27
<i>Hình 1.20.</i> Hình dạng tế bào và khung xương tế bào thay đổi trong điều kiện vi trọng lực	28
<i>Hình 2.1.</i> Sơ đồ tóm lược qui trình western blot	40
<i>Hình 2.2.</i> Sơ đồ tóm tắt các bước trong nội dung nghiên cứu	46
<i>Hình 3.1.</i> Tiến trình thu nhận nang noãn đơn từ buồng trứng heo	48
<i>Hình 3.2.</i> Kết quả nuôi cấy sơ cấp tế bào hạt.....	49
<i>Hình 3.3.</i> Hình thái tế bào pGC qua các lần cấy chuyển	50
<i>Hình 3.4.</i> Thử nghiệm WST-1 đánh giá sự tăng sinh tế bào pGC giữa SMG và đối chứng.....	51

<i>Hình 3.5.</i> Thử nghiệm đánh giá mật độ pGC bằng Cell Cycle App của kính hiển vi huỳnh quang Cytell	52
<i>Hình 3.6.</i> Phân tích chu kỳ tế bào phần mềm Cell Cycle App của kính hiển vi huỳnh quang Cytell	53
<i>Hình 3.7.</i> Kết quả phân tích real-time RT-PCR của gene <i>cdk4</i> và <i>cdk6</i> ở pGC	54
<i>Hình 3.8.</i> Kết quả phân tích real-time RT-PCR gene <i>cyclin D</i> , <i>cyclin A</i> ở pGC	55
<i>Hình 3.9.</i> Sự biểu hiện protein Cdk4 và Cdk6	56
<i>Hình 3.10.</i> Sự biểu hiện protein Cyclin D và Cyclin A1 + A2	57
<i>Hình 3.11.</i> Phân tích sức sống và quá trình apoptosis của pGC	60
<i>Hình 3.12.</i> Kết quả phân tích real-time RT-PCR gene <i>bax</i> và <i>bac1-2</i> của pGC	61
<i>Hình 3.13.</i> Đánh giá hình thái nhân tế bào pGC bằng phần mềm Cell Cycle.	62
<i>Hình 3.14.</i> Giá trị hình thái nhân tế bào phân tích bằng Cytell	63
<i>Hình 3.15.</i> Hình thái của các pGC	64
<i>Hình 3.16.</i> Sự biểu hiện gen α - <i>tubulin</i> của pGC	65
<i>Hình 3.17.</i> Kết quả nhuộm protein tubulin cấu thành nên vi ống của pGC	65
<i>Hình 3.18.</i> Sự biểu hiện protein α -tubulin	66
<i>Hình 3.19.</i> Sự biểu hiện gen β - <i>actin</i> của pGC	67
<i>Hình 3.20.</i> Kết quả nhuộm hệ thống vi sợi của pGC bằng phalloidin	68
<i>Hình 3.21.</i> Sự biểu hiện protein β -actin	69

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

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 gia 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 tỉ 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 mỡ hồi, 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, việc tìm hiểu vai trò của vi trọng lực ảnh hưởng thế nào đối với sinh vật ở mức độ tế bào là vô cùng quan trọng. Gần đây, các nghiên cứu về sự ảnh hưởng của vi trọng lực đến sự phát triển của tế bào cũng như những thay 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 và 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 nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực mô phỏng trên đối tượng tế bào hạt nang noãn heo đến thời điểm hiện tại cũng chưa có nghiên cứu công bố kết quả 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 trên tế bào hạt nang noãn heo (porcine granulosa cell viết tắt pGC). Sở dĩ pGC được sử dụng cho nghiên cứu này vì các tế bào hạt là những tế bào được nghiên cứu chuyên sâu nhất trong các tế bào liên quan đến hệ sinh sản ở nữ giới do chúng tham gia vào quá trình điều hòa sự phát triển của nang trứng, sự rụng trứng cũng như chức năng của thể và có ảnh hưởng đến các hormone ở nữ giới.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Từ những lí 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, thông qua việc xác định các thay đổi về mặt hình thái tế bào, sự tăng sinh và cấu trúc khung xương tế bào 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 các khảo sát cũng sẽ tập trung vào việc khảo sát các biểu hiện của các protein cấu trúc như α -tubulin và β -actin trong việc tái cấu trúc khung xương tế bào.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Tế bào pGC là đối tượng được sử dụng cho nghiên cứu của đề tài luận án vì heo có nhiều đặc điểm tương đồng với người về kích thước, sinh lý, giải phẫu, trao đổi chất và chúng cũng đã được phát triển thành một hình mẫu lý tưởng để nghiên cứu cho y sinh, đặc biệt là sinh học phát triển và sinh sản.

Thêm vào đó, pGC thường được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu chức năng tế bào hạt, sự tăng sinh và biệt hóa của các pGC được thể hiện một cách đặc trưng dưới các điều kiện nuôi cấy khác nhau. Do đó với những tính chất gần tương đồng với tế bào hạt nang noãn của nữ giới, trong phạm vi nghiên cứu của luận án cần khảo sát sự thay đổi về hình thái và cấu trúc bên trong tế bào pGC ở các mức độ khác nhau trong điều kiện vi trọng lực.

4. Nội dung nghiên cứu chính của luận án

Nội dung luận án sẽ tập trung vào các nội dung nghiên cứu chính như sau:

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

5. 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. Qua đó bổ sung vào sự hiểu biết hơn về đặc tính cũng như sự ảnh hưởng của tế bào hạt nang noãn 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 chết theo chu trình 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. 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 trong 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.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

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

1.1.1. Vi trọng lực: Trên trái đất, mọi vật đều chịu tác động của trọng lực hay lực hút của trái đất, đây là một lực hấp dẫn luôn tồn tại giữa hai vật có trọng lượng, là một yếu tố vật lý không đổi trên trái đất giúp định hình sự tiến hóa của sự sống trên trái đất. Do đó, sự sinh sản của tất cả các động vật trên trái đất đều phải thích nghi với trọng lực của trái đất và bất kỳ thay đổi nào diễn ra liên quan đến trọng lực cũng ảnh hưởng đến quá trình sinh sản và phát triển. Trong khi đó theo định nghĩa của cơ quan hàng không và vũ trụ Hoa Kỳ (NASA) tình trạng vi trọng lực là tình trạng người hoặc vật ở trạng thái gần như không trọng lượng [1]. Thuật ngữ "vi trọng lực" ("microgravity"), " μg ", hoặc "môi trường micro-g" thường được sử dụng như một từ đồng nghĩa của "không trọng lực" ("weightlessness"), "zero-g". Tuy nhiên, điều này chỉ ra rằng g không thực sự bằng 0, mà chỉ là rất nhỏ gần như không đáng kể. Mức độ vi trọng lực có thể đạt được giá trị khoảng từ 10^{-3} đến $10^{-6}g$ [2]. Điều này cũng được ghi nhận khi các phi hành gia sống trong trạm vũ trụ không gian đầu tiên của Hoa Kỳ.



Hình 1.1. Skylab trạm vũ không gian đầu tiên của Hoa Kỳ [1].

1.1.2. Vi trọng lực mô phỏng: Vi trọng lực mô phỏng hoặc mô phỏng tình trạng vi trọng lực được định nghĩa là việc sử dụng các dụng cụ, thiết bị hỗ trợ trên trái đất như: buồng quay, hệ thống có trục quay vuông góc với hướng của vector trọng lực, máy định vị ngẫu nhiên,... để tạo ra điều kiện môi trường

tương tự vi trọng lực ngoài không gian, chủ yếu nhằm mục đích thực hiện các nghiên cứu và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng cần quan tâm [3].

1.2. Các thí nghiệm không gian

Mặc dù các thí nghiệm trong không gian lần đầu tiên thực hiện từ cách đây hơn 50 năm, bắt đầu với các đối tượng đơn giản như vi sinh vật, sau đó đến thực vật và cả động vật. Tuy nhiên, do hạn chế từ các rào cản liên quan đến công nghệ hỗ trợ bên ngoài không gian, cũng như việc thực hiện các thí nghiệm trên quỹ đạo trong môi trường vi trọng lực thực sự cũng như các điều kiện phơi nhiễm trên quỹ đạo như bức xạ, chu kỳ sinh học, căng thẳng, lực g... đã gây ra những khó khăn nhất định ảnh hưởng tới các kết quả thực hiện các thí nghiệm trong không gian [4]. Ngoài ra, mỗi lần thực hiện các thí nghiệm này, chi phí đắt đỏ, thời gian chờ lâu, qui trình nghiêm ngặt cũng là một phần nguyên nhân làm giảm số lượng nghiên cứu liên quan đến việc thử nghiệm đánh, giá và so sánh các đối tượng trong điều kiện trên trái đất và ngoài không gian.

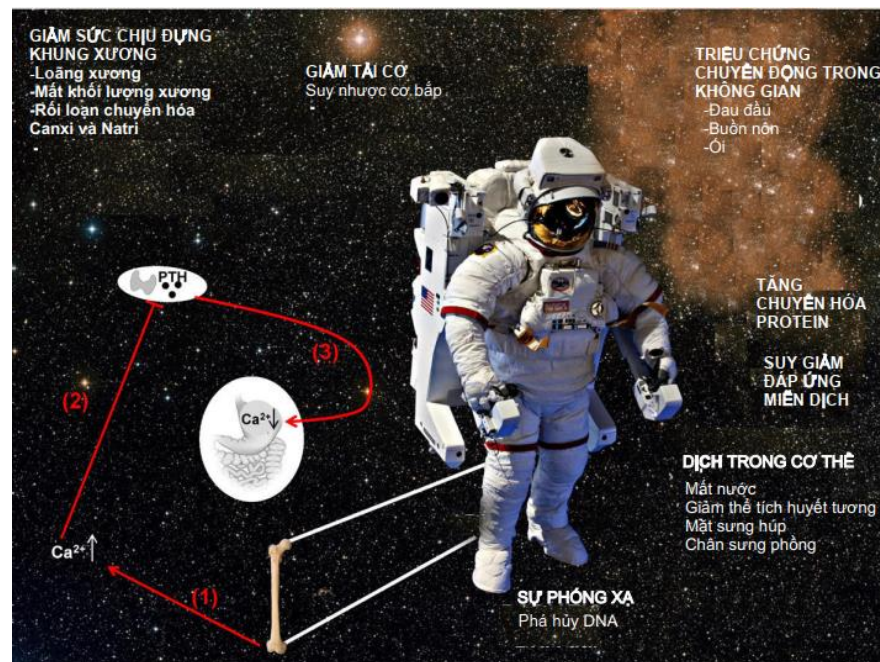
Bảng 1.1. Chi phí cho các nghiên cứu thí nghiệm không gian [5].

Phương thức	Thời gian chờ (tháng)	Chi phí (USD)	Chi phí cho 1 thí nghiệm (USD)
Tháp rơi	>2	> 10.000	5.000
Máy bay vi trọng lực	>2	1.500.000	135.000
Tên lửa nghiên cứu	>24	> 2.000.000	> 400.000
ISS	>60	>10.000.000	1-5.000.000

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

Trên trái đất, con người tiếp xúc chủ yếu với các photon truyền năng lượng tuyến tính thấp (LET), bức xạ (tia X và γ có giá trị LET < 10 keV/ μ m) trong khi trường bức xạ trong không gian chứa các electron, proton, neutron, hạt alpha, và hạt nhân nặng với năng lượng rất cao (HZE), giá trị LET > 10

keV/ μm . Trong khoảng không vũ trụ, các bức xạ bao gồm các vũ trụ trong thiên hà, bức xạ hạt tích điện bên ngoài hệ mặt trời, theo các số liệu nghiên cứu khoảng 1/3 DNA bị tổn thương do bức xạ ion hóa khi tiếp xúc với bức xạ vũ trụ [6]. Ngoài ra các ảnh hưởng cũng tác động đến việc giảm sức chịu đựng của khung xương, tăng chuyển hóa Protein, hay sự thay đổi các dịch trong cơ thể phi hành gia cũng được phát hiện [7]. Với những điều kiện vô cùng khắc nghiệt như vậy, khả năng ảnh hưởng và tác động về mặt biểu hiện sinh lý bên ngoài cũng như các quá trình trao đổi chất xảy ra bên trong cơ thể lên các phi hành gia là rất lớn và cần được theo dõi một cách chặt chẽ để có những biện pháp bảo vệ phù hợp nhất cho các phi hành gia.



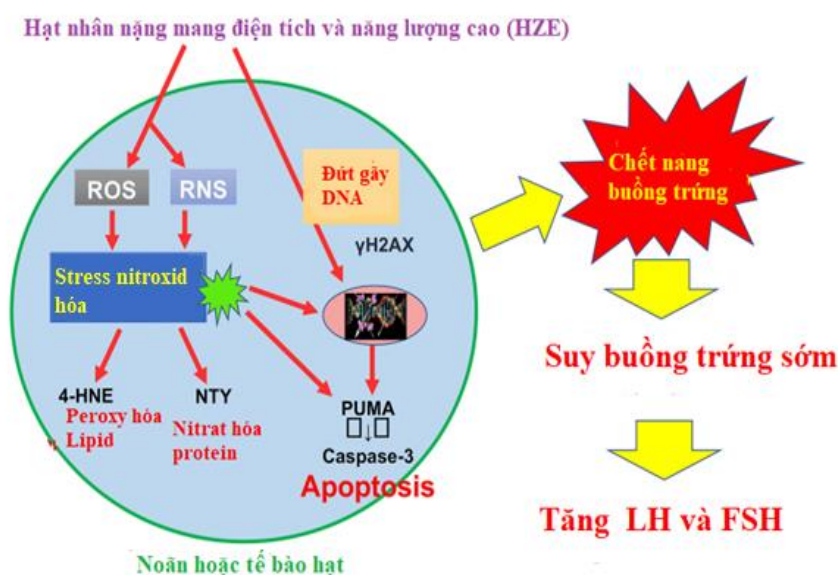
Hình 1.2. Các vấn đề liên quan đến sức khỏe của phi hành gia ngoài không gian [7].

(1) giải phóng canxi từ xương, (2) ức chế hormone tuyến cận giáp, (3) giảm hấp thu canxi

1.3.1. Ảnh hưởng của vi trọng lực lên sức khỏe sinh sản

Trên trái đất, con người phát triển trong trường hấp dẫn với giá trị của trọng lực là 1G, trong khi môi trường vi trọng lực ngoài không gian có điều kiện vô cùng khắc nghiệt với độ biến thiên của trọng lực từ 10^{-3} đến $10^{-6}g$, nhiệt độ dao động từ 153 đến 393 K (Kelvin), áp lực 10^{-7} đến 10^{-4} Pa [8]. Từ những điều kiện như vậy sẽ góp phần ảnh hưởng và gây ra nhiều hiệu ứng sinh lý bao gồm: thay đổi chất lỏng, cân bằng điện giải, thay đổi mạch máu tim,

giảm mật độ khoáng trong xương, tăng tỉ lệ mỡ trong cơ thể, teo cơ, kháng insulin thay đổi thị giác, chức năng tiền đình, thay đổi dung tích phổi, tăng mức lọc cầu thận, giảm mờ hôi. Ảnh hưởng tim mạch bao gồm: giảm thể tích tâm thất trái, giảm huyết áp, tăng tần suất rối loạn nhịp tim, tăng căng thẳng oxy hóa [6]. Tất cả các triệu chứng trên góp phần làm ảnh hưởng đến sức khỏe sinh lí sinh sản của phi hành gia trong gian đoạn trước và sau khi thực hiện sứ mệnh chuyển bay ngoài không gian và trở về lại trái đất.



Hình 1.3. Ảnh hưởng của HZE với noãn hoặc tế bào hạt [6].

1.3.2. Ảnh hưởng đối với cá thể cái

Hệ thống sức khỏe sinh sản ở nữ giới được điều chỉnh bởi hàng loạt các hormone. Hệ thống này bị tác động của các chuyến bay trong không gian làm ảnh hưởng đến hệ thống sinh sản của nữ giới bằng nhiều cách khác nhau. Các nữ phi hành gia thường dùng hoặc gián đoạn tạm thời chu kỳ kinh nguyệt trong thời gian thực hiện các chuyến bay vào không gian, biện pháp phổ biến nhất là sử dụng thuốc tránh thai có sự phối hợp của oestrogen và progestin. Các nữ phi hành gia cũng đồng thời hoãn việc sinh con cho đến khi họ hoàn thành nhiệm vụ thực hiện các chuyến bay vào không gian [6].

Theo nghiên cứu của Albi và cộng sự cho thấy, trong điều kiện vi trọng lực các tế bào tuyến giáp sẽ bị ảnh hưởng dẫn đến một loạt các chức năng sinh

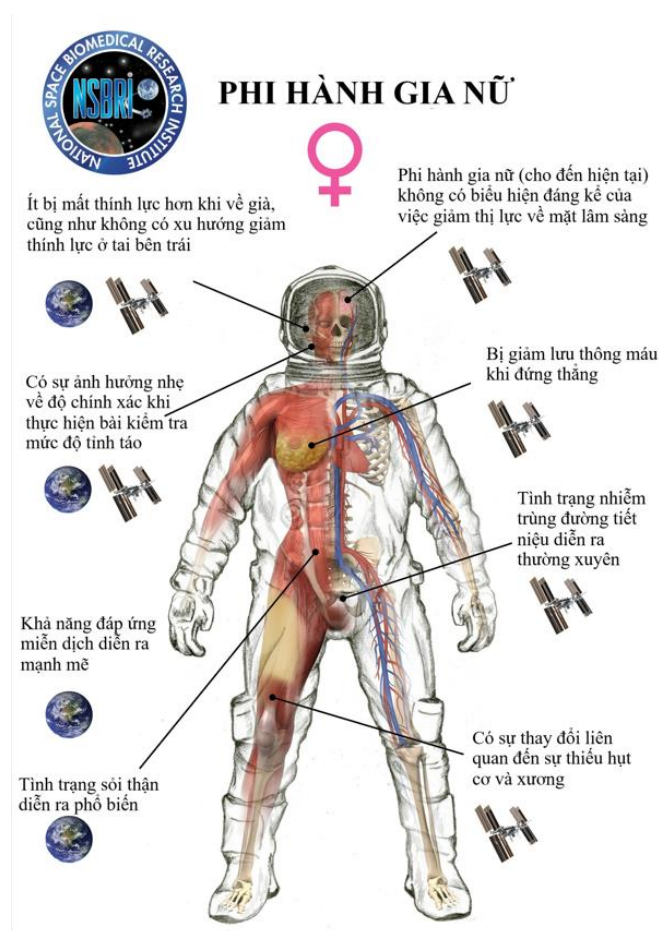
lí khác của cơ thể cũng bị ảnh hưởng theo vì đây được xem là cơ quan đóng vai trò quan trọng trong việc sản sinh ra hormone tuyến giáp giúp kiểm soát sự trao đổi chất của phổi, tim, hệ thần kinh và điều chỉnh chu kỳ kinh nguyệt ở nữ giới [9]. Tổng hợp nhiều nghiên cứu khác nhau Mishra và cộng sự báo cáo đánh giá tác động của vi trọng lực lên sự phát triển nang thứ cấp của buồng trứng, khi nuôi cấy 1 phần buồng trứng chuột từ ngày thứ 14 tại Viện nghiên cứu Ung thư cho thấy các tế bào bị phá vỡ do tiếp xúc với vi trọng lực mô phỏng. Các tác giả cũng đã ghi nhận có sự giảm số lượng nang noãn khỏe mạnh trên một đơn vị diện tích, không có sự tăng sinh của tế bào hạt trong nang thứ cấp sử dụng nhuộm miễn dịch không phát hiện thấy protein GDF9 trong nang thứ cấp sau 2 và 4 ngày nuôi cấy dưới điều kiện vi trọng lực mô phỏng so với điều kiện đối chứng. Ngược lại, phân lập các nang thứ cấp trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng 4 ngày và có sự phát triển tế bào noãn tương tự như các nang noãn thứ cấp được nuôi cấy trong điều kiện trọng lực bình thường [6]. Wu và cộng sự cũng đã khảo sát và cho thấy vi trọng lực mô phỏng cũng có sự ảnh hưởng đối với sự trưởng thành của tế bào trứng khi nuôi cấy trong hệ thống buồng quay [10].

Các tế bào trứng được thu ở giai đoạn túi mầm chưa trưởng thành của chuột Kunming 48 giờ sau khi tiêm 7,5 IU eCG kích thích phát triển của nang noãn trước phóng noãn. Noãn được nuôi cấy trong môi trường bổ sung FSH, LH và oestradiol tối đa 16 giờ trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng hoặc trọng lực điều kiện bình thường nuôi cấy tĩnh (nhóm đối chứng). Tuy nhiên tỉ lệ phần trăm tế bào noãn đạt đến kỳ giữa của lần phân chia thứ hai, được đánh giá sự hiện diện của thể cực thứ nhất, 73% trong điều kiện 1G nhưng chỉ có 9% trong điều kiện vi trọng lực. Nghiên cứu này cũng phát hiện ra rằng trong điều kiện vi trọng lực có liên quan đến sự bất thường thoi vô sắc trong suốt cả lần phân chia thứ nhất và thứ hai, với sự bất thường của vị trí γ - tubulin xung quanh nhiễm sắc thể của tế bào noãn được nuôi trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng [6].

Ngược với tổ chức bất thường của vi ống, cấu trúc và chức năng của vi sợi cần thiết cho sự hình thành và di chuyển của thoi vô sắc không bị ảnh

hưởng dưới điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Liệu tế bào trứng có thể tiếp tục giảm phân bình thường hay không vẫn là một câu hỏi cần thêm các nghiên cứu để trả lời. Đối với nguyên phân đã có những báo cáo cho thấy có sự gián đoạn 20 giờ trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng, điều này cho thấy có lẽ việc tiếp tục tương tự trong giảm phân sẽ xảy ra với nhiều thời gian hơn [11].

Khi thực hiện 1 số nghiên cứu khảo sát ở nam và nữ phi hành gia các nhà nghiên cứu phát hiện ra rằng, các biểu hiện liên quan về mặt lâm sàng liên quan đến thị giác, thính giác ở phi hành gia nữ ít bị ảnh hưởng so với nam, tuy nhiên tình trạng nhiễm trùng đường tiết niệu hay sỏi thận, thiếu hụt cơ xương diễn ra rất phổ biến ở phi hành gia nữ.



Hình 1.4. Khảo sát ảnh hưởng của sức khỏe phi hành gia nữ [12].

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

Trong các nghiên cứu ảnh hưởng của các chuyến bay vũ trụ đối với sự thụ tinh và thai kỳ, chuột Sparague-Dawley được phóng lên quỹ đạo từ Trung

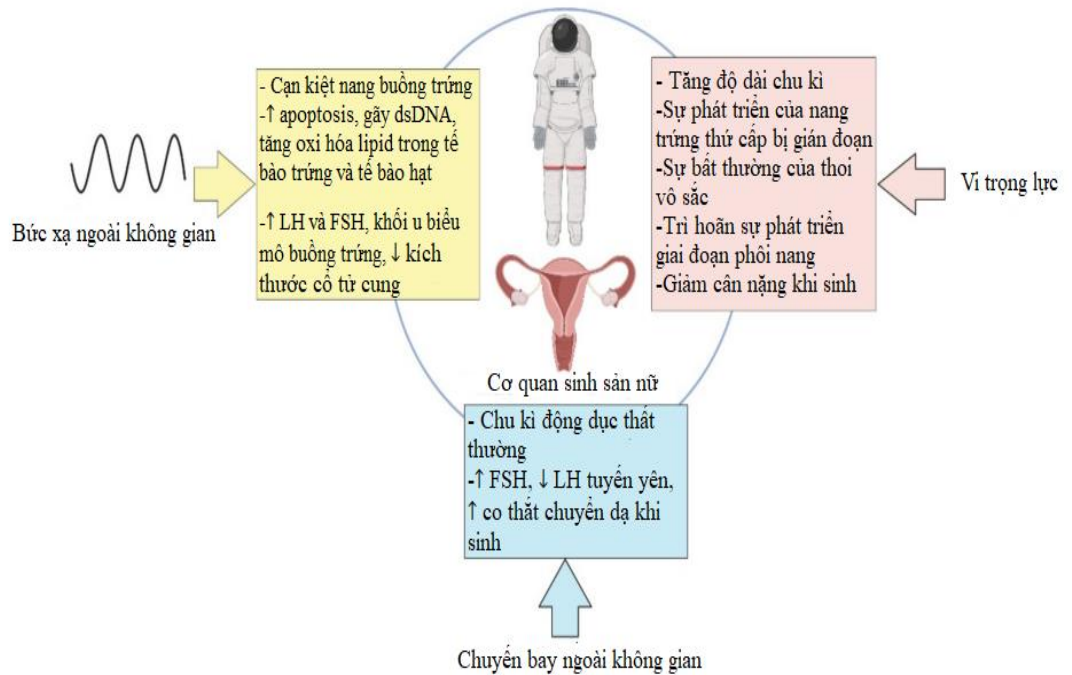
tâm vũ trụ Kennedy vào ngày thai kỳ thứ 9 (nghiên cứu NIH.R1) hoặc ngày thai kỳ thứ 11 (nghiên cứu NIH.R2) và trở lại mặt đất vào ngày thai kỳ thứ 20. Chuột trong nhóm nghiên cứu NIH.R1 được gây mê 3 giờ sau khi hạ cánh để thu thập sừng tử cung sau đó chúng được phục hồi và sinh con theo đường âm đạo trong sừng tử cung còn lại. Các con chuột mẹ đã chết 3 giờ sau sinh và các con con được ghép đôi với các con chuột mẹ không trải qua các chuyến bay trong không gian [13], [14]. Chuyến bay trong không gian giữa thai kỳ ngày thứ 9 và 20 (nghiên cứu NIH.R1) không làm thay đổi sự tăng cân của chuột mẹ trong thời kỳ mang thai, thời gian mang thai, thời gian sinh con, lứa đẻ, trọng lượng buồng trứng, tuyến yên, số lượng buồng trứng khỏe mạnh, nồng độ hormone progesterone hoặc luteinizing trong huyết thanh hoặc nồng độ của nội tiết tố kích thích nang noãn (FSH) trong tuyến yên so với nhóm đối chứng (giống nhau về tất cả mọi mặt, chỉ ngoại trừ không thực hiện chuyến bay) [13].

Thông qua các nghiên cứu trên một số đối tượng cá, lưỡng cư, động vật không xương sống, bằng việc thực hiện khảo sát thí nghiệm thông qua hệ thống tàu vũ trụ. Các nghiên cứu này cho thấy rằng sự thụ tinh và phát triển của phôi diễn ra trong môi trường không gian đã xảy ra các bất thường được ghi nhận ở nhím biển (*Lytechinus pictus*), ếch (*Xenopus laevis*) và sa giông (*Pleurodeles waltl*) [15]–[17]. Những bất thường này bao gồm giảm sự phóng noãn, giảm sự thụ tinh ở nhím biển và tăng độ dày của khoang phôi ở ếch. Bốn cá thể cá Medaka (*Oryzias latipes*) là động vật có xương sống đầu tiên giao phối thành công trong không gian trong suốt sứ mệnh 15 ngày trên tàu con thoi, các cá thể này đẻ được 43 trứng, trong đó nở được 8 cá bột trong không gian và 30 cá bột nở khi tàu con thoi hạ cánh xuống trái đất [18]. Các nghiên cứu đầu tiên để xem xét tác động của chuyến bay vũ trụ trên các động vật có vú giao phối và mang thai được tiến hành trong vệ tinh nhân tạo không người lái. Cá thể chuột đực và cái đã được bay trong 18,5 ngày trên vệ tinh nhân tạo COSMOS-1129. Những con đực và con cái ban đầu được tách biệt sau đó chúng được cho phép giao phối với nhau, nhưng giao phối không được giám sát. Sau khi hạ cánh trở lại mặt đất, 2 trong số 5 con được thông báo có dấu hiệu mang thai sớm với sự tái hấp thu trong khi không thể xác định xem những con chuột

không có dấu hiệu mang thai bị rối loạn chu kỳ động dục do không rụng trứng hoặc các vấn đề liên quan đến giao phối, thụ tinh hay ghép đôi. Chuột cái mang thai vào ngày thai kỳ thứ 13 khi hạ cánh xuống ngày thứ 18 trên vệ tinh nhân tạo COSMOS- 1514 chỉ nặng hơn 8% so với 2 nhóm đối chứng, mặc dù lượng thức ăn tiêu thụ của các nhóm trên là như nhau. Các chuột cái tiếp xúc với lực hấp dẫn (1.5 g và 2.3 g) gây ra bởi quá trình ly tâm, kết quả kéo dài giai đoạn không động dục của chu kỳ động dục, giai đoạn không động dục kéo dài 10-16 ngày (giai đoạn không động dục bình thường dài 1-2 ngày) [6].

Đối với con người, từ khi con người lần đầu tiên ra ngoài trái đất để chinh phục không gian năm 1961 đến nay, có gần 600 nhà du hành vũ trụ đã bay ra ngoài không gian, tuy nhiên số lượng nữ phi hành gia chỉ chiếm 1/10 trong tổng số phi hành gia. Sở dĩ có sự khác biệt như vậy là vì những e ngại liên quan đến đặc điểm sinh lí ở các phi hành gia nữ chưa được tìm hiểu và nghiên cứu một cách đầy đủ cũng như những rủi ro tiềm ẩn ngoài không gian liệu có đảm bảo an toàn cho các nữ phi hành gia sau khi thực hiện nhiệm vụ và quay về lại trái đất. Ngoài ra, đối với tất cả các tế bào, mô trong cơ thể thì tuyến sinh dục là một trong những cơ quan nhạy cảm nhất với bức xạ, nên cần được quan tâm và nghiên cứu. Một trong những ảnh hưởng của nữ giới khi chịu tác động của vi trọng lực được mô tả bao gồm một loạt các dấu hiệu: tăng độ dài chu kỳ kinh nguyệt hơn bình thường, gián đoạn sự phát triển của nang trứng thứ cấp, thai vô sắc có biểu hiện bất thường, trì hoãn sự phát triển của phôi nang, giảm cân nặng khi sinh [6], [19], [20]. Một câu hỏi nữa cũng cần làm rõ là liệu có sự gia tăng nguy cơ ung thư đối với các nữ phi hành gia khi trở về trái đất sau khi thực hiện các chuyến bay vào vũ trụ hay không. Năm 2022 một nhóm hơn 20 nhà khoa học đến từ NASA và các trung tâm nghiên cứu của Hoa Kỳ, Anh, Ý đã có những tổng hợp và khảo sát về vấn đề này. Tuy nhiên, theo kết luận của các nhà khoa học trên cho thấy với các dữ liệu còn rất ít và hạn chế hiện nay, cùng với lượng phi hành gia nữ tham gia khảo sát còn ít và thời gian tiếp xúc không đủ dài nên chưa có cơ sở đáng tin cậy về tác động của các tia bức xạ trong không gian và vi trọng lực có gây nguy cơ ung thư đối với nữ phi hành gia hay không, và các nghiên cứu vẫn còn đang tiếp

tục thực hiện trong thời gian tới khi các chuyến bay lên sao hỏa hay mặt trăng với thời gian lưu lại ngoài không gian dài hơn [21].



Hình 1.5. Ảnh hưởng liên quan đến thụ tinh & thai kỳ ở phi hành gia nữ [21].

1.5. Các thiết bị vi trọng lực mô phỏng

Các sinh vật sống trên trái đất đều chịu tác dụng của trọng lực. Vì thế để xác định độ nhạy cảm của sinh vật đối với trọng lực, các nhà khoa học phải để cho các sinh vật tiếp xúc với các môi trường trọng lực đã bị thay đổi. Việc tăng hoặc giảm trọng lực là phát minh gần đây của con người và là cốt lõi khoa học của lĩnh vực sinh học trọng lực. Trong khoảng 50 năm gần đây, các nhà khoa học đã có thể thực hiện các thí nghiệm trực tiếp trong môi trường vi trọng lực ở ngay tại mặt đất thông qua các thiết bị mô phỏng vi trọng lực. Một phần vì sự phát triển mạnh mẽ của khoa học kỹ thuật, mặt khác các cơ hội cho các thí nghiệm trên môi trường không gian thực sự rất hiếm và cũng tốn kém rất nhiều chi phí. Đồng thời, có một số thí nghiệm đòi hỏi vật nghiên cứu phải tiếp xúc với môi trường vi trọng lực vài tuần hay vài tháng nhưng cũng có những thí nghiệm như nghiên cứu về chức năng của màng và hoạt động của khung xương tế bào chỉ cần tế bào ở trong điều kiện vi trọng lực khoảng vài ngày [22]. Vậy nên sự ra đời của các thiết bị mô phỏng các khía cạnh nhất định của vi trọng lực ngay trên mặt đất là một điều tất yếu và rất hữu ích giúp con người có thể nghiên

cứ tác động của môi trường này đến các quá trình sinh học, cơ chế cảm nhận trọng lực và sự định hướng thông qua trọng lực của sinh vật.

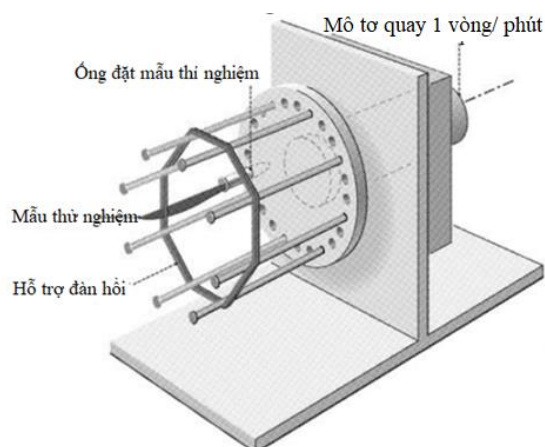


Hình 1.6. Một số thiết bị mô phỏng vi trọng lực được sử dụng nghiên cứu [23].
(**a:** tháp rơi, **b:** máy bay vi trọng lực, **c:** bên trong máy bay vi trọng lực, **d:** máy định vị ngẫu nhiên, **e:** tên lửa nghiên cứu, **f:** bắt đầu phóng tên lửa nghiên cứu, **g:** tên lửa nghiên cứu trên bệ phóng)

Trong những thập kỷ 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 không trọng lực hoặc rơi tự do trong các phòng thí nghiệm ngay trên mặt đất. Các hệ thống này không loại bỏ vector trọng lực mà thay vào đó nó thay đổi một cách ngẫu nhiên hướng của trọng lực đối với vật thí nghiệm hoặc tạo ra một lực đối nghịch để chống lại trọng lực [24]. Một số thiết bị mô phỏng vi trọng lực được sử dụng phổ biến hiện nay có thể kể đến là: tháp rơi, clinostat, buồng quay (RWV), máy định vị ngẫu nhiên (RPM),... Các tháp rơi tạo ra điều kiện vi trọng lực chủ yếu thông qua việc để vật thí nghiệm được rơi tự do nhưng chỉ có thể diễn ra trong vài giây [2]. Hệ thống clinostat sẽ tạo ra lực đối nghịch với trọng lực bằng các bộ phận xoay vòng từ từ và liên tục theo 2 chiều hoặc 3 chiều. Bằng cách này, các vật thí nghiệm sẽ không thể “cảm nhận” được hoặc không có đủ thời gian tối thiểu để đáp ứng với trọng lực. Một số thiết bị chủ yếu đã được phát triển để mô phỏng vi trọng lực, nhằm thực hiện các thí nghiệm trong không gian, các phương pháp chủ yếu rơi vào 3 loại:

1.5.1. Clinostat

Các thiết bị clinostat có một trục quay vuông góc với hướng của vector trọng lực được gọi là các clinostat 1-D hoặc 2-D, các clinostat có hai trục được gọi là các clinostat 3-D [2]. Mục tiêu của thiết bị clinostat này là để cho vật thí nghiệm tiếp xúc với sự tác động đa chiều của trọng lực để chống lại ảnh hưởng của thành phần có định hướng của vector trọng lực.



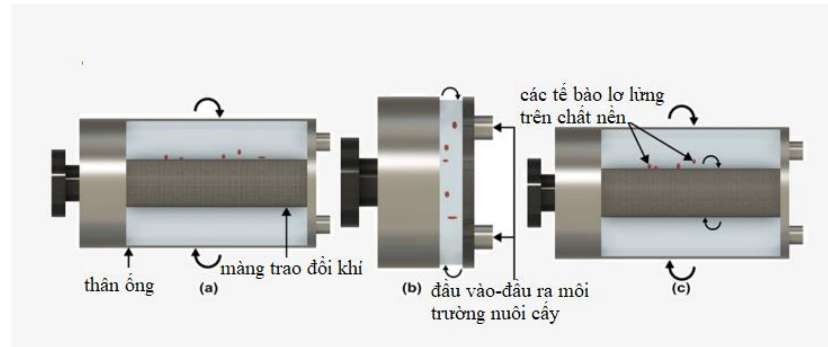
Hình 1.7. Thiết bị clinostat 1 trục quay [24].

Các thành phần khác nhau của vật thí nghiệm có thể “cảm nhận” được những thay đổi nhỏ trong sự định hướng của trọng lực. Điều quan trọng là số vòng quay trong mỗi phút của clinostat phải đủ lớn để đảm bảo rằng trọng lực tác động lên vật thí nghiệm từ bất kỳ hướng nào cũng không được duy trì đủ lâu để tạo ra những đáp ứng tăng trưởng tương ứng [24]. Briegleb năm 1992 đã giới thiệu khái niệm về clinostat quay nhanh để đạt được điều kiện không trọng lực chức năng đối với các vật thể nhỏ, chủ yếu là các tế bào đơn. Bằng cách quay nhanh và liên tục thì sự lắng đọng của vật thử nghiệm sẽ được ngăn chặn về mặt vật lý bởi sự thay đổi liên tục và cố định của hướng vector trọng lực. Minh họa để hiểu nguyên tắc của thiết bị này bằng cách cho các hạt nhỏ được quay trong một ống nhỏ hoặc cuvet đặt trong trục ngang. Khi đó, các hạt buộc này phải di chuyển trên các đường tròn, có đường kính giảm theo tốc độ quay và cuối cùng đạt đến trạng thái mà các chuyển động tương đối liên quan đến trọng lực có thể bị bỏ qua [25].

Ngày nay, tùy thuộc vào các yêu cầu đặt ra mà các loại clinostat đã được phát triển ví dụ như thiết bị kính hiển vi quan sát thiết bị cố định trong quá trình thiết bị đo động học trực tuyến thiết bị nghiên cứu trong điều kiện chìm [2].

1.5.2. Buồng quay (RWV- Rotating wall vessel)

Buồng quay hay bioreactor quay cho phép nuôi cấy tế bào, vi khuẩn hoặc các sinh vật thủy sinh như trứng hoặc phôi cá ngựa vằn, ...trong trạng thái vi trọng lực [26].



Hình 1.8. Mô hình cấu tạo của buồng quay (RWV- Rotating wall vessel) [24].

Hình 1.8 mô tả cấu trúc bên trong và ngoài của một buồng quay. Đây là thiết bị có dạng hình trụ (đường kính 5-20 cm) chứa bình nuôi cấy xoay quanh một trục nằm ngang với tốc độ khoảng 10-20 vòng/phút và giữ tế bào luôn ở trong tình trạng rơi tự do một cách liên tục trong môi trường nuôi cấy bằng cách làm cho vận tốc quay của môi trường nuôi cấy cân bằng và đối nghịch với tốc độ lắng của tế bào. Vận tốc quay này sẽ phụ thuộc vào mật độ, khối lượng, hình dạng... của từng mẫu cũng như độ nhớt của môi trường nuôi cấy.

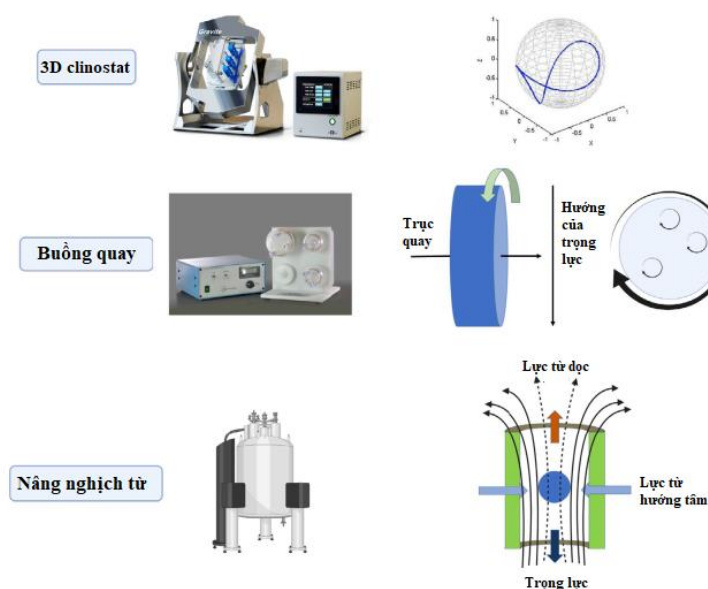
1.5.3. Máy định vị ngẫu nhiên (RPM- Random Positioning Machine)

Máy định vị ngẫu nhiên là thiết bị làm cho vector trọng lực có thể thay đổi hướng ngẫu nhiên và liên tục. Việc sử dụng máy định vị ngẫu nhiên có thể tạo ra những ảnh hưởng tương tự với môi trường vi trọng lực đối với sinh vật khi những thay đổi về hướng của trọng lực nhanh hơn tốc độ đáp ứng với trọng lực của sinh vật [24]. Các nhà khoa học cho rằng, máy định vị ngẫu nhiên sẽ tạo điều kiện không trọng lực chức năng đối với các mẫu lớn tốt hơn thiết bị clinostat 2-D [27].



Hình 1.9. Máy định vị ngẫu nhiên với 2 trục vuông góc với nhau [27].

Vào năm 1879, Von Sachs đã lần đầu tiên giới thiệu một thiết bị có 2 trục quay vuông góc và được điều khiển độc lập với nhau. Thiết bị này đã được Van Loon xem như lịch sử phát triển của máy định vị ngẫu nhiên và sau đó đã được các nhà sản xuất áp dụng để tạo ra các máy định vị ngẫu nhiên [27].



Hình 1.10. Một số nhóm hệ thống tạo vi trọng lực mô phỏng điển hình (3D clinostat ; buồng quay ; nâng nghịch từ) [27].

Lúc đầu, việc sử dụng máy định vị ngẫu nhiên để tạo điều kiện vi trọng lực cho các tế bào động vật có vú còn bị hạn chế do các tế bào động vật có vú rất nhạy cảm với sự biến động nhiệt độ vì thế chúng cần phải được nuôi cấy trong các tủ nuôi có thể điều chỉnh nhiệt độ. Sau đó, các nhà khoa học đã dùng một cách tiếp cận khác để khắc phục hạn chế này đó là thu nhỏ kích thước của

máy định vị ngẫu nhiên (kích thước tối đa khoảng $50 \times 50 \times 50$ cm) để có thể phù hợp với tủ nuôi cấy tế bào thông thường [28].

1.5.4. Hệ thống nâng nghịch từ

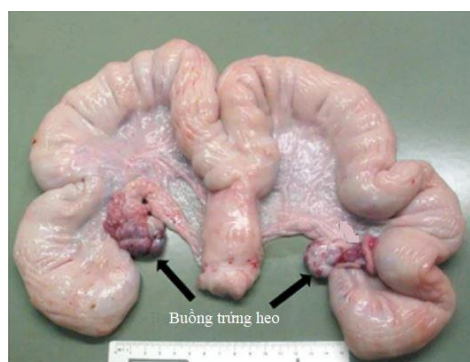
Công nghệ tạo hiệu ứng nâng nghịch từ có bản chất sử dụng lực từ rất mạnh theo không gian từ trường (chẳng hạn như từ trường được tạo ra bởi điện từ Bitter hoặc nam châm điện từ siêu dẫn) tác động lên khắp đối tượng thí nghiệm làm nâng vật lên. Cấu tạo cơ bản gồm một nam châm thẳng đứng, có lỗ trong đó trục điện từ được định hướng theo chiều dọc, lỗ khoan của nam châm là một lỗ hình trụ hở hai đầu đi qua tâm của điện từ. Bên trong lỗ khoan từ trường mạnh nhất ở nơi lỗ khoan đi qua trung tâm của điện từ. Vật liệu nghịch từ (là vật liệu như nước, vật liệu có gốc hữu cơ như dầu). Khi đó vật liệu sinh học bị đẩy ra khỏi từ trường. Bên trong phần trên của lỗ nam châm thẳng đứng, vật liệu nghịch từ bị đẩy lên trên, trường gần trung tâm ở phần dưới vật liệu nghịch từ bị đẩy xuống dưới.

Do đó, nếu sử dụng hệ thống này để làm thí nghiệm cần có các biện pháp kiểm soát thích hợp để làm giảm tác động ảnh hưởng của từ trường lên đối tượng thí nghiệm [2], [8].

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

1.6.1. Sơ lược về cấu tạo buồng trứng

Buồng trứng được bao bọc bởi một bó cơ riêng được gọi là mạc treo buồng trứng. Về hình dạng, buồng trứng có dạng hình hạt đậu, mặt cắt ngang của buồng trứng có cấu tạo gồm hai phần chính là vùng vỏ và tủy. Cấu trúc của buồng trứng gồm nhiều nang noãn, mỗi nang noãn có chứa tế bào noãn.



Hình 1.11. Vị trí và hình dạng buồng trứng heo [98].

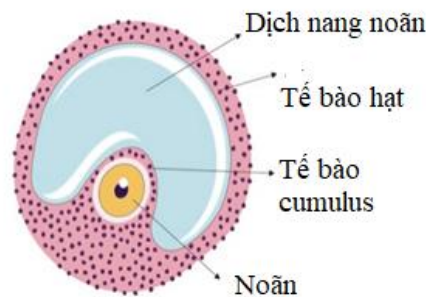
1.6.2. Sự hình thành và trưởng thành của noãn

Quá trình sinh noãn là một quá trình phức tạp xảy ra ở buồng trứng bao gồm sự hình thành, phát triển và trưởng thành của noãn.

Sự sinh noãn được chia làm 4 giai đoạn: (1) sự hình thành và di chuyển của tế bào mầm vào cơ quan sinh dục; (2) tăng số lượng tế bào bằng nguyên phân; (3) giảm chất liệu di truyền bằng giảm phân; (4) trưởng thành về cấu trúc và chức năng của noãn [29].

1.6.3. Sự hình thành và phát triển của nang noãn

Nang noãn có dạng vỏ bọc chứa noãn và các thành phần hỗ trợ bên trong như tế bào hạt, tế bào hạt nang noãn và dịch nang. Noãn được bao quanh bởi nhiều lớp tế bào hạt.



Hình 1.12. Cấu trúc của nang noãn trưởng thành [30].

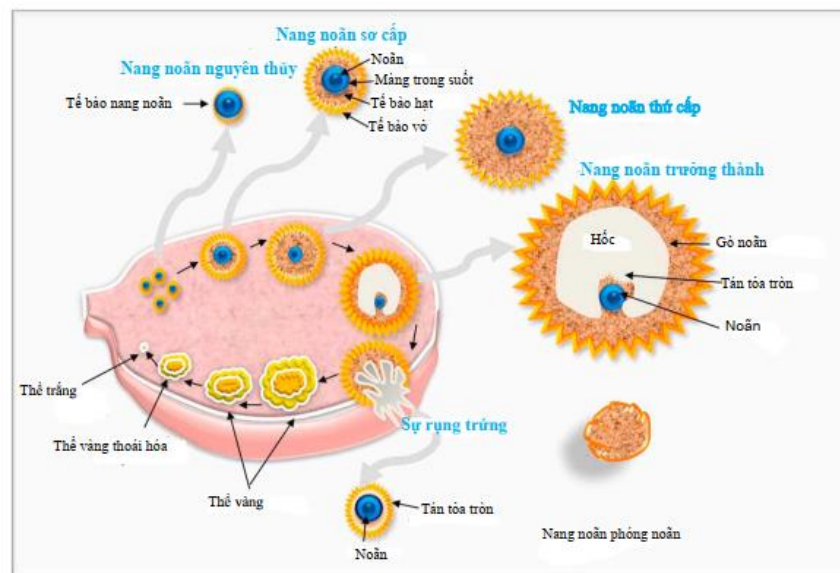
1.6.3.1. Sự hình thành của nang noãn

Nang noãn được hình thành từ nang noãn nguyên thủy, biểu hiện sớm nhất của sự phát triển từ nang noãn nguyên thủy thành nang noãn tiền hóc là sự gia tăng về kích thước. Phần lớn sự gia tăng kích thước này là do noãn sơ cấp chứa bên trong nang noãn tiền hóc cũng lớn dần lên, sự thay đổi hình dạng của tế bào hạt từ lát dẹt thành khối vuông cũng như sự nhân lên thành nhiều lớp của tế bào hạt [29].

Trong giai đoạn này noãn bắt đầu chế tiết glycoprotein, tạo thành một lớp màng phân cách giữa noãn và các tế bào hạt xung quanh gọi là màng trong suốt. Nhiều nghiên cứu cho thấy, vẫn có sự liên hệ mật thiết giữa tế bào hạt với noãn thông qua các liên kết khe và các vi nhung mao của noãn. Cùng với sự gia tăng về số lượng của tế bào hạt, một chất lỏng sáng màu xuất hiện, tập trung ngày càng nhiều ở các khoảng gian bào làm cho các khoảng này càng

lúc càng rộng ra hình thành các hóc có kích thước to nhỏ khác nhau. Các hóc ngày càng lớn thông với nhau thành một hóc lớn hơn và cuối cùng thành một hóc duy nhất rất lớn. Chất dịch trong hóc gọi là dịch nang, dịch nang có nguồn gốc một phần từ tế bào hạt, một phần từ dịch thấm huyết thanh. Dịch nang giúp hỗ trợ cho sự phóng thích noãn và lớp tế bào hạt xung quanh trong quá trình phóng noãn, đồng thời là phương tiện giúp trao đổi chất dinh dưỡng cho nang noãn, lớp tế bào hạt vây quanh noãn tạo thành 1 ụ gọi là gò noãn.

Giai đoạn kế tiếp, các nang noãn có hóc sẽ tiếp tục phát triển, dịch trong nang tiếp tục tăng lên ép các tế bào hạt chèn vào màng đáy. Lượng dịch tăng xoắn dần vào cụm tế bào cumulus bao quanh noãn làm cho nó lỏng lẻo hơn, nhân noãn di chuyển đến sát màng bào tương bao bọc noãn và phân chia lần thứ nhất của quá trình giảm phân kết thúc giai đoạn phát triển của nang noãn trưởng thành [31]–[35].



Hình 1.13. Các giai đoạn hình thành và phát triển của nang noãn [35].

1.6.3.2. Sự phát triển của nang noãn

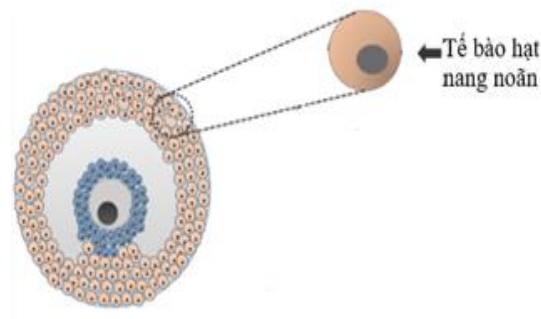
Một chu kỳ phát triển của nang noãn bao gồm một chuỗi các sự kiện xảy ra một cách có trật tự: chiêu mộ các nang noãn, chọn lọc các nang noãn, vượt trội của một nang noãn, trưởng thành và phóng noãn. Phần lớn sự phát triển của nang noãn ở giai đoạn đầu không phụ thuộc vào sự điều hòa nội tiết. Tuy nhiên trong giai đoạn cuối, với hàng loạt các hoạt động nội tiết, cận và tự

tiết của nang noãn, một nang noãn phát triển từ giai đoạn nang noãn có hóc, trưởng thành và sau cùng là phóng noãn [29].

1.6.4. Tế bào hạt nang noãn

1.6.4.1. Nguồn gốc và cấu tạo

Giữa noãn và các tế bào hạt có liên hệ mật thiết cũng như tương tác lẫn nhau trong suốt quá trình phát triển nang noãn. Noãn và các tế bào hạt phát triển song song nhau cho đến cuối giai đoạn nang tiền hóc. Ở giai đoạn này cũng bắt đầu diễn ra sự biệt hóa của các tế bào hạt bên trong nang noãn thành hai dạng khác nhau về vị trí cũng như chức năng. Các tế bào nằm gần noãn hơn sẽ biệt hóa thành các tế bào cumulus. Các tế bào nằm xa noãn hơn sẽ biệt hóa thành các tế bào hạt nang noãn [29].



Hình 1.14. Vị trí tế bào hạt nang noãn [36].

1.6.4.2. Chức năng

Tế bào hạt nang noãn đã được chứng minh có chức năng vô cùng quan trọng trong việc định hướng sự phát triển của nang noãn thông qua việc cung cấp các tín hiệu phân tử cũng như các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển và trưởng thành của nang noãn [36]. Chúng được xem là cầu nối thông tin liên lạc giữa noãn với các tế bào khác thông qua việc vận chuyển, trao đổi các chất chuyển hóa [37].

Ngoài ra tế bào hạt nang noãn cũng là nơi chứa aromatase, một enzyme chuyển hóa androgen thành estrogen [29].

1.7. Sự tăng sinh và chu kỳ tế bào

Sự tăng sinh của tế bào là quá trình một tế bào lớn lên và phân chia để tạo ra hai tế bào con. Sự tăng sinh của tế bào dẫn đến sự gia tăng về số lượng của tế bào

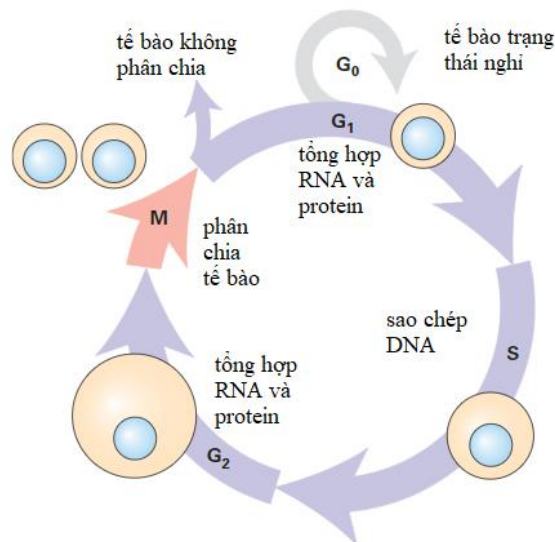
theo cấp số nhân hoàn thiện kích thước cơ thể, thay thế và bổ sung các tế bào bị tổn thương, già và chết nhằm giữ sự cân bằng và tính toàn vẹn của cơ thể sinh vật [38].

1.7.1. Chu kỳ tế bào

Chu kỳ tế bào là một vòng tuần hoàn các sự kiện xảy ra có thứ tự dẫn đến nhân đôi tế bào. Những sự kiện này bao gồm sự tự sao chép DNA và một số bào quan, sau đó là phân vùng tế bào chất và các thành phần khác thành hai tế bào con trong một quá trình gọi là phân chia tế bào [39].

1.7.2. Các giai đoạn trong chu kỳ tế bào nhân chuẩn

Chu kỳ tế bào nhân chuẩn được chia thành bốn pha riêng biệt: pha G₁ (khoảng thời gian giữa nguyên phân cho đến khi bắt đầu sao chép DNA nhân), pha S (giai đoạn DNA nhân được tái bản), pha G₂ khoảng thời gian giữa việc hoàn tất nhân đôi DNA và nguyên phân) và pha M (bao gồm nguyên phân và phân bào) [39].

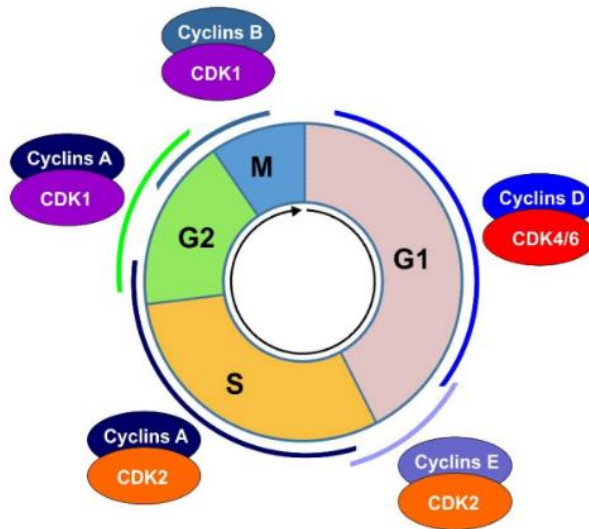


Hình 1.15. Chu kỳ tế bào [39].

1.7.3. Các kinase phụ thuộc cyclin điều khiển chu kỳ tế bào

Chu kỳ tế bào được điều khiển bởi các protein kinase dị nhị phân bao gồm một tiểu đơn vị xúc tác và một tiểu đơn vị điều khiển. Nồng độ của các tiểu đơn vị xúc tác, các kinase phụ thuộc cyclin (CDK), là không đổi trong suốt chu kỳ tế bào. Tuy nhiên chúng không có hoạt tính kinase trừ khi gắn với một tiểu đơn vị cyclin điều khiển. Mỗi CDK có thể kết hợp với một số ít các cyclin khác nhau để xác định các cơ chất đặc trưng của tổ hợp, là loại protein mà nó phosphoryl hóa. Mỗi cyclin chỉ hiện diện và hoạt động trong giai đoạn mà nó kích thích trong chu kỳ tế bào qua

đó giới hạn các hoạt động của kinase CDK tại đúng giai đoạn mà nó xúc tác [39]. Phức hợp cyclin-CDK kích hoạt hoặc ức chế hàng trăm protein liên quan đến chu kỳ tế bào bằng phosphoryl hóa protein ở những điểm điều hòa đặc biệt. Do đó tiến triển chính xác qua từng bước trong chu kỳ tế bào được đảm bảo nhờ sự kích hoạt của phức hợp cyclin-CDK tương ứng tại mỗi thời điểm thích hợp.



Hình 1.16. Phức hợp Cyclin – CDK trong điều hòa chu kỳ tế bào [40].

Bảng 1.2. Cyclin và CDK: Tên gọi và vai trò trong chu kỳ tế bào [39].

CDK	Cyclin	Chức năng	Tên chung
CDK1	Cyclin A, Cyclin B	Nguyên phân	Các CDK nguyên phân
CDK2	Cyclin A, Cyclin E	Bước vào pha S của chu kỳ tế bào	CDK pha G ₁ /S CDK pha S
CDK4	Cyclin D	G ₁ đi vào chu kỳ tế bào	G ₁ CDKs
CDK6	Cyclin D	G ₁ đi vào chu kỳ tế bào	G ₁ CDKs

1.7.4. Sự chết tế bào theo chương trình (apoptosis)

Sự chết tế bào theo chương trình, được biết đến với tên gọi phổ biến là apoptosis, đây là một quá trình sinh học thực hiện nhiệm vụ luân chuyển các tế bào bình thường ở các cơ quan khác nhau trong cơ thể sinh vật đa bào. Đây được xem là một quá trình cần thiết để duy trì sự cân bằng của cơ thể và loại bỏ các tế bào trong các pha phát triển của sinh vật [41]. Trong những năm gần đây, các nhà khoa học bắt đầu nghiên cứu cơ chế phân tử của quá trình apoptosis và tìm thấy một số protein quan trọng trong tiến trình này như : họ protein Bcl-2, Caspase 3, Caspase 9, Bid, Bax,... Cùng với đó, người ta cũng nghiên cứu việc ứng dụng quá trình apoptosis trong điều trị lâm sàng [42].

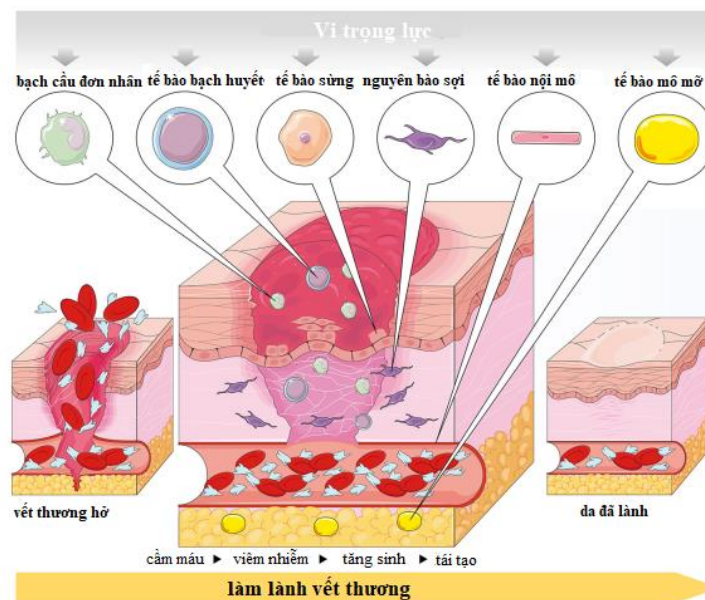
Ngoài ra các tế bào cũng sẽ đáp ứng với các điều kiện bất lợi như phóng xạ, thiếu dinh dưỡng, thiếu oxy, tăng nồng độ acid béo tự do nội bào, để kích hoạt việc giải phóng các tín hiệu apoptosis nội bào. Các tín hiệu này sau đó sẽ tạo ra các protein điều hòa để bắt đầu con đường apoptosis, bước này cho phép quá trình apoptosis sẽ diễn ra hay ngừng lại. Sở dĩ việc khởi đầu quá trình apoptosis phải được kiểm soát một cách chặt chẽ bằng các cơ chế hoạt hóa bởi nó sẽ không ngừng lại một khi đã bắt đầu [42]. Trong tế bào động vật có vú, quá trình apoptosis xảy ra thông qua hai con đường hoạt hóa riêng biệt được điều hòa bởi các caspase là con đường nội bào (thông qua ty thể) và con đường ngoại bào (thông qua thụ thể chết) [43].

Giai đoạn sớm của quá trình apoptosis được đặc trưng bởi sự cô đặc nhiễm sắc chất. Song song đó là sự co rút tế bào làm thu nhỏ kích thước tế bào, tế bào chất trở nên dày đặc hơn và các bào quan được đóng gói chặt chẽ hơn. Tiếp theo đó, khung xương tế bào bị phá vỡ làm cho màng tế bào phình ra còn gọi là quá trình nảy chồi hay hình thành bóng màng. Đồng thời, các caspase và nuclease cũng được kích hoạt nhằm phân hủy các protein tế bào cũng như DNA nhân tế bào. Các chồi sau đó sẽ tách ra khỏi tế bào mang theo một phần tế bào chất cùng với các bào quan được đóng gói chặt chẽ tạo thành thể apoptotic. Các thể apoptotic này sau đó được thực bào bởi đại thực bào và bị thoái hóa trong phagolysosome [44].

Sự chết tế bào theo chương trình đặc trưng bởi chuỗi thay đổi về hình thái bằng việc tế bào chết co lại, cô đặc và sau đó phân mảnh, giải phóng các apoptosome có

màng bao bọc và thường được các tế bào thu nạp. Ở các tế bào đang chết nhân tế bào cô đặc và DNA phân mảnh. Điều quan trọng là các thành phần nội bào không bị giải phóng vào môi trường ngoại bào, vì chúng có thể gây hại cho các tế bào lân cận. Quá trình apoptosis của tế bào là rõ ràng khi các tế bào được nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng trong 72 giờ. Con đường dẫn truyền tín hiệu PI3K/Akt, NF- κ B và sự khử cực F-actin có tương quan chặt chẽ với quá trình apoptosis trong tế bào [45]. Sự apoptosis của các tế bào vi mạch nội mô, có liên quan đến việc suy giảm chức năng của nội mô, những phát hiện này có thể cung cấp hiểu biết sâu sắc về nguồn gốc những thay đổi sinh lý bất lợi xảy ra ở người và động vật trong suốt các chuyến bay kéo dài ngoài vũ trụ [46].

Mới đây nhất tháng 6.2021 nhóm nghiên cứu của Riwaldt và cộng sự cho thấy có sự thay đổi ở các dòng tế bào khác nhau trong điều kiện vi trọng lực làm ảnh hưởng đến quá trình tế bào chết theo chương trình như tăng tỉ lệ tế bào chết theo chương trình, các đại thực bào bị ức chế phát triển. Do đó ảnh hưởng đến việc làm lành vết thương của các phi hành gia trên không gian chậm hơn so với điều kiện trên trái đất [23].



Hình 1.17. Quá trình chữa lành các vết thương qua da của các tế bào trong điều kiện ảnh hưởng của vi trọng lực [23].

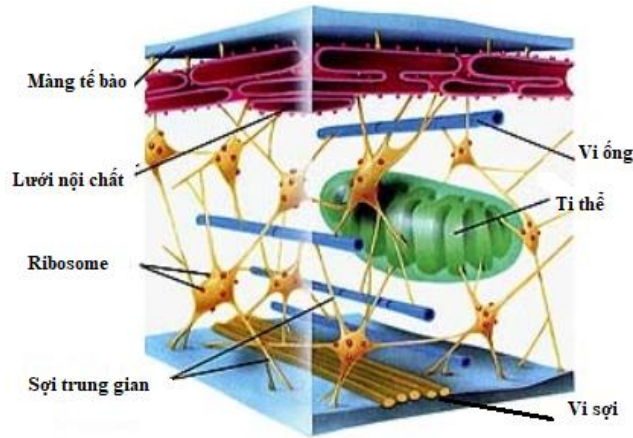
1.7.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của vi trọng lực lên sự tăng sinh của tế bào

Gần đây một số nghiên cứu trên thế giới đã đánh giá ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực lên sự tăng sinh của tế bào động vật, bao gồm cả tế bào bình thường và tế bào ung thư, quá trình đánh giá này bao gồm những so sánh về sự thay đổi trong sự biểu hiện gene, sự chết theo chương trình. Girardi và các cộng sự tại Ý đã khảo sát nuôi cấy tế bào máu lympho máu ngoại vi ở người trên hệ thống tạo vi trọng lực mô phỏng là buồng quay (RWV) sau đó dựa vào các công cụ phân tích tin sinh học để bước đầu đưa ra kết luận vi trọng lực mô phỏng làm giảm sự tăng sinh tế bào và tăng sự chết tế bào theo chương trình [47]. Năm 2020 Tan và cộng sự nghiên cứu trên dòng tế bào Beas-2B (tế bào biểu mô phế quản ở phổi người) bằng hệ thống tạo vi trọng lực mô phỏng 3D- Clinostat và đi đến kết luận điều kiện vi trọng lực mô phỏng cùng với bức xạ sẽ làm giảm tỉ lệ sống sót của tế bào, ức chế sự tăng sinh và sự chết tế bào theo chương trình, đồng thời cũng làm xuất hiện sự đứt gãy chuỗi kép DNA của tế bào Beas-2B [48].

Tại Việt Nam, nhóm nghiên cứu của tác giả Hoàng Nghĩa Sơn và cộng sự tại Viện sinh học nhiệt đới cũng có nghiên cứu trên đối tượng tế bào gốc trung mô ở người. Kết quả nghiên cứu cho thấy điều kiện vi trọng lực mô phỏng làm giảm tăng sinh và thay đổi hình thái nhân và tế bào chất của tế bào được khảo sát. Ngoài ra nhóm cũng đưa ra kết luận quan trọng điều kiện vi trọng lực mô phỏng không làm ảnh hưởng đến sự chết theo chương trình của tế bào gốc trung mô ở người [49]. Những thay đổi và ảnh hưởng đối với tế bào sinh dục trên hệ thống 3D-clinostat vẫn chưa có nhiều dữ liệu nghiên cứu rõ ràng, do đó nghiên cứu hiện tại giúp bổ sung thêm vào sự hiểu biết liên quan đến những thay đổi ảnh hưởng của tế bào pGC trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng.

1.8. Khung xương tế bào

Ở tế bào động vật, khung xương tế bào là một mạng lưới phức tạp có vai trò quan trọng trong việc quyết định hình dạng của mỗi loại tế bào, góp phần hỗ trợ chống lại các tác động của lực kéo và lực đẩy (vi ống hỗ trợ chống lại lực đẩy, vi sợi và sợi trung gian hỗ trợ chống lại lực kéo) qua đó giúp cho việc di chuyển của tế bào cũng như tham gia vào quá trình phân chia tế bào một cách dễ dàng [39].



Hình 1.18 Cấu trúc khung xương tế bào [39].

1.8.1. Tổ chức và cấu trúc khung xương tế bào

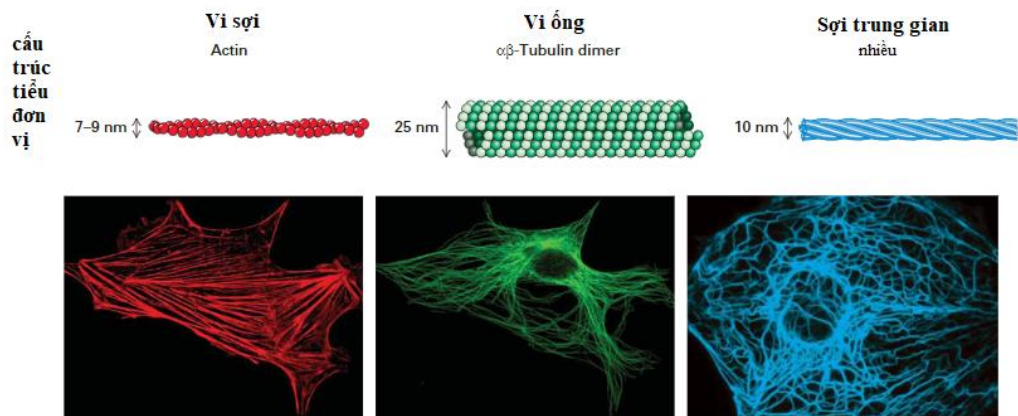
Thuật ngữ khung xương tế bào mang hàm ý là một cấu trúc cố định giống như khung xương. Tuy nhiên trong thực tế, khung xương tế bào rất linh hoạt chúng gồm các thành phần có khả năng tái tổ chức chưa đầy một phút, hoặc có thể rất ổn định trong vòng nhiều giờ đồng hồ. Hệ quả là độ dài và động học của các loại sợi sẽ khác nhau, dẫn đến các sợi có thể lắp ráp thành nhiều cấu trúc đa dạng và chúng có thể điều hòa một cách cục bộ trong tế bào. Có ba loại polymer chính cấu thành nên cấu trúc khung xương tế bào: vi sợi, vi ống và sợi trung gian.

Vi sợi: là polymer của protein actin được các protein bám actin tổ chức thành các bó và mạng lưới chức năng. Vi sợi đặc biệt quan trọng đối với việc tổ chức màng tế bào chất, đóng vai trò tạo hình dạng cho các cấu trúc bề mặt như vi nhung mao. Vi sợi có thể tự hoạt động hoặc đóng vai trò đường ray cho protein vận động myosin dùng năng lượng ATP di chuyển, tạo nên chức năng co thắt hoặc vận chuyển protein dọc theo sợi actin [39].

Khối cấu trúc nền tảng của vi sợi là actin, protein có tính chất đáng chú ý là khả năng lắp ráp thuận nghịch, thành một sợi phân cực với hai đầu có chức năng khác biệt nhau. Actin là một protein nội bào rất dồi dào trong tế bào nhân chuẩn. Actin được tổng hợp từ một họ gene lớn mã hóa một số trong những protein bảo tồn nhất trong cùng 1 loài cũng như giữa nhiều loài sinh vật. Mỗi gene actin chức năng mã hóa một loại đồng phân actin. Có thể chia các đồng phân actin thành 3 nhóm: α -actin, β -actin và γ -actin.

Vi ống: là các ống dài do protein tubulin và các protein gắn vi ống hình thành. Chúng thường dàn trải trong toàn bộ tế bào, tạo thành bộ khung định vị cho nhiều bào quan và là giá đỡ cấu trúc cho lông mao và lông roi [39].

Sợi trung gian: là cấu trúc sợi đặc trưng cho từng loại mô với nhiều vai trò khác nhau, bao gồm hỗ trợ cấu trúc cho màng nhân, giúp duy trì độ toàn vẹn, cấu trúc tế bào trong mô, và có chức năng làm cấu trúc và rào cản cho da, tóc và móng. Khác với vi ống và vi sợi, các động cơ phân tử không dùng sợi trung gian làm đường ray để di chuyển. Tên gọi của sợi trung gian cũng phản ánh kích thước của chúng 10nm. Sợi trung gian có một số tính chất đặc trưng giúp phân biệt vi sợi và vi ống như: có thành phần sinh hóa đa dạng hơn, có sức căng lớn hơn và không có hoạt tính phân cực nội tại giống như các vi sợi và vi ống [39].

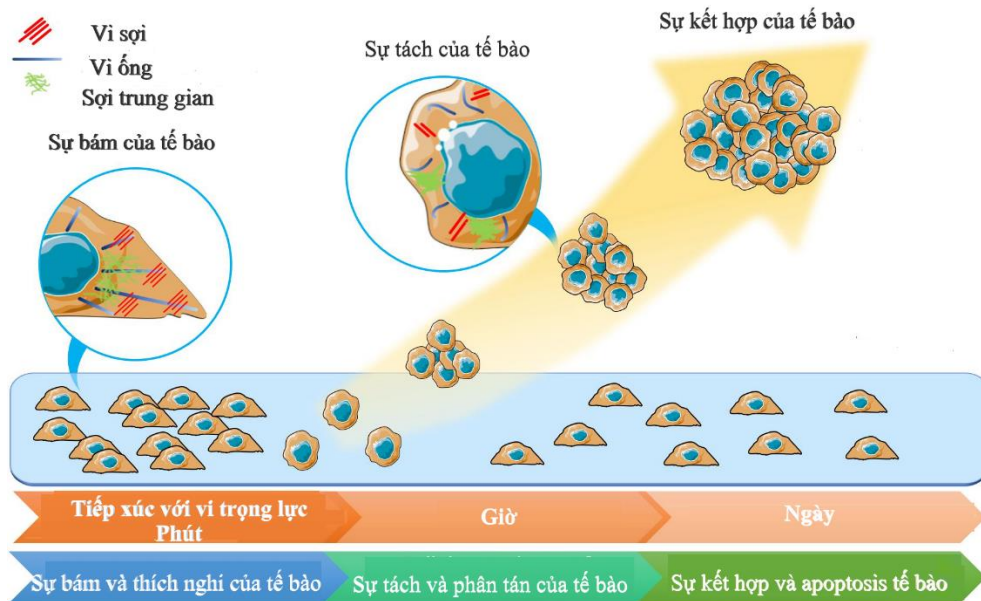


Hình 1.19. Thành phần cấu trúc khung xương tế bào [39].

1.8.2. Những nghiên cứu về ảnh hưởng của vi trọng lực lên khung xương tế bào

Bộ khung xương tế bào là một cấu trúc động ở mức độ cao, liên tục thay đổi và tổ chức lại khi diễn ra sự phân chia tế bào cũng như phản ứng lại các điều kiện khác nhau khi bị tác động từ môi trường bên ngoài đến tế bào, vấn đề này đã được ghi nhận trong nhiều thập kỷ trước đây. Tuy nhiên, sự thay đổi của khung xương tế bào trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng so với bình thường chưa được nghiên cứu nhiều và chỉ ở mức độ sơ khai. Do đó, nghiên cứu sự thay đổi về sự ảnh hưởng của vi trọng lực lên khung xương tế bào nhằm đánh giá những thay đổi của sự khác biệt giữa điều kiện bình thường trên trái đất và điều kiện vi trọng lực rất được các nhà khoa học quan tâm và có nhiều nghiên cứu đến vấn đề này trong thời gian gần đây.

Các nghiên cứu tập trung về sự thay đổi của tế bào ở điều kiện vi trọng lực tập trung chủ yếu vào sự thay đổi của hình dạng, kích thước, khối lượng, các thuộc tính liên kết của tế bào [50].



Hình 1.20. Hình dạng tế bào và khung xương tế bào thay đổi trong điều kiện vi trọng lực [3].

Những thay đổi do vi trọng lực gây ra làm thay đổi cấu trúc tế bào, cụ thể là sự thay đổi của vi ống và vi sợi [39]. Các nghiên cứu đã được thực hiện trên nhiều dòng tế bào khác nhau đã cho thấy sự nhạy cảm nhất định của các dòng tế bào này trong điều kiện vi trọng lực, sự ghi nhận sự thay đổi về hình thái đầu tiên được Rijken và cộng sự báo cáo lần đầu tiên vào năm 1991 [51]. Ngoài ra, các nghiên cứu tiếp theo của Grimm cũng chỉ ra rằng những thay đổi về hình thái tế bào trong điều kiện vi trọng lực thực tế hay mô phỏng cũng đều làm thay đổi quá trình phiên mã, dịch mã và tổ chức của các protein trong tế bào [52]. Các nghiên cứu cơ bản của Tabony và cộng sự năm 2002 cho thấy khi quá trình lắp ráp các tubulin thành các vi ống xảy ra độc lập với trọng lực (nghĩa là không bị ảnh hưởng bởi điều kiện của trọng lực) trên một vài phân khung xương tế bào bị ảnh hưởng bởi vi trọng lực [53].

Sự ghi nhận sự thay đổi về hình thái đầu tiên được Groot và cộng sự báo cáo lần đầu tiên vào năm 1991 ở dòng tế bào A432 ung thư biểu mô ở người [51]. Các nghiên cứu tiếp sau đó được mở rộng và đã được thực hiện trên nhiều dòng tế bào khác nhau đã cho thấy sự nhạy cảm nhất định của các dòng tế bào này trong điều kiện

vi trọng lực cụ thể là sự thay đổi của vi ống và vi sợi, dưới tác động của điều kiện vi trọng lực tác động đến khả năng kết dính của các thành phần trong khung tế bào, làm gián đoạn sự phân bố của các phân tử kết dính và gây ra sự tái cấu trúc khung xương tế bào [54]. Ngoài ra, Tabony và cộng sự năm 2002 chỉ ra rằng, trọng lực điều chỉnh đáng kể sự tổ chức cấu trúc của vi ống bằng cách tham gia vào quá trình phản ứng-khuếch tán. Do đó lực hấp dẫn có thể can thiệp vào các quá trình xảy ra trong tế bào và gián tiếp tác động đến sự sắp xếp của các tổ chức vi ống [53].

Nassef và cộng sự năm 2019 xác nhận những thay đổi về hình thái tế bào trong điều kiện vi trọng lực thực tế hay mô phỏng cũng đều làm thay đổi quá trình phiên mã, dịch mã và tổ chức của các protein trong tế bào [55].

Tác giả Hoàng Nghĩa Sơn và cộng sự tại Viện sinh học nhiệt đới năm 2021 cũng đã một lần nữa khẳng định những thay đổi về hình thái tế bào và sự tái cấu trúc bộ khung xương tế bào trên đối tượng tế bào gốc trung mô cuống rốn người khi nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng 3D-Clinostat [49].

CHƯƠNG 2 ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG

2.1.1. Tế bào hạt nang noãn heo

Tế bào hạt nang noãn heo (pGC) được phân lập từ buồng trứng heo. Buồng trứng thu thập từ các heo cái có độ tuổi trung bình 6-7 tháng tuổi, trọng lượng trung bình 80-90 Kg. Địa điểm thu thập tại lò mổ heo Ngọc Minh- Đường số 8, Phường Linh Xuân-TP. Thủ Đức.

Thời gian thực hiện đề tài: 11/3/2020- đến 30/5/2022.

Địa điểm thực hiện: Phòng CNSH động vật, Viện Sinh học Nhiệt đới, 9/621 Xa lộ Hà nội, Phường Linh Trung, TP. Thủ Đức.

2.1.2 Thiết bị và dụng cụ cần thiết

Các thiết bị và vật dụng sử dụng trong quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu được liệt kê trong trong bảng 2.1 và 2.2 như bên dưới.

Bảng 2.1. Danh mục thiết bị dùng trong nghiên cứu

STT	Tên thiết bị	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
1	Kính hiển vi huỳnh quang	Nikon	Nhật
2	Kính hiển vi quang học	Meiji	Nhật
3	Máy ly tâm	Hettich	Đức
4	Máy Vortex VX100	Labnet	Đức
5	Tủ thao tác vô trùng	Sanyo	Nhật
6	Tủ ấm 37 nuôi tế bào	Sanyo	Nhật
7	Tủ lạnh	Sanyo	Nhật
8	Máy quang phổ GloMax® Explorer Multimod Microplate Reader	Promega	Mỹ
9	Kính hiển vi huỳnh quang Cytell™	GE Healthcare	Mỹ
10	Máy BD Accuri™ C6 Flow Cytometer	BD Biosciences	Mỹ
11	Bể điện di protein	Amersham Biosciences	Anh

12	Bể chuyên thâm	Amersham Biosciences	Anh
13	Máy PCR	Agilent	Mỹ
14	Hệ thống Realtime PCR	Thermo Scientific	Mỹ
15	Nanovue	GE Healthcare	Mỹ
16	Hệ thống điện di western blot	GE Healthcare	
17	Tủ -80 ⁰ C	Panasonic	Nhật
18	Tủ -30 ⁰ C	Panasonic	Nhật

Bảng 2.2. Danh mục các dụng cụ dùng trong nghiên cứu

STT	Tên thiết bị	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
1	Becher (100 ml, 50 ml)	Schott	Đức
2	Erlen (100mL, 250mL)	Schott	Đức
3	Ống ly tâm 15 ml	Corning	Mỹ
4	Micropipette (1-10 μ l)	Nychiro	Nhật
5	Micropipette (20-100 μ l), (100-1000 μ l)	Hirschmann	Đức
6	Eppendorf (1500 μ l, 2000 μ l)	Eppendorf	Đức
7	Đầu tip 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l	Eppendorf	Đức
8	Bình nuôi T25	Thermo Scientific	Mỹ
9	Đĩa 96 giếng	Thermo Scientific	Mỹ
10	Precast Gel SDS – PAGE 4 -12%	Abcam	Mỹ
11	Màng lai PVDF	Abcam	Mỹ
12	Giấy lọc Extra Thick Blot	Bio-Rad	Mỹ
13	CL-XPosure Film	Thermo Scientific	Mỹ




Bảng 2.3. Danh mục hóa chất, môi trường dùng trong nghiên cứu

STT	Tên hóa chất, môi trường	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
1	Kháng sinh (penicillin và streptomycin)	Gibco BRL	Mỹ
2	DMEM/Ham's F-12 với L-Glutamine	Capricorn Scientific	Đức
3	4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution	Nacalai Tesque	Nhật
4	Phosphate Buffer Saline (PBS)	Capricorn Scientific	Đức
5	Fetal Bovine Serum (FBS)	Capricorn Scientific	Đức
6	Trypsin EDTA	Capricorn Scientific	Đức
7	Thuốc nhuộm WST-1	Roche	Thụy Sĩ
8	Thuốc nhuộm Hoechst 33342	Sigma Aldrich	Đức
9	Thuốc nhuộm PI (Propidium Iodide)	BD Biosciences	Mỹ
10	2x qPCR SyGreen 1-Step Go Hi-ROX kit	PCR Biosystems	Mỹ
11	ReliaPrep™ RNA Cell MiniPrep system	Promega	Mỹ
12	FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences	Mỹ
13	PCRBIO 1-Step RTPCR Kit	PCR Biosystems	Mỹ
14	Blocking Buffer	Abcam	Mỹ
15	Triton X-100	Merck	Đức
16	Kháng thể sơ cấp GAPDH,	Abcam	Mỹ
17	β -actin, α -tubulin 3, Cyclin D, CDK4, CDK6	Sigma Aldrich	Đức
18	Kháng thể thứ cấp Goat Anti-Mouse, Goat Anti-Rabbit	Abcam	Mỹ
19	Optiblot LDS 4X Sample Buffer	Abcam	Mỹ
20	AUTOMATIC X-RAY Kit	Fujifilm	Nhật
21	Pronase	Roche	Thụy Sĩ

2.1.3. Hệ thống tạo vi trọng lực mô phỏng

Hệ thống tạo vi trọng lực mô phỏng Gravite® (As one international, Inc, Santa Clara, CA, Mỹ) là một thiết bị đa hướng để mô phỏng điều kiện vi trọng lực mô phỏng với khả năng theo dõi theo thời gian thực, bằng cách xoay hai trục có kiểm soát để tạo nên điều kiện vi trọng lực mô phỏng.

Bảng 2.4. Thành phần cấu tạo của hệ thống Gravite tại Viện sinh học nhiệt đới [56].

Hình ảnh mô tả	Chức năng	Thông số kĩ thuật
	Hệ thống chính	Kích thước (RxSxC):425x420x445 (mm) Nặng: 13,5Kg Nguồn cung cấp: 120V/60Hz
	Hệ thống điều khiển	Cài đặt các thông số để điều khiển và hiển thị thông tin liên quan đến vòng quay của hệ thống chính. Gồm 4 chương trình: Chương trình A: x4 vòng/ phút Chương trình B: x3 vòng/ phút Chương trình C: x2 vòng/ phút Chương trình D: x 1 vòng / phút
	Bộ phận giữ mẫu	Có 4 kiểu giữ mẫu: Kiểu A sử dụng cho 9 bình T12.5 mỗi bên Kiểu B sử dụng cho 6 bình T25 mỗi bên Kiểu C sử dụng cho 2 bình T75 mỗi bên và đĩa nuôi cấy 96 giếng

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nuôi cấy tế bào

Tuần tự các bước thực hiện từ qui trình thu mẫu buồng trứng, thu nang noãn đơn cũng như thu nhận và nuôi cấy pGC được trình bày bên dưới dựa theo qui trình của tác giả Hoàng Nghĩa Sơn và cộng sự [57].

2.2.1.1. Thu mẫu buồng trứng

Buồng trứng heo sau khi thu nhận được rửa sạch bằng nước muối sinh lý 0,9% đã được hấp khử trùng. Sau đó buồng trứng được giữ trong bình ổn nhiệt và vận chuyển về phòng thí nghiệm để thu nhận nang noãn đơn.

2.2.1.2. Phương pháp thu nhận nang noãn đơn

Buồng trứng sau khi rửa sạch được thực hiện cắt nang bằng lưỡi dao 11 và cán dao 3. Phần mô chứa nang đơn sẽ được cắt rời. Sau đó, phần mô bao ngoài vỏ nang noãn được lột bỏ. Nang noãn đơn được rửa sạch nhiều lần bằng môi trường DMEM 10% FBS và 1% kháng sinh Pen/Strep. 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 (Roche, Thụy Sĩ) để loại bỏ hết tế bào ngoài nang. Nang trứng sau đó được mở và lộn ngược từ trong ra ngoài. Tế bào hạt sẽ được tách khỏi vỏ nang bằng cách dùng đầu kim vuốt nhẹ mặt trong của nang trứng. Vỏ nang sẽ được loại bỏ. Dịch chứa tế bào hạt sẽ được ly tâm 1500 vòng/phút để thu phần tế bào lắng sau ly tâm của tế bào. Sau đó phần này được huyền phù hóa và được chuyển vào bình nuôi cấy chứa môi trường DMEM 10% FBS và 1% kháng sinh Pen/Strep. Tế bào được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂.

2.2.1.4. Phương pháp cấy chuyển pGC

Lấy bình nuôi tế bào ra khỏi tủ nuôi, kiểm tra hình thái tế bào dưới kính hiển vi sau đó lau cồn và đưa vào tủ cấy vô trùng. Khi thao tác trong tủ cấy, gõ nhẹ bình nuôi cấy để làm bong tróc các tế bào chết sau đó dùng pipet hút bỏ môi trường cũ. Tế bào được rửa qua 3 lần mỗi lần 1 phút với PBS để loại bỏ hoàn toàn môi trường cũ và tế bào chết. Sau đó tế bào được xử lý với 1mL trypsin-EDTA 0,25% ủ trong vòng 3 phút ở 37°C, 5% CO₂. Gõ nhẹ bình nuôi cấy tế bào để làm tách rời những tế bào còn bám trên bề mặt bình nuôi cấy để chuẩn bị cho việc huyền phù hóa tế bào bằng

2mL môi trường DMEM 10% FBS và 1% kháng sinh Pen/Strep và được chuyển vào ống ly tâm 15mL. Dịch chứa tế bào hạt sẽ được ly tâm 1500 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ dịch nổi và thu phần lắng sau ly tâm của tế bào. Tiếp sau đó phần này được huyền phù hóa và chuyển vào bình nuôi cấy mới chứa môi trường DMEM 10% FBS và 1% kháng sinh Pen/Strep.

2.2.2. Phương pháp nhuộm nhân pGC

Tế bào pGC được rửa 2 lần bằng dung dịch PBS mỗi lần cách nhau 5 phút. Sau đó tế bào được cố định trong 4 % paraformaldehyde (Nacalai Tesque, Nhật) trong 30 phút. Tiếp tục rửa lại tế bào bằng dung dịch PBS, 2 lần mỗi lần cách nhau 5 phút. Tế bào được xử lý với Triton X-100 0,1% (Merck, Đức) qua đêm ở 4°C. Tế bào lại được rửa 2 lần, mỗi lần 5 phút bằng dung dịch PBS. Sau đó đem nhuộm tế bào với Hoechst 33342 (14533 Sigma Aldrich, Munich, Đức) trong 30 phút. Sau cùng tế bào được rửa 2 lần bằng dung dịch PBS, mỗi lần 5 phút và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang để đánh giá.

2.2.3. Phương pháp thử nghiệm vi trọng lực

Để thực hiện đánh giá thử nghiệm so sánh giữa điều kiện bình thường trên trái đất và điều kiện vi trọng lực mô phỏng. 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. Đối với nhóm SMG đĩa hoặc bình nuôi cấy tế bào được đặt cố định vào vị trí giữ mẫu của hệ thống Gravite và chọn chương trình với tốc độ quay cho giá trị $1,3 \cdot 10^{-3}G$, tương tự như môi trường bên ngoài không gian và được định nghĩa là điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Trong khi đó cùng thời điểm các tế bào ở nhóm đối chứng được nuôi ở điều kiện trọng lực bình thường 1G. Các tế bào được đánh giá và so sánh sau khi nuôi cấy 72 giờ. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần [99].

2.2.3.1. Tế bào nuôi trong đĩa 96 giếng

Môi trường sử dụng để nuôi pGC là DMEM/Ham's F-12 với L- Glutamine (DMEM-12-1-A, Capricorn Scientific, Đức) có bổ sung 15% FBS (FBS-HI-22B, Capricorn) tế bào pGC được nuôi vào đĩa 96 giếng (161093, Thermo Scientific, Mỹ) mật độ $2 \cdot 10^3$ tế bào/giếng. Tế bào được cấy vào đĩa 96 giếng, sau đó 100 μ L môi trường nuôi cấy được bổ sung vào từng giếng. Tế bào được nuôi trong tủ nuôi ở 37°C,

5% CO₂ trong 6 tiếng để tế bào bám vào bề mặt giếng. Sau khi các tế bào đã bám, toàn bộ môi trường cũ được loại bỏ. Mỗi giếng được bổ sung 400 µL môi trường nuôi mới. Các giếng này được phủ bởi tấm parafilm, đậy nắp đĩa 96 giếng. Đĩa 96 giếng được lắp vào máy vi trọng lực mô phỏng.

2.2.3.2. Tế bào nuôi trong đĩa T25

Tế bào pGC được nuôi trong bình T-25 (160430, Thermo Scientific, Mỹ) với mật độ 1×10^5 tế bào/ bình, trong tủ ẩm ở điều kiện 37°C, CO₂ 5% trong môi trường DMEM/Ham's F-12 với L- Glutamine có bổ sung 15% FBS bổ sung 0,5% kháng sinh Pen/Strep (15140-122, Gibco, Mỹ) sau khi các tế bào pGC đã bám vào bề mặt bình nuôi, bình nuôi chứa tế bào được đổ đầy môi trường nuôi cấy.

2.2.4. Phương pháp đánh giá sự tăng sinh của tế bào

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

Phương pháp WST-1 được dùng để đánh giá mức độ tăng trưởng và phát triển của pGC khi nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Bản chất của phương pháp này dựa trên phản ứng đổi màu của của muối tetrazolium trong dung dịch WST-1 với các enzyme dehydrogenase trong ti thể. Khi tế bào tăng sinh mạnh, mức độ hô hấp càng nhiều dẫn đến lượng enzyme tiết ra môi trường càng lớn, môi trường nuôi chứa WST-1 sẽ chuyển màu càng đậm. Các tế bào pGC được nuôi trong đĩa 96 giếng với mật độ 1×10^3 tế bào/giếng và được nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng 72 giờ.

Sau thử nghiệm vi trọng lực 72 giờ, lấy các đĩa 96 giếng ra khỏi tủ nuôi, khử trùng và chuyển vào tủ cấy. Quan sát ghi nhận thông tin sơ bộ của tế bào, dùng tay gõ nhẹ đĩa để làm bong hết các tế bào chết, môi trường nuôi cấy tế bào cũ được rút bỏ khỏi giếng. Tiếp đó cho 200 µL PBS 1X vào mỗi giếng, đảo nhẹ đĩa nuôi cấy. Lưu ý quá trình cho PBS vào giếng tế bào cần được thực hiện nhẹ nhàng tránh gây bong tróc tế bào. Tế bào được rửa PBS 3 lần mỗi lần 5 phút. Sau khi hút bỏ hết dung dịch PBS, cho 100µL môi trường nuôi cấy mới (DMEM/Ham's F-12 với 15% FBS và 1% Pen/Strep) và 10µL WST-1 (11644807001, Roche, Basel, Thụy Sĩ) được cho vào mỗi giếng nuôi của mỗi nhóm. Chuyển đĩa 96 giếng đã ủ với WST-1 vào tủ nuôi tế bào ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ trong thời gian 3,5 giờ. Sau thời gian ủ 3,5 giờ lấy đĩa ra khỏi tủ nuôi và thực hiện đo giá trị O.D của từng giếng tế bào. Giá trị này được đo

bởi máy quang phổ GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader (Promega, Fitchburg, Mỹ) ở bước sóng 450 nm.

2.2.4.2. Đánh giá chu kỳ tế bào (tỉ lệ các pha bằng ứng dụng phần mềm Cytell, biểu hiện phiên mã *cdk4*, *cdk6*, *cyclin A*, *cyclin D1*), biểu hiện dịch mã (Cdk4, Cdk6, Cyclin A1+ A2)

Thu hoạch tế bào: Sau thử nghiệm vi trọng lực, các bình nuôi T25 chứa pGC được hút bỏ môi trường và rửa 3 lần với 5mL PBS 1X cho mỗi lần. Mỗi bình nuôi tế bào được ủ với 1mL dung dịch Trypsin 0,25% 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 phần tế bào lắng sau ly tâm.

Đánh giá tỉ lệ các pha của tế bào trong chu kỳ tế bào bằng hệ thống Cytell: Các tế bào 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. Sau 72 giờ các pGC được cố định với 4% paraformaldehyde trong PBS trong 30 phút và thấm với 0,1% Triton X-100 trong PBS (Merck, Darmstadt, Đức) trong 30 phút. Nhuộm nhân của pGC với Hoechst 33342 trong 30 phút. Sau đó rửa lại tế bào trong 3 lần mỗi lần 5 phút. Tỉ lệ các pha của tế bào được đếm bằng phần mềm ứng dụng trên hệ thống Cytell (GE Healthcare, Mỹ).

Đánh giá biểu hiện mức phiên mã các gen *cdk4* và *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. Trình tự chi tiết các bước được thực hiện như sau:

Tách chiết RNA tổng của tế bào: RNA tổng của pGC được tách bằng kit ReliaPrep™ RNA Cell miniprep RNA system (Z6011, Promega, Mỹ). Ống eppendorf chứa tế bào sau khi thu hoạch được giữ lạnh ở 4°C và bổ sung 250µL dung dịch TL+TG buffer, hút lên xuống đều để ly giải tế bào. Sau đó thêm 85µL Isopropanol 100% được thêm vào ống tế bào, trộn đều trong 5 giây. Dịch tế bào sau

khi li giải được cho vào cột minicolumn có chứa màng lọc và li tâm với tốc độ 11.000 vòng/phút trong 30 giây ở điều kiện nhiệt độ 20°C. Dịch thải ra qua ống thu được loại bỏ. RNA bám trên màng lọc của cột minicolumn được rửa với 500 µL dung dịch RNA wash solution bằng cách ly tâm với tốc độ 11.000 vòng/phút trong 30 giây. Cột minicolumn chứa mẫu RNA được ủ với 30 µL DNase I incubation mix trong 15 phút ở 20°C, sau đó được rửa với 200 µl Column wash solution và ly tâm với tốc độ 11.000 vòng/phút trong 15 giây. Cột chứa mẫu được bổ sung 500 µL RNA Wash Solution và ly tâm với tốc độ 11.000 vòng/phút trong 30 giây, dịch thải qua ống được loại bỏ. Cột minicolumn được chuyển sang ống thu mới, được bổ sung 300 µL RNA wash solution vào cột và ly tâm với tốc độ 11.000 vòng/phút trong 2 phút. Cột minicolumn tiếp tục được chuyển sang eppendorf sạch và được bổ sung 50 µL nước cất nuclease-free water, ly tâm với tốc độ 11.000 vòng/phút trong 1 phút để thu RNA. Các mẫu RNA thu được được trữ trong nitơ lỏng trước khi tiến hành chạy real-time qRT-PCR.

Real-time qRT-PCR: Sự biểu hiện mức độ phiên mã của các gene liên quan đến chu kỳ tế bào được định lượng bằng phương pháp real-time qRT-PCR. Các gene được đánh giá bao gồm *cdk4*, *cdk6*, *cyclin A*. Gene *gapdh* được sử dụng để làm đối chứng. Phản ứng real-time qRT-PCR được chạy bằng máy real-time PCR System (Thermo Scientific, Mỹ), 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 20 µL bao gồm 1 µL RNA mẫu, 2 µL môi xuôi và ngược, 10 µL 2X Mix Hi-ROX, 1 µL RTase, và 6 µL dH₂O. Chu trình nhiệt của phản ứng như trong Bảng 2.5. Các cặp môi đặc trưng cho các gene khảo sát được thể hiện trong Bảng 2.6. Mức độ biểu hiện gene sẽ được tính bằng phương pháp $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [58].

Bảng 2.5. Chu trình nhiệt của phản ứng real-time qRT-PCR cho các gene liên quan đến điều hòa chu kỳ tế bào

Phản ứng	Nhiệt độ	Thời gian
Chuyển hóa RNA thành DNA	45°C	15 phút
Tách mạch	95°C	2 phút
40 chu kỳ	95°C	10 giây
	62°C	15 giây
71 bước	60°C	30 giây
Trữ mẫu	4°C	30 phút

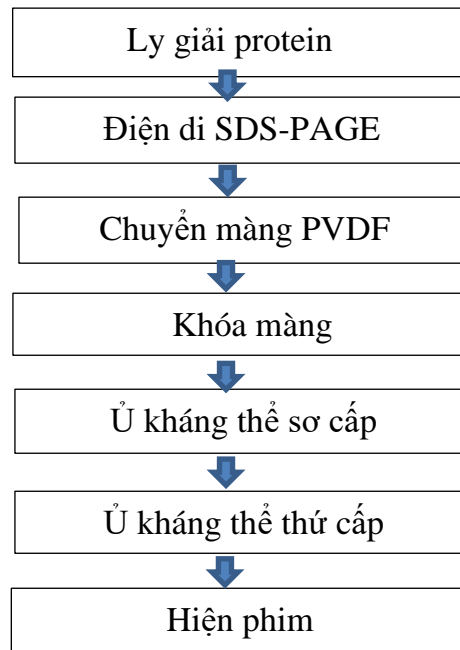
Bảng 2.6. Trình tự mỗi các gene điều hòa chu kỳ tế bào

Gene	Trình tự mỗi	Tài liệu tham khảo
<i>cdk4</i>	F 5'- TTC GAG CAT CCC AAT GTT GTC -3'	[59]
	R 5'- GTC TCG ATG AAC GAT GCA GTT G-3'	
<i>cdk6</i>	F 5'-TTG GCT TTG GTG GGT AGT TCT -3	
	R 5'-TGA ATG TCG GGT AGG AAG ATT G-3'	
<i>cyclin D1</i>	F 5'-TGC ATC TAC ACC GAC AAC TCC A-3'	
	R 5'-GTT GGA AAT GAA CTT CAC GTC TGT-3	
<i>cyclin A</i>	F 5'-GAT TTA CAT CTT AGA AAA CAA AGG-3	[60]
	R 5'-GGT GAT CCC GCC GTC CAC T-3'	
<i>gapdh</i>	F 5'-ATG GTG AAG GTC GGA GTC AAC-3'	[59]
	R 5'-CTC GCT CCT GGA AGA TGG T-3'	

Đánh giá biểu hiện mức độ dịch mã của các protein Cdk4, Cdk6, Cyclin A1 + A2 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 chi tiết các bước thực hiện như mô tả bên dưới:



Hình 2.1. Tóm tắt sơ đồ các bước thực hiện western blot

Ly giải protein: Tế bào pGC sau khi thu hoạch được ly giải bằng Optiblot LDS Sample Buffer (ab119196, Abcam, Mỹ) trong bể ổn nhiệt ở điều kiện 70°C trong 10 phút. Lượng protein thu được từ các mẫu được chuyển vào các giếng của Precast gel SDS-PAGE 4-12% (ab139596, Abcam, Mỹ).

Điện di SDS-PAGE: Sau đó được điện di trong Optiblot SDS Run Buffer (ab119197, Abcam, Mỹ) trong 2 giờ ở 50 V. Bể điện di được giữ lạnh bằng đá gel để tránh sự thoái hóa protein.

Chuyển màng PVDF: Protein đã được phân tách trong Precast Gel SDS-PAGE được chuyển lên màng PVDF (ab133411, Abcam, Mỹ), được kẹp bởi một lớp giấy lọc Extra Thick Blot Paper (1703966, Bio-Rad, Mỹ) và một lớp bọt biển ở mỗi bên và đặt cố định vào cassette (hình 2.3). Cassette này được đặt vào bể điện di chứa buffer TBST sao cho mặt gel nằm ở phía cực âm và màng PVDF nằm phía cực dương, và được điện di trong 2 giờ ở 50V.

Khóa màng: Màng PVDF được khóa màng qua đêm ở điều kiện 4°C trong dung dịch đệm khóa màng (Blocking Buffer, ab126587, Abcam, Mỹ).

Ủ kháng thể sơ cấp: Các kháng thể được sử dụng trong nghiên cứu này gồm Anti Cyclin A1 + Cyclin A2 antibody (ab185619, Abcam, Mỹ), Anti-Cdk4 antibody (ab137675, Abcam, Mỹ) và Anti-Cdk6 antibody (ab124821, Abcam, Mỹ) được pha loãng 1:5000; kháng thể Anti- Gapdh antibody (ab181602, Abcam, Mỹ) cho protein Gapdh được pha loãng với tỉ lệ 1:5000. Sau khi ủ qua kháng thể sơ cấp, màng PVDF được rửa lại 3 lần, mỗi lần cách nhau 10 phút với dung dịch TBST.

Ủ kháng thể thứ cấp: Sau khi ủ xong với kháng thể sơ cấp và rửa, màng PVDF được ủ tiếp với kháng thể thứ cấp Goat-Anti Rabbit IgG (HRP) (ab6721, Abcam, Mỹ)

Hiện phim: Kit AUTOMATIC X-RAY (873498, Fujifilm, Nhật Bản) được sử dụng để hiển thị kết quả western blot. Tất cả quá trình hiện phim được thực hiện trong phòng tối theo tuần tự: Tấm phim CL-XPosure Film (34090, Thermo Scientific, Mỹ) được đặt lên màng PVDF và ủ trong 60 giây. Sau đó, phim được nhúng vào dung dịch hiện hình trong 15 giây, ngay lập tức chuyển sang dung dịch định hình trong 15 giây. Cuối cùng, rửa lại phim bằng nước cất trong vòng 30 giây. Các vạch protein phát huỳnh quang trên màng PVDF sẽ được hiển thị âm bản trên phim. Cường độ của các vạch protein hiện trên phim được đo bằng phần mềm ImageJ (Viện sức khỏe quốc gia Mỹ).

2.2.5. Phương pháp đánh giá quá trình tế bào chết theo chương trình

2.2.5.1. Đánh giá tỉ lệ tế bào chết theo chương trình bằng phương pháp tế bào dòng chảy

Các pGC được nuôi cấy trong bình T-25 với mật độ tế bào 1×10^5 tế bào/ bình trong môi trường DMEM/Ham's F-12 với 15% FBS và 1% Pen/Strep ở điều kiện SMG trong 72 giờ. Sau thời gian thử nghiệm, lấy bình nuôi tế bào pGC ra khỏi tủ nuôi, ghi lại thông tin và chuyển vào tủ cấy vô trùng, gỡ nhẹ bình nuôi tế bào cho các tế bào chết bong tróc sau đó hút bỏ môi trường cũ trong bình tế bào này. Rửa tế bào bằng PBS 3 lần mỗi lần 5 phút. Cho 1mL trypsin-EDTA 0,25% (Capricorn Scientific, Đức) vào bình nuôi tế bào, nghiêng nhẹ bình nuôi cho dung dịch trypsin-EDTA trải đều hết trên bề mặt tế bào. Ủ bình nuôi trong tủ nuôi 5 phút, sau đó quan sát dưới kính hiển vi xác nhận tế bào đã tách hoàn toàn ra khỏi bề mặt bình nuôi. Sau đó cho tiếp 4mL tế bào chứa FBS vào bình nuôi, huyền phù hóa nhẹ. Chuyển toàn bộ huyền phù tế bào ở bước trên vào ống ly tâm 15mL (lưu ý trước khi ly tâm ống 15mL cần

được quấn parafilm để đảm bảo vô trùng) và cho vào máy ly tâm ở chế độ 1500 vòng/phút trong 5 phút. Lấy ống 15mL ra khỏi máy ly tâm, khử trùng bằng cồn 70%, tháo parafilm và đưa vào tủ cấy. Nhẹ nhàng hút bỏ môi trường bên trong ống ly tâm để thu phần tế bào lắng sau ly tâm. Tế bào sau khi thu hoạch được cố định với 4% paraformandehyde (Nacalai Tesque, Kyoto, Nhật) trong 15 phút. Sau đó xử lý với FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, Mỹ) để đánh giá tỉ lệ apoptosis. Eppendorf chứa tế bào được ủ với dung dịch chứa 100 mL Binding Buffer 1X, 5 μ L PI (Propidium Iodide) và 5 μ L FITC trong 25 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Sau đó, mẫu tế bào được bổ sung thêm 400 μ L Binding Buffer 1X và được phân tích bởi hệ thống BD Accuri™ C6 Flow Cytometer. (BD Biosciences, Mỹ). Những tế bào đang trong quá trình apoptosis sẽ được thể hiện bằng tỉ lệ các tế bào dương tính với Annexin- V-FITC và các tế bào dương tính với PI.

2.2.5.2. Phương pháp đánh giá biểu hiện phiên mã của các gene apoptosis

Đánh giá biểu hiện mức độ phiên mã của của gene *bax* và *bcl-2* liên quan đến apoptosis bằng phương pháp real-time qRT-PCR. Các bước tách chiết RNA tổng của tế bào, tương tự như các bước trong phần đánh giá biểu hiện mức độ phiên mã các gen *cdk4* và *cdk6*, *cyclin A*, *cyclin D1* điều hòa chu kỳ tế bào thuộc mục 2.2.4.2.

Phản ứng real-time qRT-PCR

Sự biểu hiện mức độ phiên mã của các gene liên quan đến sự chết theo chương trình (apoptosis) được đánh giá bằng phương pháp real-time qRT-PCR. Các gene được đánh giá bao gồm *bax* và *bcl-2*. Gene *gapdh* được sử dụng để làm đối chứng. Phản ứng real-time qRT-PCR được chạy bằng máy real-time PCR System (Thermo Scientific, Mỹ), sử dụng kit 2x qPCR SyGreen 1-Step Go Hi-ROX kit (PB25.32.03, PCR Biosystem, Anh). Mỗi phản ứng có tổng thể tích là 20 μ L bao gồm 1 μ L RNA mẫu, 2 μ L môi xuôi và ngược, 10 μ L 2X Mix Hi-ROX, 1 μ L RTase, và 6 μ L dH₂O. Chu trình nhiệt của phản ứng như trong bảng 2.7. Các cặp môi đặc trưng cho các gene khảo sát được thể hiện trong bảng 2.8. Mức độ biểu hiện gene sẽ được tính bằng phương pháp $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Bảng 2.7. Chu trình nhiệt của phản ứng real-time qRT-PCR cho các gene liên quan đến apoptosis.

Phản ứng	Nhiệt độ	Thời gian
Chuyển hóa RNA thành DNA	45°C	15 phút
Tách mạch	95°C	2 phút
40 chu kỳ	95°C	10 giây
	52,2°C	15 giây
71 bước	60°C	15 giây
Trữ mẫu	4°C	30 phút

Bảng 2.8. Trình tự mỗi các gene liên quan đến apoptosis

Gene	Trình tự mỗi	Tài liệu tham khảo
<i>bax</i>	F 5'- CCA GGA GTT CCC AAT GTT GTC -3'	[61]
	R 5'- TTC ATC CAG GGG AGG TAC AAC -3'	
<i>bcl-2</i>	F 5'-TCT TCA TTC ACA CCG AGT AG TGC -3	
	R 5'- TGA GGT TAG AGC CAT CTG GAA A -3'	
<i>gapdh</i>	F 5'- CAT GAG AAG TAT GAC AAC AGC CT -3'	[59]
	R 5'- AGTCCTTTCCACGATACCAAAGT -3'	

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

Sau khi hoàn tất việc nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng, các tế bào pGC cần được thu hoạch và cố định tế bào để chuẩn bị cho việc đánh giá hình thái nhân và tế bào chất của tế bào. Các đĩa 96 giếng chứa tế bào pGC được rút bỏ môi trường và rửa lại 3 lần với PBS. Mỗi giếng tế bào được rửa 3 lần với 100 μ L PBS (PBS-10XA, Capricorn Scientific, Đức). 50 μ L 4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (09154-85, Nacalai Tesque, Nhật Bản) được cho vào mỗi giếng tế bào và ủ trong 15 phút. Mỗi giếng tế bào được rửa 3 lần với PBS (100 μ L/lần). Sau đó, 50 μ L Triton 0,1% (X100, Sigma-Aldrich, Mỹ) được bổ sung vào mỗi giếng và ủ trong 1 giờ.

2.2.6.1. Phương pháp đánh giá hình thái nhân

Nhân tế bào pGC được nhuộm bằng Hoechst 33342 với thể tích 30 μL /giếng, trong 15 phút. Tế bào sau đó được rửa lại 3 lần với PBS và đem quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Cytell (GE Healthcare, Mỹ). Các chỉ số liên quan đến hình thái nhân tế bào gồm: cường độ, diện tích, hình dạng được phân tích bằng phần mềm ứng dụng Cell Cycle [62].

2.2.6.2. Phương pháp đánh giá hình thái tế bào chất (diện tích tế bào, chỉ số FSC)

Để đánh giá sự thay đổi hình thái tế bào chất cũng như diện tích tế bào, phần mềm ImageJ (Viện sức khỏe quốc gia, Mỹ) được sử dụng để đánh giá. Các ảnh chụp tế bào từ hệ thống kính hiển vi huỳnh quang Cytell được chuyển đổi sang dạng 8-bit và thiết lập các thông số theo một ngưỡng chung để loại bỏ ánh sáng nền trước khi tính toán. Để củng cố thêm bằng chứng liên quan đến những thay đổi về mặt hình thái của pGC trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng cũng được đánh giá bằng phương pháp tế bào dòng chảy thông qua đo chỉ số FSC (Forward Scatter), theo nguyên lý: Khi dòng tế bào đi qua nguồn laser của hệ thống phân tích tế bào dòng chảy, chúng sẽ bị tán xạ lại ánh sáng. Sự phản xạ này được thu nhận và đo bằng 2 cảm biến quang học. Một cảm biến đo sự phân tán dọc theo đường đi của tia laser và cho ra chỉ số FSC. Chỉ số này được tính toán bằng cách chuyển đổi cường độ ánh sáng phát ra thành tín hiệu điện. Phép đo FSC cho phép phân biệt các tế bào theo kích thước dựa trên nguyên tắc cường độ của FSC tỉ lệ thuận với đường kính tế bào.

2.2.7. Phương pháp đánh giá sự thay đổi cấu trúc khung xương tế bào

Thu hoạch tế bào được thực hiện như mục 2.2.4.2 trong phần thu hoạch tế bào.

2.2.7.1. Đánh giá biểu hiện phiên mã các gen vi ống, vi sợi

Biểu hiện mức độ phiên mã của các gene mã hóa cho bộ khung xương tế bào được đánh giá bằng phương pháp real-time qRT-PCR. Gene α -tubulin và β -actin là 2 gene được sử dụng để đánh giá. Gene *gapdh* được sử dụng để làm đối chứng. Quá trình thực hiện thí nghiệm được thực hiện tuần tự như các bước mục 2.2.4.2 đánh giá chu kỳ tế bào. Phần đánh giá biểu hiện mức độ phiên mã các gene điều hòa chu kỳ tế bào. Trong trường hợp cụ thể này chu trình nhiệt như bảng 2.9 các cặp mồi đặc trưng cho các gene khảo sát được thể hiện như bảng 2.10.

Bảng 2.9. Chu trình nhiệt của phản ứng real-time qRT-PCR cho các gene mã hóa khung xương tế bào

Phản ứng	Nhiệt độ	Thời gian
Chuyển hóa RNA thành DNA	45°C	15 phút
Tách mạch	95°C	2 phút
40 chu kỳ	95°C	10 giây
	60°C	15 giây
71 bước	60°C	15 giây
Trữ mẫu	4°C	30 phút

Bảng 2.10. Trình tự mỗi của các gene mã hóa khung xương tế bào

Gene	Trình tự mỗi	Tài liệu tham khảo
<i>α-tubulin</i>	F 5'- CATTGAAAAGTTGTGGTCTGATCA -3'	[63]
	R 5'- GCTTGGGTCTGTAACAAAGCAT -3'	
<i>β-actin</i>	F 5'- CACGCCATCCTGCGTCTGGA -3	[64]
	R 5'- AGCACCGTGTTGGCGTAGAG -3'	
<i>gapdh</i>	F 5'- CATGAGAAGTATGACAACAGCCT -3'	[59]
	R 5'- AGTCCTTTCCACGATACCAAAGT -3'	

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

Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện của các protein cấu trúc khung xương là α -tubulin và β -actin được đánh giá bằng phương pháp western blot. Protein GAPDH được sử dụng làm đối chứng. Các bước thực hiện thí nghiệm tương tự như mục 2.2.4.2 Đánh giá chu kỳ tế bào, phần đánh giá biểu hiện mức dịch mã của các gene điều hòa chu kỳ tế bào. Các kháng thể được sử dụng bao gồm:

Kháng thể sơ cấp: Anti-beta actin antibody (ab8226, Abcam, Mỹ) và Anti alpha tubulin antibody (ab52866, Abcam, Mỹ) được pha loãng với tỉ lệ 1:1000, Anti -GAPDH antibody (ab18602, Abcam, Mỹ) được pha loãng với tỉ lệ 1:5000.

Kháng thể thứ cấp: Goat Anti-rabbit IgG (HRP) (ab6721, Abcam, Mỹ) và Goat Anti- Mouse IgG (HRP) (ab6789, Abcam, Mỹ).

2.2.8. Phương pháp thống kê

Phần mềm Sigma Plot (SYSTAT, Mỹ) được dùng để phân tích số liệu trong nghiên cứu. Phương pháp Duncan 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.

*Sơ đồ tóm tắt các bước trong nội dung nghiên cứu



Hình 2.2. Sơ đồ tóm tắt các bước trong nội dung nghiên cứu

CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

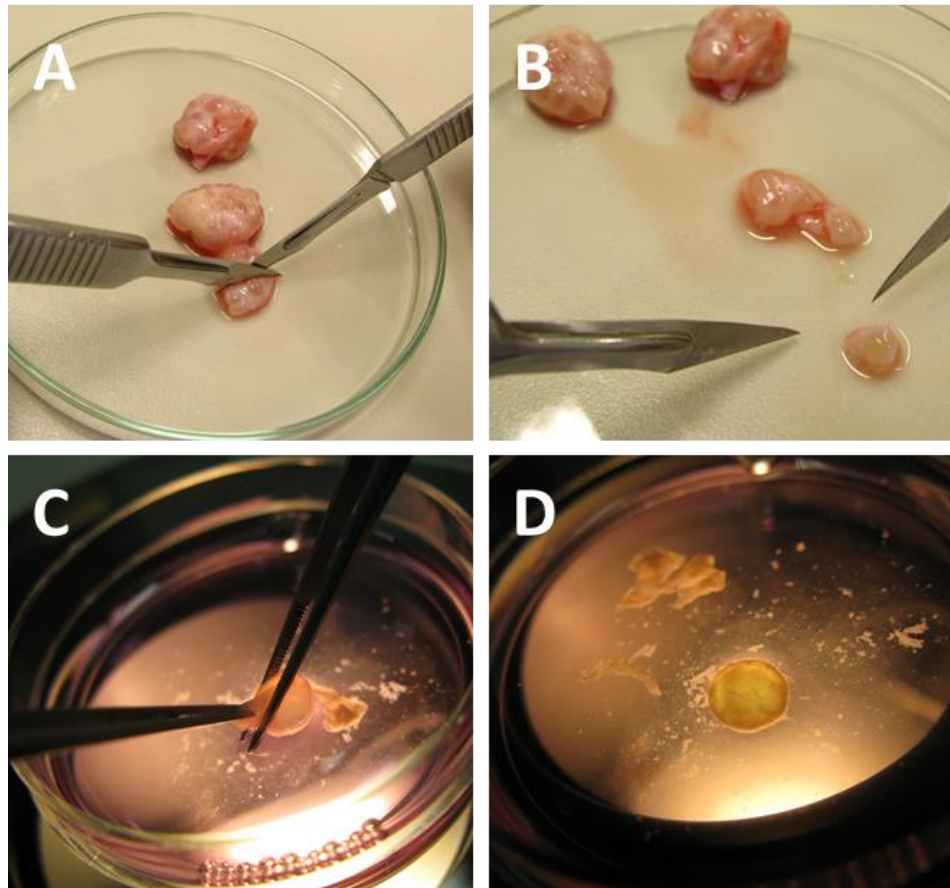
3.1. Kết quả thu nhận và nuôi cấy tế bào pGC

3.1.1. Kết quả thu nhận nang trứng và tế bào pGC

Trong nghiên cứu này, các nang tốt được dùng cho việc thu nhận tế bào hạt, còn các nang xấu, thoái hóa sẽ được loại bỏ. Các nang có chất lượng xấu là nang có màu trắng, tế bào hạt bên trong bị bong khỏi thành nang noãn, tế bào đang trong giai đoạn thoái hóa, xảy ra quá trình tế bào chết theo chương trình. Các nang noãn tốt có kích thước tròn đều, có màu vàng tươi và các mạch máu vẫn còn quanh nang, tế bào hạt không bị bong khỏi thành nang noãn và không bị thoái hóa.

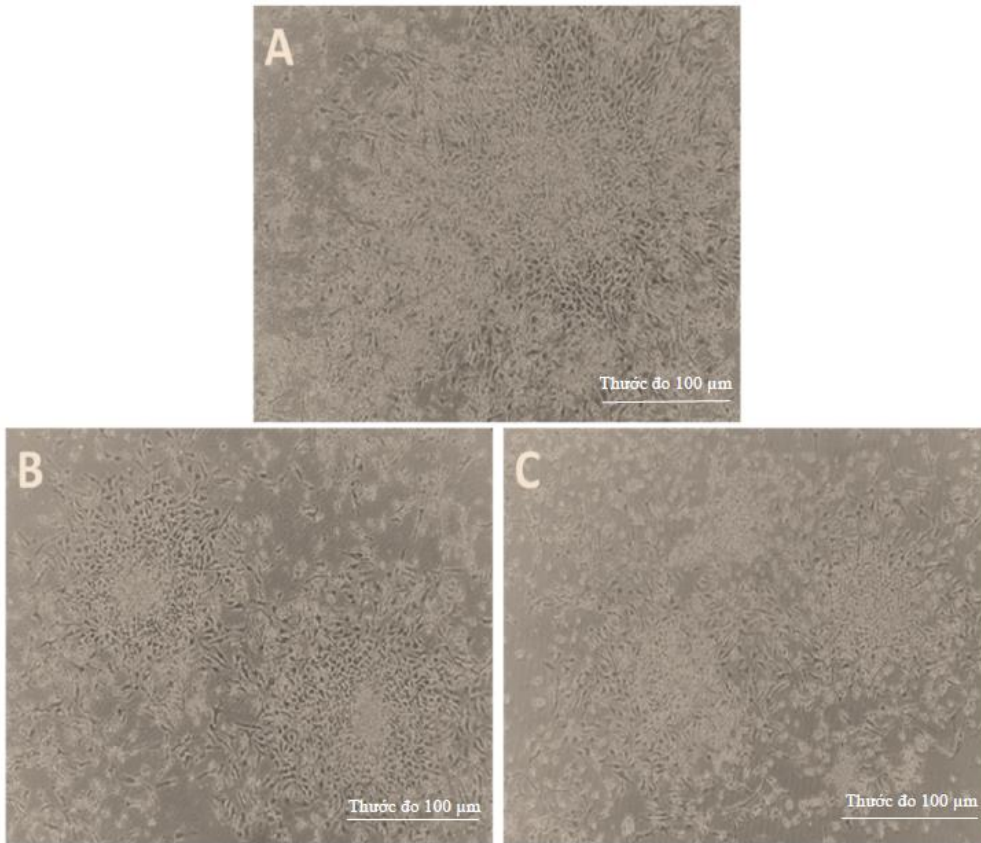
Phương pháp cắt nang được sử dụng cho việc thu nhận tế bào hạt. Phương pháp này đòi hỏi kỹ thuật thao tác phức tạp hơn phương pháp chọc hút nhưng nó không chỉ giúp chọn lọc một cách chính xác các nang tốt, mà còn phân loại được các nang theo các kích thước khác nhau. Tế bào được thu nhận bằng phương pháp cắt nang có chất lượng tốt hơn, đảm bảo cho quá trình nuôi cấy, tăng sinh và đánh giá các đặc điểm hình thái, biểu hiện gene cũng như khả năng biệt hóa của tế bào. Trong khi đó thu tế bào hạt bằng phương pháp chọc hút bằng kim có thể làm lẫn tế bào hạt với các loại tế bào khác của nang trứng như tế bào biểu mô, tế bào theca hay lẫn tế bào máu và hồng cầu, hoặc thu nhầm tế bào từ các nang xấu, thoái hóa ẩn trong lớp vỏ nang.

Hình 3.1. thể hiện quá trình thu nhận nang trứng bằng phương pháp cắt rời từng nang. Các nang đơn sau đó được loại bỏ màng và các mảng mô xung quanh. Hình 3.1D thể hiện một nang đơn có chất lượng tốt, nang có cấu trúc đồng đều, dịch nang trong suốt và vàng đều, các mạch máu quanh nang vẫn còn, không có tế bào bong tróc trong 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 cấp, cấy chuyên và thử nghiệm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng. Nghiên cứu này đã thu nhận được 78 nang trứng heo đơn có chất lượng tốt. Trong đó số lượng các nang có kích thước được sử dụng cho phân lập tế bào hạt (đường kính nang từ 2-6 mm) là 45. Tế bào hạt từ các nang này cho khả năng tăng sinh tốt, có hình thái đồng nhất.



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 trứng heo đơn.

Sau khi thu nhận các nang trứng heo, tế bào hạt sẽ được thu nhận bằng cách sử dụng ống mao quản hút dịch nang và tế bào bên trong nang trứng. Tế bào sẽ được chuyển vào các bình nuôi tế bào T25 với môi trường nuôi cấy DMEM bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh. Sau 24 giờ nuôi cấy, tế bào pGC phát triển và bám trải trên bề mặt bình nuôi cấy (hình 3.2). Tế bào pGC có hình dạng hình thoi sau 3 giờ và 12 giờ nuôi cấy. Tế bào pGC tăng sinh bình thường, không có biểu hiện phân mảnh của tế bào chết hay phân mảnh nhân.



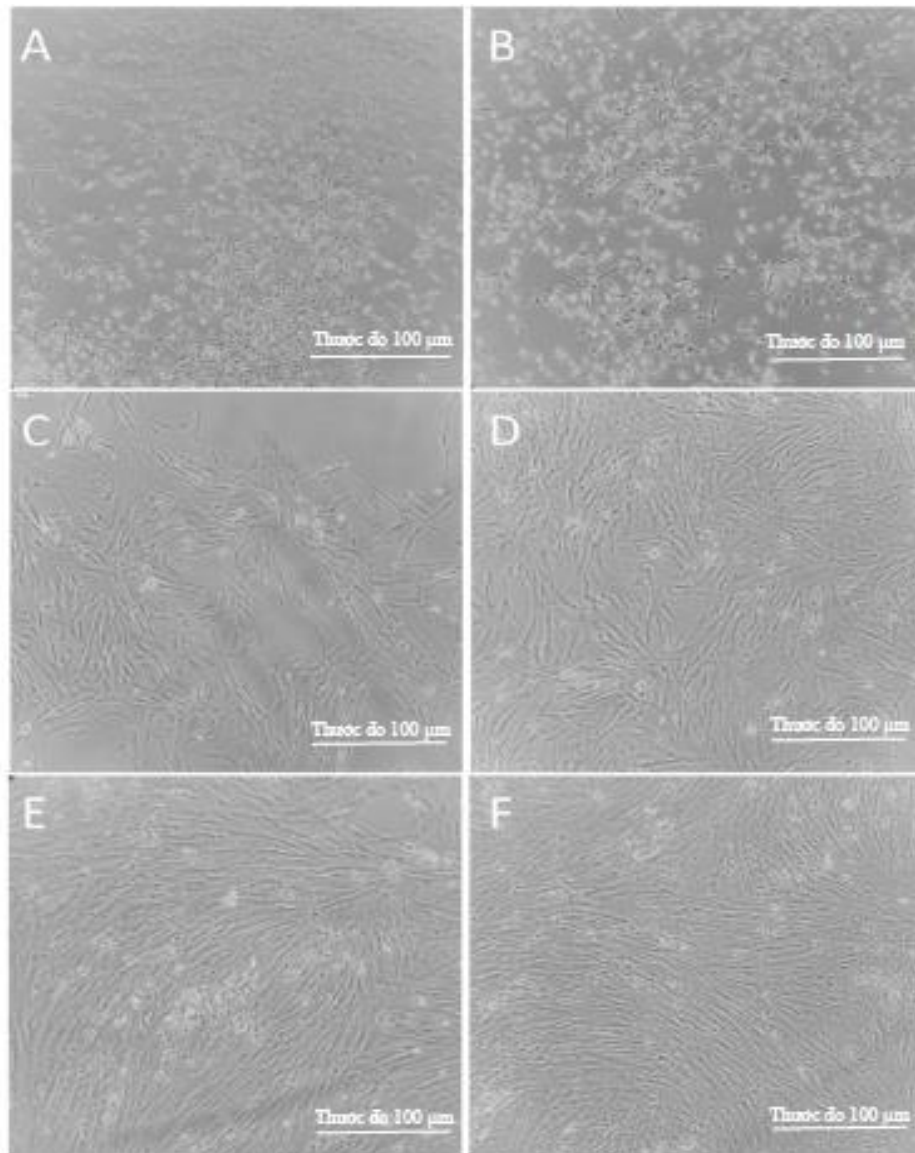
Hình 3.2. Kết quả nuôi cấy sơ cấp tế bào pGC. A, B, C: các quần thể tế bào pGC bám và tăng sinh trên bề mặt bình nuôi cấy sau 24 giờ.

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

Trong nuôi cấy sơ cấp, tế bào pGC bám và phát triển trên bề mặt bình nuôi cấy (hình 3.2A), các tế bào ở lần cấy chuyển sơ cấp này có dạng hình thoi. Tế bào nuôi cấy sơ cấp thể hiện sự tăng sinh mạnh, (hình 3.2B) nhưng trong quá trình thu nhận tế bào, nhiều tế bào chết, không bám được lên bề mặt bình nuôi cấy T25 (hình 3.2C). Do đó, các tế bào chết này cần được loại bỏ. Tế bào pGC nuôi cấy sơ cấp cần được cấy chuyển để đánh giá khả năng tăng sinh cũng như để thu được quần thể tế bào hạt đồng nhất.

Trong lần cấy chuyển thứ nhất (hình 3.3A và B), pGC vẫn thể hiện khả năng tăng sinh mạnh, tế bào vẫn giữ được hình thái giống tế bào nuôi cấy sơ cấp. Các tế bào đã bám và tăng sinh rời nhau, không còn phát triển thành từng cụm như trong nuôi cấy sơ cấp. Tế bào ở lần cấy chuyển thứ nhất này bắt đầu thể hiện đặc điểm hình thái giống nguyên bào sợi như bám trải mạnh, tế bào dạng phẳng, kéo dài giống hình

thoi. Tế bào không biểu hiện đặc điểm thoái hóa hay sự chết theo chương trình (phân mảnh tế bào chất).



Hình 3.3. Hình thái tế bào pGC qua các lần cấy chuyển. A, B. Tế bào pGC lần cấy chuyển thứ 1. C, D. Tế bào pGC lần cấy chuyển thứ 3 và 5. E, F. Tế bào pGC lần cấy chuyển thứ 7 và 9.

Ở lần cấy chuyển thứ 3 và 5 (hình 3.3C và 3.3D). Tế bào pGC vẫn thể hiện khả năng tăng sinh mạnh. Tế bào bám trải mạnh hơn, vẫn duy trì đặc điểm hình thái giống nguyên bào sợi. Tế bào không biểu hiện đặc điểm thoái hóa hay sự chết theo chương trình (phân mảnh tế bào chất).

Ở lần cấy chuyển thứ 7 và 9 (hình 3.3E và 3.3F). Tế bào pGC vẫn thể hiện khả năng tăng sinh mạnh. Tế bào bám trải mạnh hơn, tuy vẫn duy trì đặc điểm hình thái

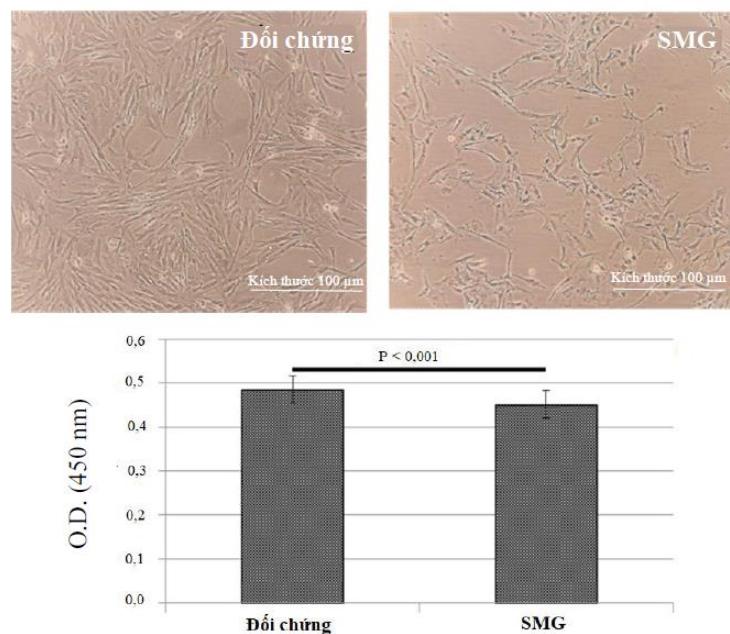
giống nguyên bào sợi nhưng trong quần thể tế bào hạt ở các lần cấy chuyên này đã xuất hiện một số tế bào thay đổi hình dạng. Hơn nữa, trong quần thể tế bào hạt cũng đã bắt đầu xuất hiện một số đặc điểm thoái hóa cũng như sự chết theo chương trình như phân mảnh tế bào chết. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu của Dinarelli và cộng sự thực hiện năm 2018 trên tế bào hồng cầu [96], Zhang và cộng sự thực hiện trên tế bào pGC [36].

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

Mức độ tăng sinh của pGC 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

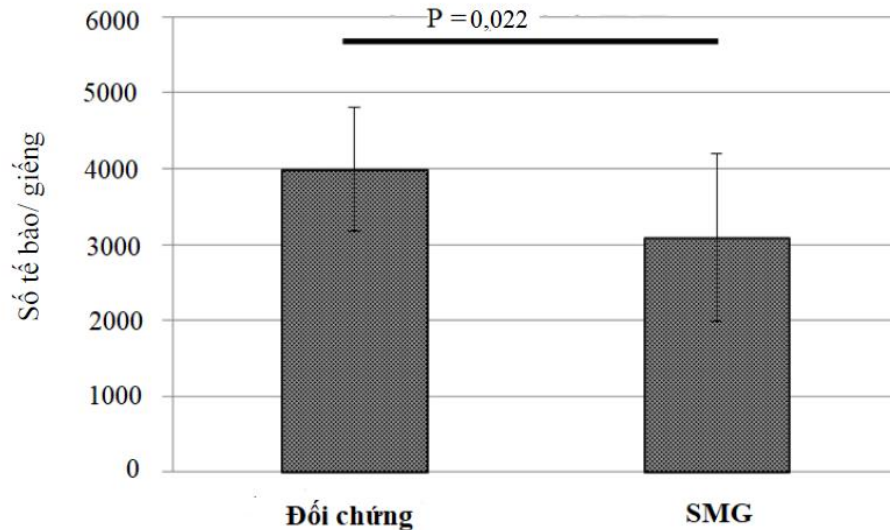
Sau thử nghiệm vi trọng lực, có thể nhận thấy sự khác biệt về mật độ tế bào pGC giữa hai nhóm thí nghiệm. Qua quan sát dưới kính hiển vi, các tế bào pGC ở nhóm SMG có phần mọc thưa hơn và mật độ thấp hơn so với nhóm đối chứng (hình 3.4). Kết quả đo mật độ quang hai nhóm thí nghiệm ở phương pháp WST-1 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).



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

3.2.2 Kết quả đánh giá sự thay đổi mật độ tế bào bằng phần mềm Cytell

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 pGC trung bình ở nhóm SMG là 3.095 ± 1.108 tế bào/giếng, thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng là 3.995 ± 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.

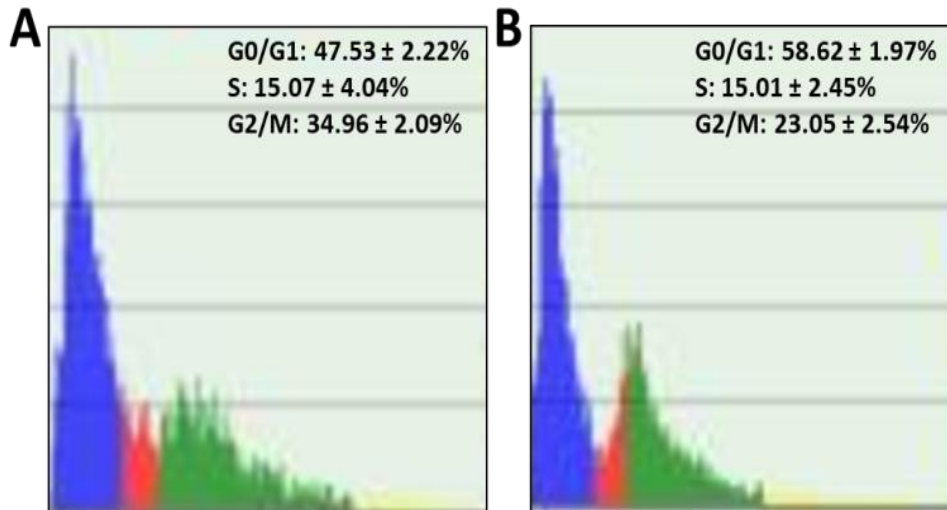


Hình 3.5. Thử nghiệm đánh giá mật độ pGC bằng Cell Cycle App của kính hiển vi huỳnh quang Cytell.

3.2.3. Kết quả đánh giá chu kỳ tế bào

3.2.3.1. Kết quả đánh giá tỉ lệ các pha

Chu kỳ tế bào pGC được đánh giá bằng phần mềm Cell Cycle App của hệ thống kính hiển vi huỳnh quang Cytell. Qua kết quả thể hiện ở hình 3.6, tỉ lệ tế bào pGC đi vào pha nghỉ G0/G1 ở nhóm SMG là $58,62 \pm 1,97\%$, cao hơn so với nhóm đối chứng là $47,53 \pm 2,22\%$ ($P < 0,001$). Pha tổng hợp S ở hai nhóm thí nghiệm không có sự khác biệt đáng kể. Tỉ lệ tế bào đi vào pha S ở nhóm đối chứng là $15,07 \pm 4,04\%$ trong khi ở nhóm SMG là $15,01 \pm 2,45\%$. Tỉ lệ tế bào pGC đi vào pha phân chia ở nhóm SMG giảm so với nhóm đối chứng ($23,05 \pm 2,54\%$ so với $34,96 \pm 2,09\%$, $P < 0,001$). Kết quả này chứng tỏ điều kiện SMG đã cảm ứng tế bào pGC giảm phân chia và đi vào pha nghỉ.

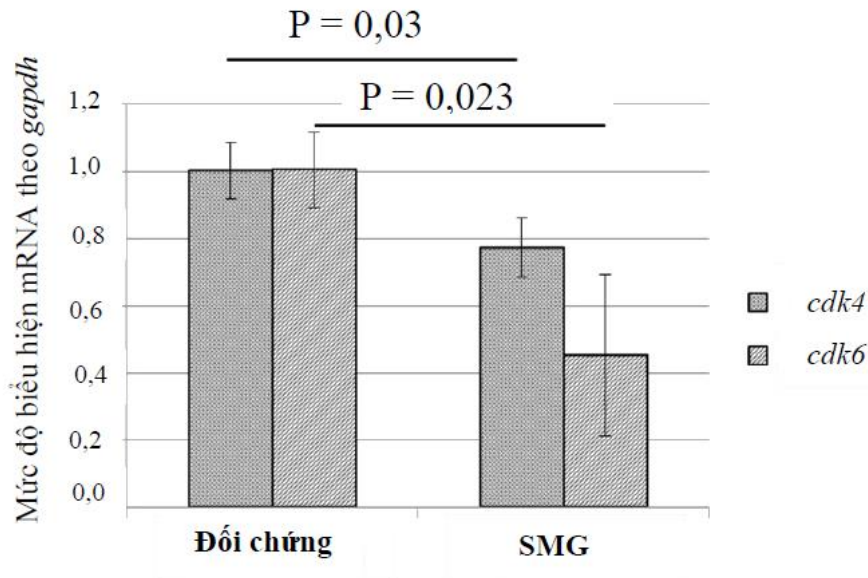


Hình 3.6. Phân tích chu kỳ tế bào bằng phần mềm Cell Cycle của kính hiển vi huỳnh quang Cytell. Màu xanh dương thể hiện pha G0/G1, màu đỏ thể hiện pha S, màu xanh lá thể hiện pha G2/M. A. Nhóm đối chứng. B. Nhóm cảm ứng SMG.

Quá trình tái cấu trúc nhân cần sự tổng hợp DNA và các thành phần tế bào liên quan. Trong pha S của chu kỳ tế bào, việc sao chép DNA dẫn đến sự tăng cường độ nhân và ngưng tụ nhiễm sắc chất. Quá trình chuyển từ pha S sang pha G2/M chuẩn bị cho giai đoạn nguyên phân cũng làm tăng cường độ nhân trong tế bào [65]. Kết quả đánh giá hình thái nhân trong nghiên cứu cho thấy tuy không có sự thay đổi rõ nét về diện tích và hình dạng, cường độ nhân của tế bào pGC giảm khi được nuôi trong môi trường vi trọng lực mô phỏng. Kết hợp với các đánh giá về chu kỳ tế bào, những thay đổi này được cho là kết quả của sự giảm biểu hiện các gene liên quan đến chu kỳ tế bào, dẫn đến làm giảm tỉ lệ tế bào đi vào quá trình phân chia ở tế bào pGC trong môi trường vi trọng lực mô phỏng.

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

Phân tích real-time qRT-PCR cho thấy sự biểu hiện của gene *cdk4* trong tế bào pGC ở nhóm đối chứng cao hơn so với tế bào pGC trong nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng ($P = 0,03$). Tế bào 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 tế bào pGC ở nhóm tế bào hạt nang noãn cảm ứng vi trọng lực mô phỏng diễn ra mạnh hơn so với sự biểu hiện của gene *cdk4*.

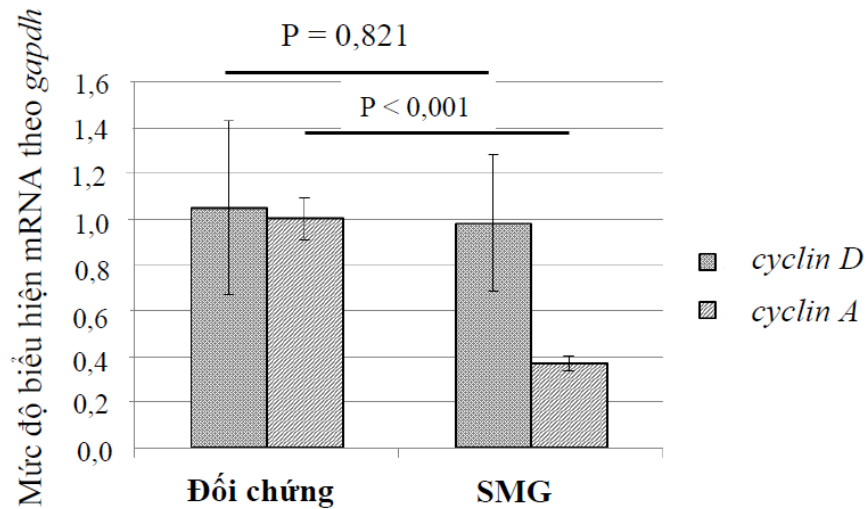


Hình 3.7. Kết quả phân tích real-time qRT-PCR gene *cdk4* và *cdk6* ở pGC.

Tiến trình chu trình tế bào và sự biểu hiện của các protein chu kỳ tế bào chính đã được xác định có liên quan đến việc giảm sự tăng sinh tế bào. Phân chia tế bào là quá trình cho phép tế bào tăng sinh. Trong tiến trình chu kỳ tế bào, Cdk4 và Cdk6 liên kết với các cyclin D để tạo ra các phức hợp thúc đẩy quá trình chuyển từ pha G1 sang pha S [66]. Sự chuyển đổi này đóng một vai trò quan trọng trong việc kiểm soát sự tăng sinh tế bào [67]. Ức chế Cdk4/6 gây ra sự suy giảm tăng sinh tế bào [68];[69]. Cdk4 và Cdk6 giảm biểu hiện trong tế bào pGC trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng dẫn đến sự gia tăng tế bào trong pha G0/G1.

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

Phân tích real-time qRT-PCR như hình 3.8 đối với gene *cyclin D* và *cyclin A* ở pGC chỉ ra rằng sự biểu hiện của gene *cyclin A* trong tế bào pGC ở nhóm đối chứng cao hơn so với tế bào pGC trong nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng ($P < 0,001$). Tuy nhiên, 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 ($P = 0,821$). Điều đó chứng tỏ vi trọng lực mô phỏng đã cảm ứng sự giảm biểu hiện của 2 gene *cyclin A* và *Cyclin D* ở tế bào hạt buồng trứng heo.

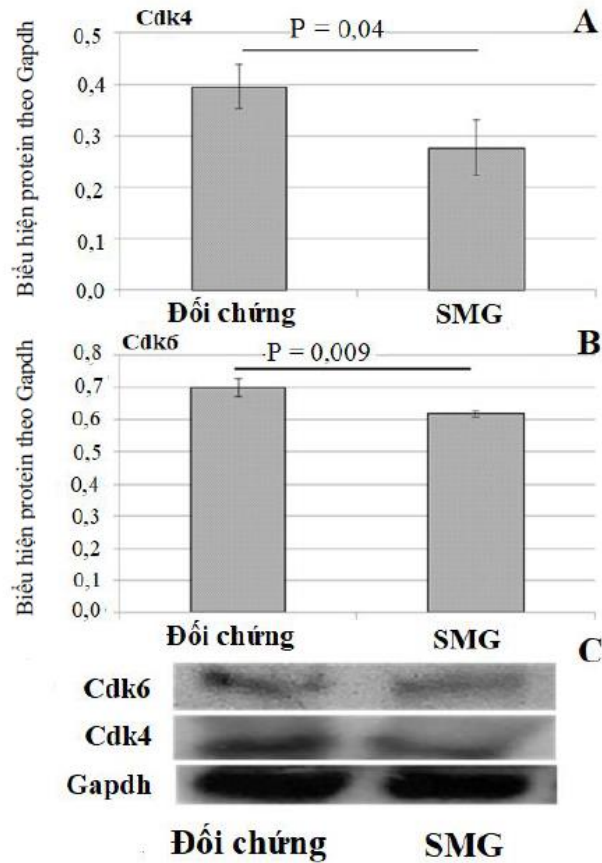


Hình 3.8. Kết quả phân tích real-time qRT-PCR gene *cyclin D* và *cyclin A* ở pGC

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

Kết quả phân tích western blot về sự biểu hiện của hai protein Cdk4 và Cdk6 được mô tả trong hình 3.9. Trong trường hợp này cho thấy tế bào pGC đều thể hiện sự giảm biểu hiện của protein Cdk4 và Cdk6 khi được cảm ứng vi trọng lực mô phỏng. Do đó, 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. Điều này dựa trên cơ sở sự sinh trưởng của tế bào gắn liền với chu kỳ tế bào. Một chu kỳ tế bào gồm 4 giai đoạn cơ bản gồm: pha nghỉ (G0/G1), pha tổng hợp DNA (S), pha tổng hợp protein và nguyên phân (G2) và pha M (nguyên phân).

Kết quả phân tích chu kỳ tế bào cho thấy tỉ lệ các tế bào pGC đi vào pha G0/G1 ở nhóm SMG cao hơn nhóm đối chứng, điều này cho thấy điều kiện vi trọng lực mô phỏng đã thúc đẩy tế bào pGC bước vào giai đoạn M trong chu kỳ tế bào [39]. Từ đó có thể kết luận rằng đây là nguyên nhân làm thay đổi tỉ lệ tế bào trong các pha khác nhau của chu kỳ tế bào pGC khi phân tích tích bằng phần mềm chương trình Cell cycle.



Hình 3.9. Sự biểu hiện protein Cdk4 và Cdk6.

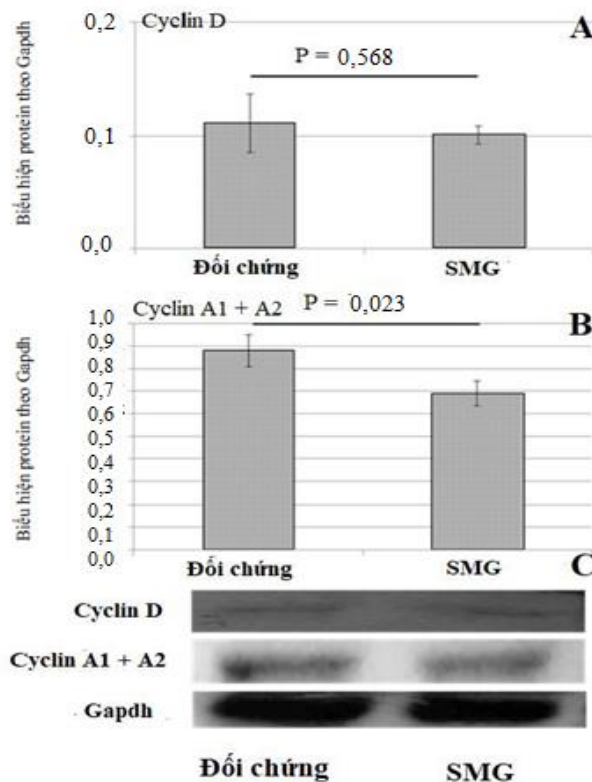
A. Kết quả phân tích mức độ biểu hiện protein Cdk6. B. Kết quả phân tích mức độ biểu hiện protein Cdk6. C. Phân tích western blot protein Cdk4 và Cdk6.

Sự tăng sinh của tế bào đòi hỏi sự phân chia tế bào được kiểm soát bởi các phân tử điều hòa chu kỳ tế bào như các Cyclin và Cdk [70]. Cdk4 và Cdk6 đóng vai trò quan trọng trong pha G1 và chúng cũng giúp thúc đẩy sự chuyển từ pha G1 sang pha S trong chu kỳ tế bào [71]. Bên cạnh đó, Cyclin D đóng vai trò quan trọng trong pha G1 và kích hoạt các giai đoạn chuyển tiếp giữa pha G1 và pha S [39]. Vì vậy, những thay đổi trong sự biểu hiện của Cdk4, Cdk6 và Cyclin D đều gây ảnh hưởng tới tiến triển của chu kỳ tế bào. Trong nghiên cứu này, sự biểu hiện của các Cdk4, Cdk6 và Cyclin D đều có sự suy giảm ở nhóm tế bào pGC được nuôi cấy trong môi trường vi trọng lực mô phỏng so với nhóm tế bào pGC đối chứng. Điều này cho thấy rằng điều kiện vi trọng lực mô phỏng gây ra sự bất giữ tế bào pGC ở pha G1 và ngăn chặn sự chuyển từ pha G1 sang pha S. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả phân tích chu kỳ tế bào với tỉ lệ tế bào pGC nuôi cấy trong môi trường vi trọng lực mô

phồng ở pha G0/G1 cao hơn so với tỉ lệ tế bào pGC nuôi cấy trong điều kiện bình thường.

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 3.20. 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 ở 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 các pha của chu kỳ tế bào pGC.



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.

Du hành vũ trụ gây ra nhiều thay đổi sinh lý ở người, bao gồm trao đổi chất, điều hòa gen, thành phần vi sinh vật, hệ miễn dịch [69]. Hơn nữa, các chuyến bay vũ trụ cũng khiến con người phải đối mặt với nhiều nguy cơ ảnh hưởng đến sinh sản liên quan đến bức xạ, vi trọng lực và siêu trọng lực [6]. Đây là một trong những nhược điểm của thí nghiệm thực hiện trong vũ trụ. Vì vậy, các thí nghiệm trên mặt đất trong điều kiện môi trường không gian mô phỏng là rất cần thiết để nghiên cứu sự thay đổi của tế bào, mô và cơ quan sinh sản mà không làm ảnh hưởng đến sức khỏe của các nhà nghiên cứu.

Nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng điều kiện vi trọng lực mô phỏng (SMG) được tạo ra bởi mô hình treo chỉ sau của Morey-Holton ức chế sự tăng sinh tế bào hạt ở chuột, thúc đẩy quá trình chết của tế bào hạt ở chuột, ảnh hưởng đến mức tiết hormone và làm giảm đáng kể khả năng sinh sản [72]. Ngoài ra, vi trọng lực mô phỏng tạo ra bằng hệ thống buồng quay cũng làm giảm sự phát triển của tế bào hạt ở chuột [73].

Trong nghiên cứu hiện tại, mô hình clinostat 3D được sử dụng để tạo điều kiện SMG. Kết quả của nghiên cứu cũng cho thấy điều kiện SMG ức chế sự tăng sinh của tế bào pGC. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trên. Hơn nữa, phân tích sự tiến triển của chu kỳ tế bào và sự biểu hiện của các protein chính liên quan đến chu kỳ tế bào được chứng minh là có liên quan đến việc giảm sự gia tăng số lượng các tế bào pGC.

Sự phân chia và tăng sinh tế bào rất cần thiết cho sự phát triển của sinh vật và cân bằng nội môi [74]. Chức năng cơ bản của chu kỳ tế bào là sao chép chính xác DNA và tách các bản sao để tạo nên các tế bào con mới. Quá trình này cho phép tăng sinh tế bào. Chu kỳ tế bào được chia thành bốn giai đoạn riêng biệt, đó là G1 (pha khoảng trống giai đoạn 1), S (tổng hợp DNA), G2 (pha khoảng trống giai đoạn 2) và M (nguyên phân/giảm phân), được kiểm soát bởi các protein liên quan đến chu kỳ tế bào [75].

Cdk4 và Cdk6 rất cần thiết trong quá trình tăng sinh tế bào ở động vật có vú, nơi chúng góp phần thúc đẩy tế bào đi vào pha S của chu kỳ phân chia tế bào [76]. Cyclin A1 và A2 đóng vai trò quan trọng trong các pha S và G2/M trong tất cả các tế bào tăng sinh [77] [78]. Điều này cho thấy sự giảm biểu hiện của Cdk4 và Cdk6 dẫn

đến sự kéo dài pha G0/G1 ở pGC trong nhóm SMG. Sự giảm biểu hiện của Cyclin A1 và A2 dẫn đến tỉ lệ pGC của nhóm SMG ở pha S và pha G2/M giảm theo. Những thay đổi này cho thấy điều kiện SMG không chỉ tăng tỉ lệ các tế bào pGC đi vào pha G0/G1 mà còn làm giảm tỉ lệ tế bào này đi vào pha S và G2/M. Đây là nguyên nhân của sự bất giữ chu kỳ tế bào và làm chậm quá trình tăng sinh tế bào pGC trong điều kiện SMG.

Sức sống của tế bào có thể được thay đổi theo nhiều cách khác nhau trong điều kiện SMG. Sự gia tăng tỉ lệ sống của các tế bào tiền thân cơ tim đã được quan sát thấy trong điều kiện SMG [79]. Trong khi đó, nghiên cứu của Deng và cộng sự lại cho thấy rằng điều kiện SMG có thể gây ra quá trình apoptosis và ức chế khả năng tồn tại của tế bào U251 [80]. Tuy nhiên, các nghiên cứu khác đã chứng minh rằng điều kiện SMG không ảnh hưởng đến khả năng tồn tại của dòng tế bào SAOS-2 [81] tế bào gốc mô mỡ [82], hoặc tế bào gốc trung mô tủy xương ở người [83]. Nghiên cứu này cho thấy điều kiện SMG ức chế sự tăng sinh tế bào pGC, nhưng làm tăng nhẹ tỉ lệ sống của pGC. Kết quả này cho thấy có khác biệt giữa các loại tế bào trong điều kiện môi trường SMG và điều kiện đối chứng.

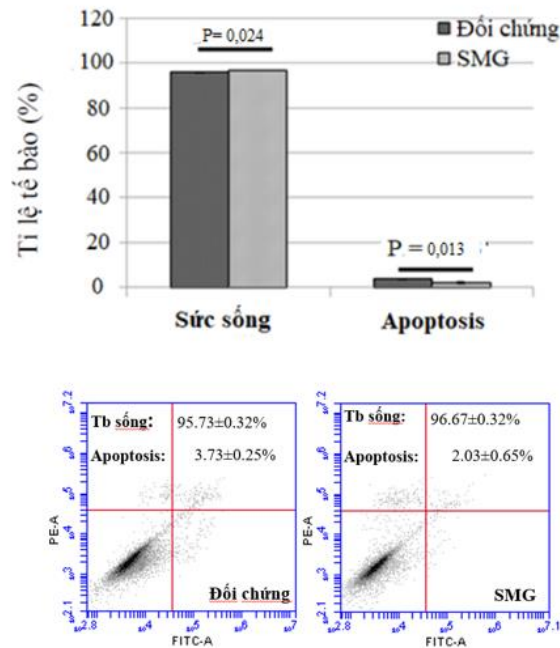
3.3. Kết quả đánh giá quá trình apoptosis

3.3.1. Kết quả đánh giá tỉ lệ apoptosis

Khả năng sống đóng vai trò quan trọng trong sự tăng sinh quần thể tế bào. Tỉ lệ sống của tế bào được đánh giá bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy. Phospholipids của màng tế bào được phân phối không đối xứng giữa các mặt bên trong và bên ngoài của màng. Phosphatidylcholine và sphingomyelin được phơi bày trên mặt bên ngoài của lớp lipid kép, trong khi phosphatidylserine nằm ở bề mặt bên trong. Trong quá trình apoptosis, sự bất đối xứng này bị phá vỡ và phosphatidylserine bị lộ ra ở bề mặt bên ngoài của màng plasma. Do Annexin V liên kết với ái lực cao với phosphatidylserine, nên Annexin V liên kết với fluorochrom có thể được sử dụng để phát hiện tế bào apoptotic bằng phương pháp tế bào dòng chảy.

Sức sống và sự chết theo chương trình của tế bào pGC được đánh giá bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy. Phân tích tế bào dòng chảy 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 tế bào chết theo chương trình 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 tế bào pGC.



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

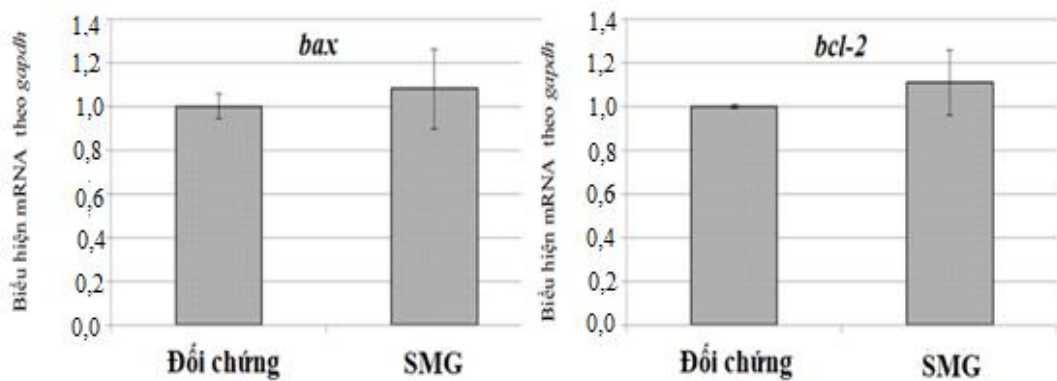
3.3.2. Kết quả đánh giá biểu hiện phiên mã của các gene apoptosis

Họ protein Bcl-2 điều hòa chặt chẽ sự kích hoạt con đường nội bào. Các protein thuộc họ này như Bid, Bad, Bim, Bmf, Puma và Noxa có chứa một vùng Bcl-2 tương đồng 3 (BH3) và có hoạt động theo hướng kích thích quá trình apoptosis. Cũng có hai nhóm nhỏ khác của họ Bcl-2 chứa nhiều vùng BH, nhóm thứ nhất với Bax, Bak và Bok, có khả năng kích thích quá trình apoptosis, nhóm còn lại có Bcl-2, Bcl-XL và Mcl-1 lại hoạt động chống lại sự chết theo chương trình của tế bào các protein BH3 sẽ điều khiển quá trình apoptosis bằng cách điều hòa tương tác giữa hai nhóm protein này.

Theo Simon Willis và cộng sự, protein Bax sẽ hình thành heterodimer với Bcl-2, và heterodimer này có chức năng như là một yếu tố thúc đẩy quá trình apoptosis [65], [84]. Sự biểu hiện của nó được điều hòa bởi gen ức chế khối u p53, khi lượng p53 trong tế bào tăng lên, Bax cũng sẽ theo đó được kích hoạt. Đồng thời, protein

Bcl-2 được coi là một protein chống apoptosis quan trọng, nó được xếp vào nhóm oncogen [85].

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.



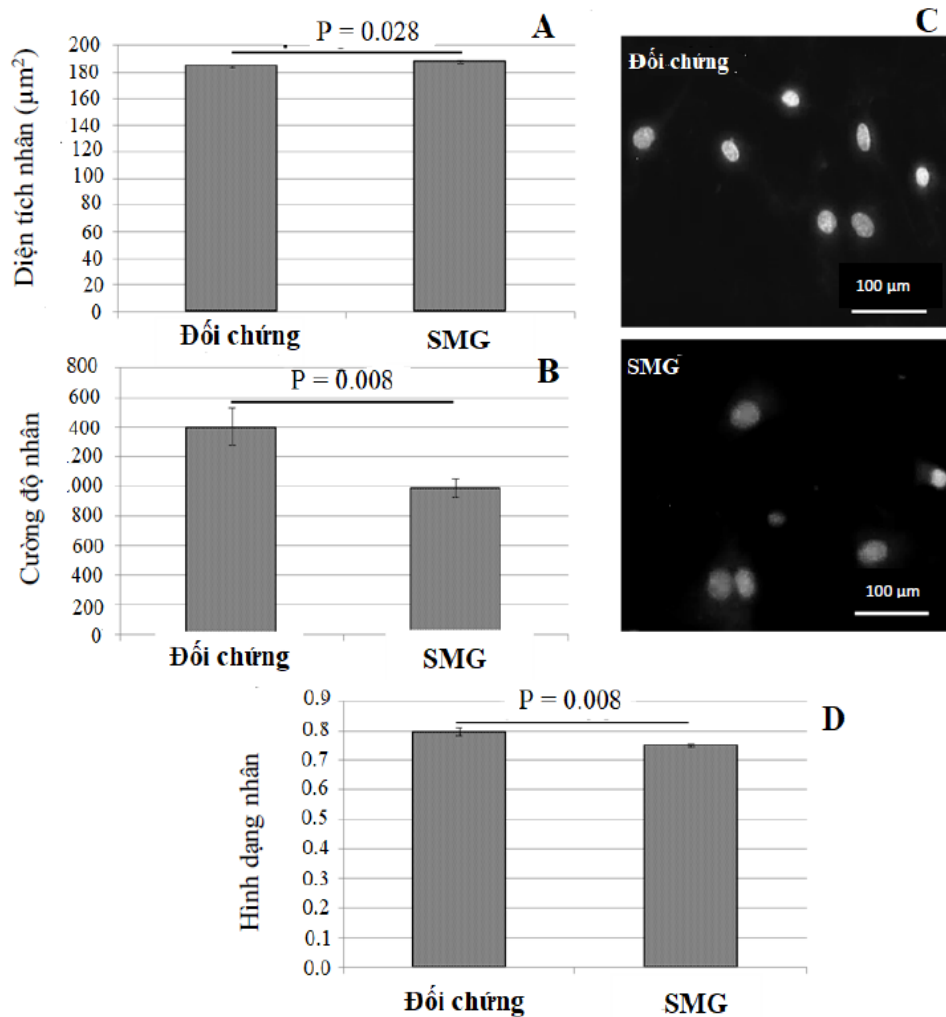
Hình 3.12. Kết quả phân tích real-time qRT-PCR gene *bax* và *bcl-2* của pGC

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

3.4.1. Kết quả đánh giá sự thay đổi hình thái nhân (cường độ, diện tích, hình dạng)

Phần mềm Cell Cycle App của hệ thống Cytell được sử dụng để đánh giá các chỉ tiêu về nhân của tế bào 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 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). Điều này cho thấy điều kiện SMG làm tăng diện tích nhân tế bào pGC sau 3 ngày nuôi cấy. Kết quả quan sát dưới kính hiển vi ở cường độ nhân trung bình của tế bào pGC ở hai nhóm thí nghiệm cũng được tính toán và thể hiện trong hình 3.6C. Cường độ nhân trung bình của tế bào 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 tế bào pGC sau 3 ngày nuôi cấy. Hình 3.13B cũng bổ sung cho các luận điểm này. Qua đó cho thấy nhân của các tế bào pGC trong nhóm

đối chứng biểu hiện kích thước nhỏ hơn so với nhóm SMG. Đồng thời qua quan sát trong hình 3.13C, cường độ phát huỳnh quang ở nhân của tế bào pGC trong nhóm SMG cũng thấp hơn so với nhóm đối chứng.

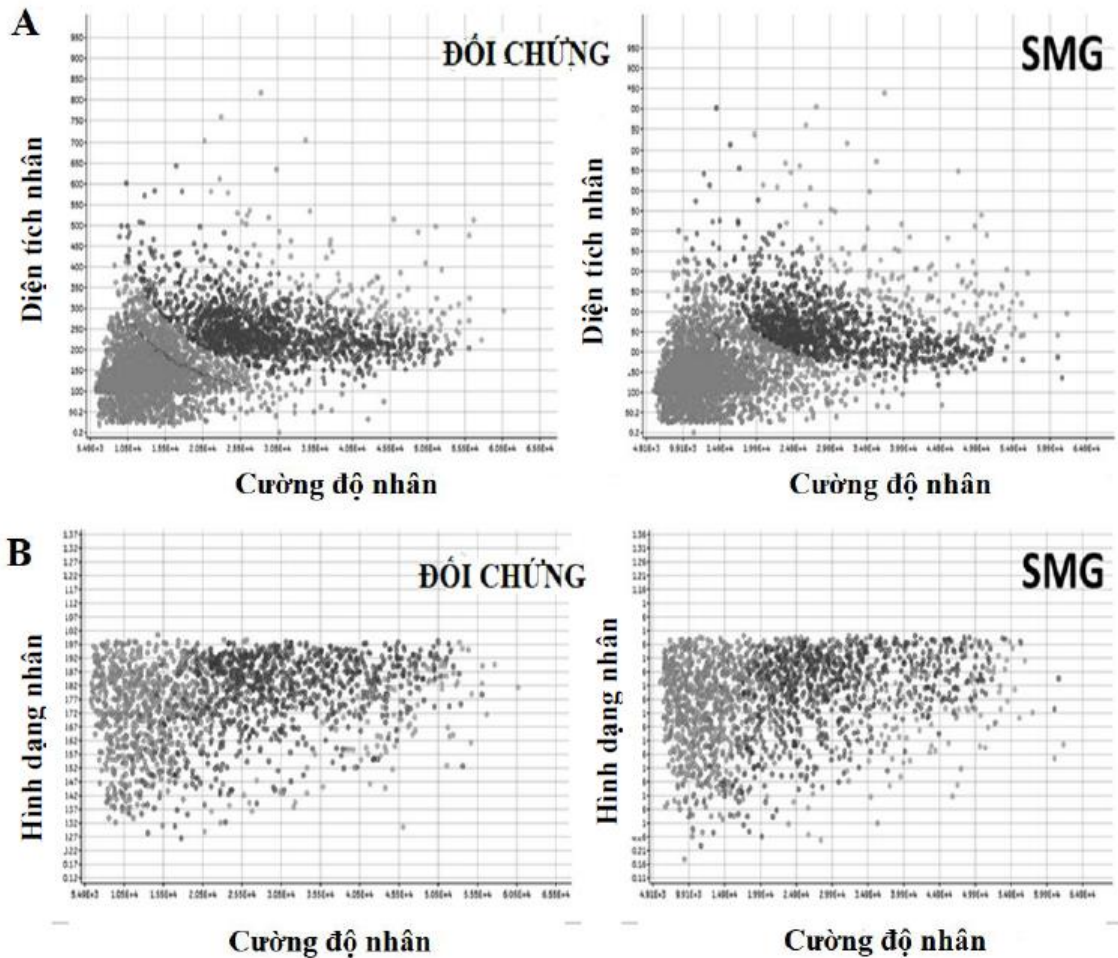


Hình 3.13. Đánh giá hình thái nhân tế bào pGC bằng phần mềm ứng dụng Cell Cycle

A. Diện tích nhân tế bào. B. Cường độ nhân tế bào. C. Hình ảnh nhân được nhuộm bằng Hoechst 33342. D. Giá trị hình thái nhân.

Trong phần nghiên cứu này, để đánh giá giá trị hình dạng nhân của tế bào pGC bằng phần mềm ứng dụng Cell cycle. Giá trị này càng tiệm cận đến 1 thì nhân tế bào càng đối xứng. Kết quả từ hình 3.13D cho thấy giá trị hình dạng nhân của tế bào 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 tế bào

pGC sau 3 ngày thử nghiệm. Nói một cách khác, trong điều kiện SMG, nhân của tế bào 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.

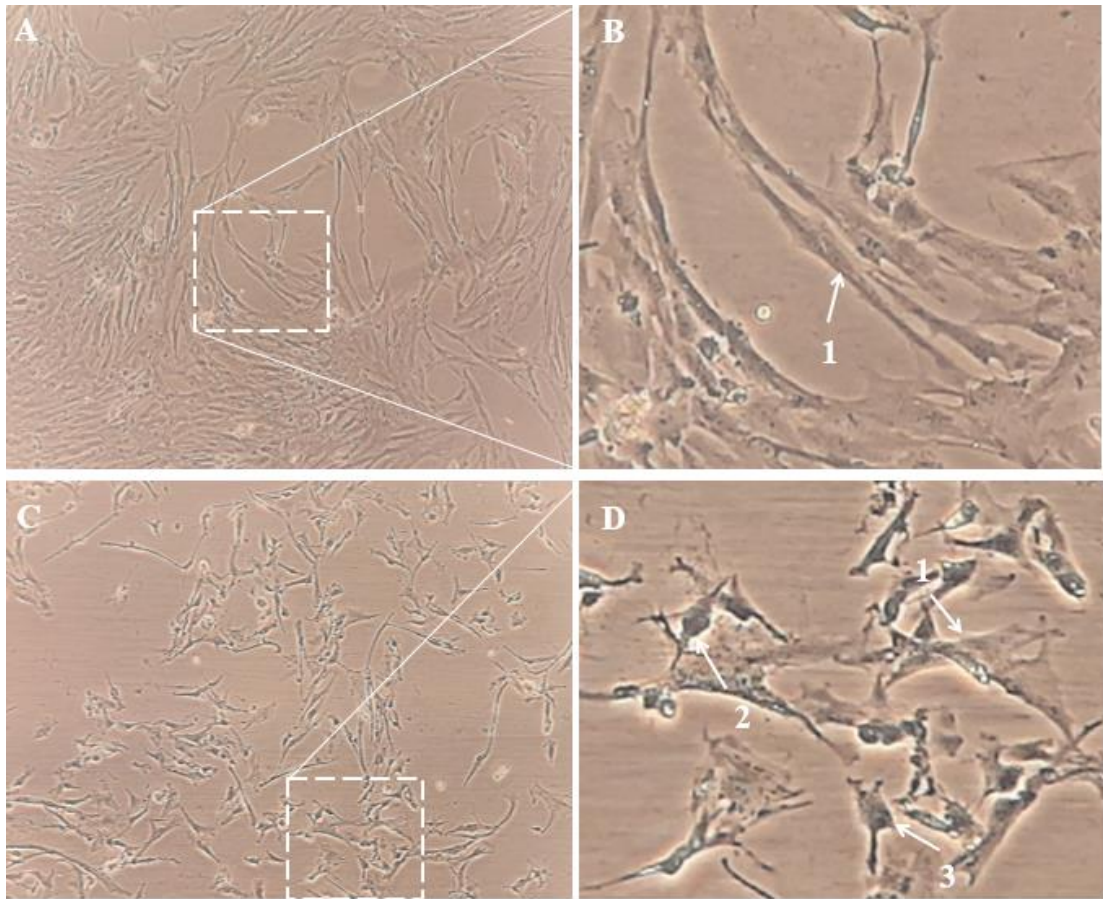
A. Sự phân bố diện tích nhân trong mỗi quan hệ với cường độ nhân.

B. Sự phân bố hình dạng nhân trong mỗi 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 pGC cho thấy ở nhóm đối chứng cường độ nhân cao hơn và sự trải rộng của các pGC hơn các tế bào nhóm vi trọng lực mô phỏng SMG (hình 3.15). pGC từ nhóm đối chứng cho thấy hình dạng đồng nhất giống nguyên bào sợi (hình 3.15A, 3.15B). Tuy nhiên pGC từ nhóm SMG cho thấy có nhiều sự khác biệt về hình thái dạng giống nguyên bào sợi cũng được phát hiện ở pGC 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 pGC. Hình 3.15A minh chứng cho sự phân bố song song của các bó

vi sợi ở pGC từ nhóm đối chứng. Sự phân bố của các nhóm vi sợi làm ảnh hưởng đến sự thay đổi hình thái của pGC dưới điều kiện SMG. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Dinarelli và cộng sự năm 2018 đã phát hiện ra rằng điều kiện vi trọng lực mô phỏng gây ra sự thay đổi hình dạng tế bào ở hồng cầu người [96].



Hình 3.15. Hình thái của các pGC.

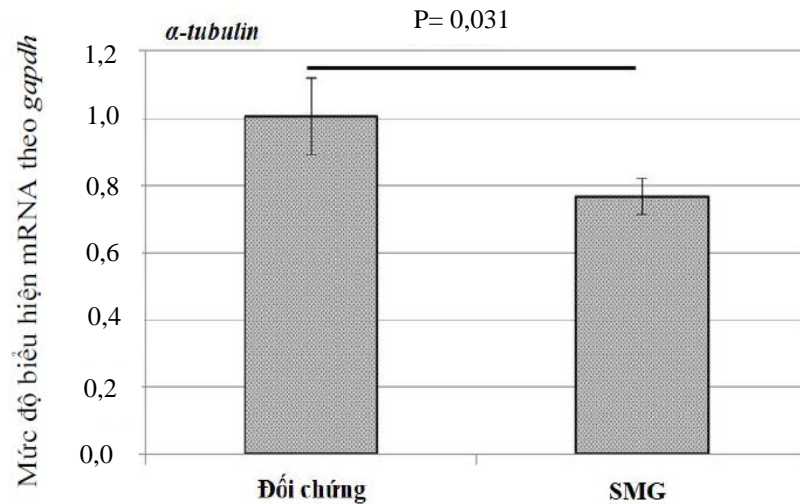
(A), (B) pGC của nhóm đối chứng cho thấy có dạng giống tế bào nguyên bào sợi; (C), (D) pGC từ nhóm SMG cho thấy có sự đa dạng về hình thái học, bao gồm (1) giống nguyên bào sợi, (2) hình thoi, (3) dạng thon tròn. Độ phóng đại x100 (A, C).

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 điều kiện vi trọng lực lên cấu trúc vi ống

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

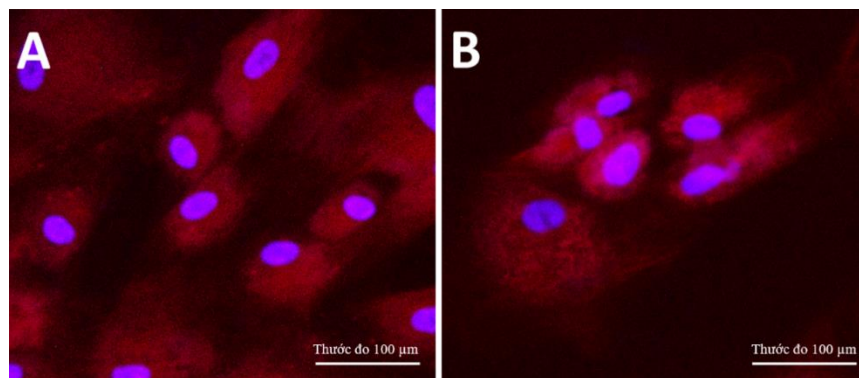
Trong nghiên cứu này, những thay đổi trong sự biểu hiện mRNA của tubulin được mô tả bằng phương pháp real-time qRT-PCR (hình 3.16). Kết quả cho thấy, trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng, tế bào pGC giảm biểu hiện tubulin sau 3 ngày nuôi cấy. Mức độ giảm biểu hiện của gene tubulin của nhóm cảm ứng điều kiện vi trọng lực mô phỏng là 23% so với nhóm đối chứng. Điều này củng cố điều kiện vi trọng lực mô phỏng cảm ứng sự giảm biểu hiện gene tubulin ở mức phiên mã.



Hình 3.16. Sự biểu hiện gen α -tubulin của pGC

3.5.1.2. Đánh giá sự thay đổi cấu trúc vi ống

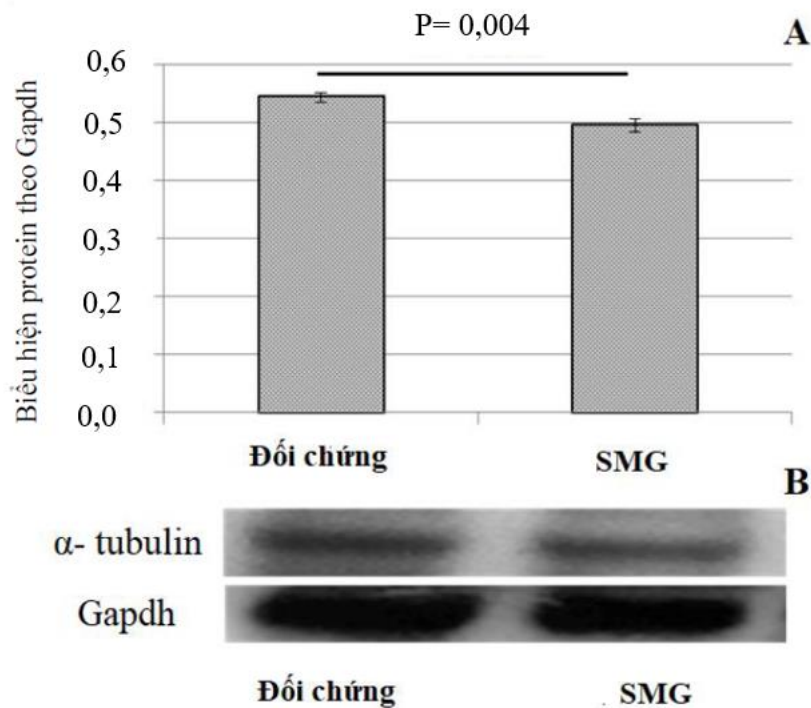
Trong nghiên cứu này, để đánh giá sự phân bố của vi ống trong tế bào pGC được nuôi ở môi trường vi trọng lực so với điều kiện bình thường bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang protein vi ống Tubulin. Như đã thấy trong hình 3.17, các sợi vi ống phân bố với mật độ dày hơn trong nhóm đối chứng so với ở nhóm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

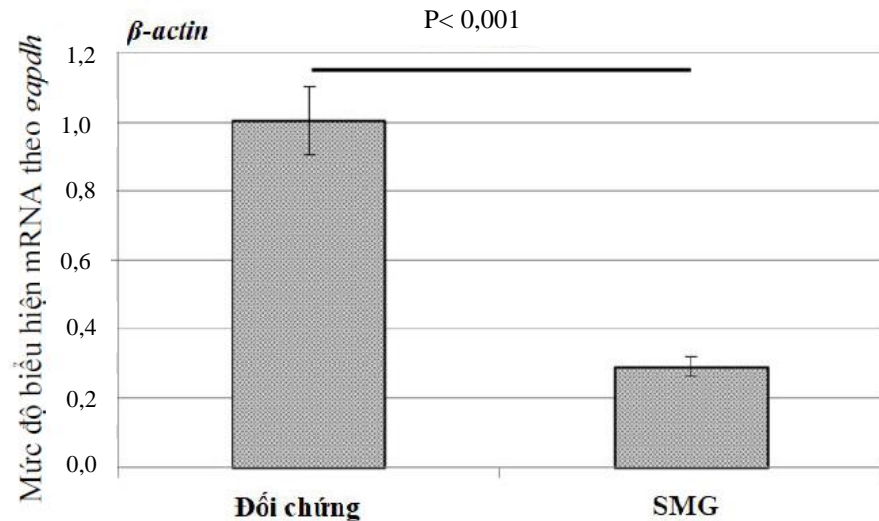
B. Phân tích western blot protein α -Tubulin.

Kết quả phân tích western blot củng cố cho kết quả phân tích real time RT-PCR và nhuộm huỳnh quang cấu trúc vi ống. Sự biểu hiện của tubulin giảm ở cả mức phiên mã và dịch mã trong tế bào pGC khi 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 tubulin, mà còn ảnh hưởng tới thành phần, hàm lượng tubulin có trong tế bào, từ đó cho thay đổi cấu trúc vi ống cũng như sự phân bố của các vi ống trong tế bào pGC.

3.5.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực lên cấu trúc vi sợi

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

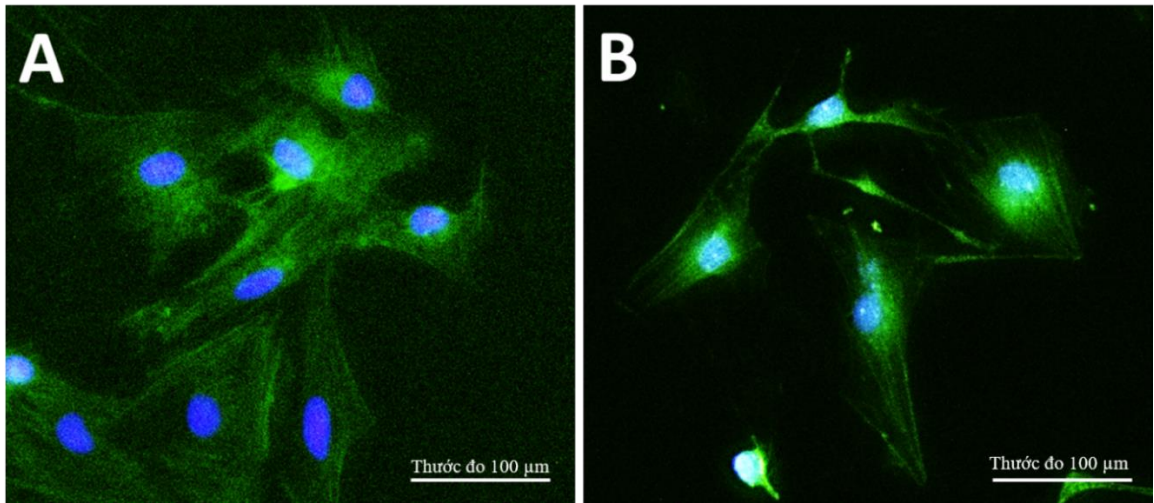
Sự thay đổi biểu hiện của actin mức phiên mã của tế bào pGC được mô tả trong hình 3.19. Kết quả phân tích real-time qRT-PCR cho thấy tế bào pGC giảm biểu hiện mRNA của actin trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Mức độ giảm actin diễn ra mạnh, tế bào pGC giảm biểu hiện actin hơn 70% so với nhóm đối chứng. Điều này cho thấy sự thay đổi cấu trúc rõ rệt của tế bào 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 tế bào gốc trung mô trong môi trường vi trọng lực có xu hướng mở rộng ra thay vì kéo dài.



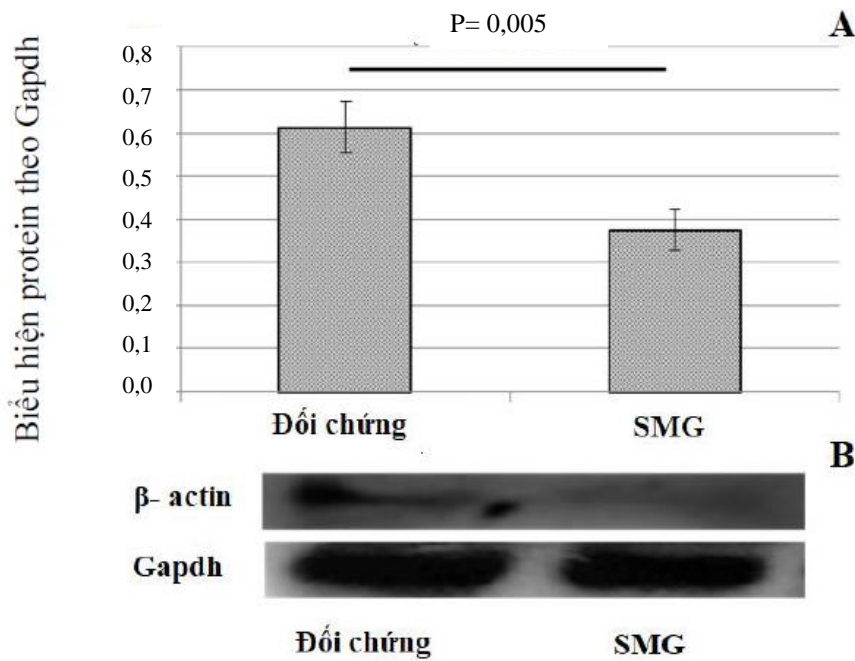
Hình 3.20. Kết quả nhuộm hệ thống vi sợi của pGC bằng phalloidin

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 này, 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 tế bào 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 tế bào pGC khi 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.

Khung xương tế bào là thành phần rất nhạy cảm với sự thay đổi của trọng lực [86] Khung xương tế bào bao gồm hệ thống vi ống, vi sợi và sợi trung gian, trong đó vi ống và vi sợi đóng vai trò quan trọng trong sự phân chia tế bào [87]. Actin là protein chủ yếu cấu thành vi sợi và nó có 2 dạng: polymer hóa (F-actin) và không polymer hóa (G-actin) [39]. Trong quá trình phân chia tế bào, actin đóng vai trò trong việc tạo nên rãnh phân tách tế bào mẹ thành 2 tế bào con. Trong khi đó, tubulin lại là thành phần chính cấu tạo nên vi ống và thoi vô sắc. Sự di chuyển của nhiễm sắc thể về 2 cực của tế bào là do sự rút ngắn của các vi ống nhờ sự giải trùng hợp của vi ống [88] [89].

Như vậy, những thay đổi trong sự tổng hợp của vi sợi và vi ống sẽ dẫn tới những thay đổi trong sự hình thành vi sợi và vi ống, quan trọng hơn là ảnh hưởng đến quá trình phân bào. Trong thí nghiệm này, sự suy giảm biểu hiện của protein actin và tubulin đã được ghi nhận ở nhóm tế bào hạt buồng trứng heo nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng so với nhóm tế bào đối chứng.

Vì vậy, sự hình thành vi sợi và vi ống của tế bào pGC sẽ bị suy giảm, gây ảnh hưởng tới quá trình hình thành rãnh phân bào và thoi vô sắc và góp phần làm ức chế sự tăng sinh của tế bào pGC trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng.

Những nghiên cứu trước đây cũng đã chứng minh sử dụng hệ thống vi trọng lực mô phỏng nuôi cấy quay làm giảm sự tăng sinh của tế bào hạt ở chuột [72]. Ở nghiên cứu hiện tại, hệ thống 3D clinostat được sử dụng để tạo điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Các kết quả nghiên cứu cũng cho thấy điều kiện vi trọng lực mô phỏng ức chế sự tăng sinh của pGC. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của các nghiên cứu đã được đề cập ở trên. Hơn nữa, phân tích chu kỳ tế bào và các protein chính liên quan đến chu kỳ tế bào cho thấy có sự liên quan mật thiết đến việc giảm tăng sinh của các tế bào pGC. Cdk4 và Cdk6 rất cần thiết cho sự tăng sinh của tế bào động vật có vú, góp phần vào sự thúc đẩy tiến trình trong sự phân chia tế bào của pha S [76]. Trong chu kỳ tế bào cdk4 và cdk6 kết hợp cyclin D để tạo ra phức hợp thúc đẩy quá trình chuyển từ G1 sang pha S. Khảo sát này cũng cho thấy rằng sự biểu hiện của Cdk4, Cdk6 và Cyclin D1 làm giảm việc chuyển tiếp giai đoạn G1/S và SMG là nguyên nhân sự bất giữ và chậm phân chia trong quá trình phân bào của chu kỳ tế bào.

Dưới tác động của điều kiện vi trọng lực cũng cho thấy sự ảnh hưởng khác nhau đến khả năng sống cũng như quá trình chết theo chu trình của nhiều loại tế bào. Sự gia tăng khả năng sống của tế bào gốc cơ tim được khảo sát dưới điều kiện vi trọng lực [79]. Deng và các cộng sự cũng phát hiện rằng điều kiện vi trọng lực làm giảm quá trình chết theo chu trình của tế bào và ức chế sự phát triển của dòng tế bào U251 [80]. Tuy nhiên các nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng điều kiện SMG không làm ảnh hưởng đến sự phát triển tế bào gốc mô mỡ [82], tế bào gốc trung mô [83]. Trong nghiên cứu này, pGCs ở điều kiện SMG không chỉ không làm thay đổi quá trình chết theo chu trình của tế bào mà còn có biểu hiện tăng nhẹ khả năng sống và phát triển của tế bào sau 72 giờ nuôi cấy. Điều này cho thấy giảm khả năng tăng sinh của pGC không phải do sự chết theo chu kỳ của tế bào mà chủ yếu là có các protein liên quan đến chu kỳ tế bào.

Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu đã phát hiện ra rằng ở điều kiện SMG gây ra những thay đổi về hình thái của tế bào pGC. Sự tăng mật độ nhân là kết quả của sự tập trung chất nhiễm sắc, chất cần thiết cho sự phân chia tế bào trong quá trình nguyên phân [90]. Nghiên cứu hiện tại cho thấy sự giảm cường độ nhân ở pGC, điều này cho thấy rằng sự phân chia tế bào đã giảm trong điều kiện SMG. Các nghiên cứu trước đây cho thấy diện tích nhân tế bào ở điều kiện SMG to hơn so với tế bào ở điều kiện bình thường [91]. Trong nghiên cứu này, sự tăng diện tích nhân được phát hiện của tế bào pGC trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Sự thay đổi diện tích nhân gây ra sự thay đổi hình dạng nhân. Hình dạng nhân cũng cho thấy sự liên quan chặt chẽ với bộ khung xương của tế bào trong việc điều chỉnh hình dạng và vị trí nhân trong tế bào [91]. Các vi sợi là thành phần quan trọng của bộ xương tế bào. Sự tổng hợp sợi actin ảnh hưởng đến vị trí nhân tế bào.

Do đó, sự thay đổi của cấu trúc vi sợi làm ảnh hưởng đến sự thay đổi hình thái nhân tế bào. Các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng các tế bào MCF7 nuôi cấy phát triển bình thường dạng lớp đơn 2 chiều trong điều kiện 1G, trong khi đó điều kiện vi trọng lực mô phỏng xuất hiện các cụm tế bào và cũng như các tế bào dính vào nhau [92]. Tế bào biểu mô vống mạc ở người trưởng thành phát triển dạng lớp đơn khi nuôi cấy trong điều kiện 1G. Ngược lại, các tế bào này có hình dạng thu gọn trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng sau khi nuôi cấy từ 5 đến 10 ngày [93]. Hơn nữa, điều kiện vi trọng lực làm thay đổi hình dạng tế bào một cách nhanh chóng và tái cấu trúc bộ xương tế bào. Các nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng hình thái tế bào có thể bị thay đổi dưới điều kiện SMG.

Trong nghiên cứu hiện tại điều kiện SMG gây ra sự thay đổi hình thái của pGC, được mô tả bằng các hình dạng khác nhau như hình dạng giống nguyên bào sợi hình thoi, hình bo tròn hay thon dài [94]. Đáp ứng với những thay đổi này, pGC cho thấy sự tái cấu trúc của hệ thống vi sợi là kết quả của sự thay đổi hình thái nhân.

Khi tiếp xúc với điều kiện vi trọng lực mô phỏng từ 2 đến 4 ngày gây ra sự gián đoạn trong việc phát triển của nang thứ cấp buồng trứng chuột. Các tác giả cũng chỉ ra rằng điều kiện SMG làm giảm sự gia tăng số lượng của các nang thứ cấp và làm vắng mặt yếu tố tăng sinh của tế bào hạt ở các nang thứ cấp [95]. Một nghiên cứu khác cũng bổ sung điều kiện vi trọng lực mô phỏng làm giảm số lượng nang trứng, ức chế sự tăng sinh của tế bào hạt. Ngoài ra, điều kiện vi trọng lực mô phỏng cũng làm ảnh hưởng đến sự tiết hormone và làm giảm khả năng sinh sản. Thêm vào đó, SMG là nguyên nhân làm giảm khả năng sống của nang trứng, giảm khả năng điều hòa của sự tăng sinh tế bào và sự phát triển biệt hóa của nhân tố 9, đây là chỉ dấu của sự phát triển tế bào hạt buồng trứng. Trong điều kiện nuôi cấy in vitro, các tế bào hạt đang phát triển biệt hóa thành các tế bào giống nguyên bào sợi [94]. Nghiên cứu hiện tại cho thấy dưới điều kiện SMG làm giảm sự gia tăng của pGC thông qua sự giảm biểu hiện của các protein liên quan đến chu kỳ tế bào. Hơn nữa, các tế bào có dạng hình thoi, hình bo tròn cũng xuất hiện trong các pGC dưới điều kiện SMG, điều này gợi ý rằng điều kiện SMG làm giảm các tế bào giống nguyên bào sợi và ngăn cản sự biệt hóa của các tế bào đang phát triển.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Vi trọng lực mô phỏng làm giảm sự tăng sinh của tế bào hạt buồng trứng heo sau 3 ngày nuôi cấy thể hiện qua sự suy giảm giá trị OD và mật độ tế bào.

Sự biểu hiện của các protein điều hòa chu kỳ tế bào chính như cyclin A1 và A2, Cdk4, Cdk6 giảm trong tế bào hạt buồng trứng heo ở nhóm cảm ứng vi trọng lực. Đây chính là nguyên nhân dẫn tới sự thúc đẩy tế bào đi vào pha nghỉ.

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 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.

KIẾN NGHỊ

Cần có sự khảo sát đánh giá thêm với các tế bào hạt nang noãn ở người nhằm so sánh và đánh giá sâu hơn chức năng sinh lí của tế bào này, đặc biệt là sự tương đồng và những ảnh hưởng về mặt sinh lí đối với nữ phi hành gia.

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

Thí nghiệm nên có thể có thêm các mốc thời gian khác nhau, bổ sung các dòng tế bào khác làm đối chứng. Các điều kiện áp suất khác nhau cũng nên được đánh giá.

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

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

- 1. Trương Xuân 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, 2021, Simulated microgravity induces the proliferative inhibition and morphological changes in porcine granulosa cells, *Current issues in molecular biology*, 43(3) pp. 2210-2219.
doi: 10.3390/cimb43030155.
- 2. Trương Xuân Dai,** Hoang Nghia Son, Le Thanh Long, 2022, Simulated microgravity altered the cell cycle progression of porcine granulosa cells, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 20(3), pp. 445-451.
doi.org/10.15625/1811-4989/16510

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Rogers M.J.B., Vogt G.L., Wargo M.J., 1997, *Microgravity: A teacher's guide with activities in Science, Mathematics, and Technology*, National Aeronautics and Space Administration, pp 1-167.
- [2] Herranz R., 2013, Ground-based facilities for simulation of microgravity: Organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology, *Astrobiology*, 13, pp. 1–17.
- [3] Bradbury P., Wu H., Choi J.U., Rowan A.E., Zhang H., Poole K., Lauko J., Chou J., 2020, Modeling the Impact of Microgravity at the Cellular Level: Implications for Human Disease, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, pp. 1-8.
- [4] Dayanandan P., 2011, Gravitational biology and space life sciences: Current status and implications for the Indian space programme, *Journal of Biosciences*, 36(5), pp. 911–919.
- [5] Scoubeau M., Iranmanesh M., Gontier C., Caprace D., Space L., 2020, Towards a Scalable and Financially Viable Test Platform for Microgravity Research, *Space Generation*, pp. 1-7.
- [6] Mishra B., Luderer U., 2019, Reproductive hazards of space travel in women and men, *Nature Reviews Endocrinology*, 15(12), pp. 713–730.
- [7] Grimm D., 2016, The impact of microgravity on bone in humans, *Bone*, 87, pp. 44–56.
- [8] Bijlani S., Stephens E., Singh N., Venkateswaran K., Wang C., 2021, Advances in space microbiology, *CellPress*, 24(5), pp. 1–19.
- [9] Albi E., 2011, Thyrotropin receptor and membrane interactions in FRTL-5 thyroid cell strain in microgravity, *Astrobiology*, 11(1), pp. 57–64.
- [10] Wu C., Guo X., Wang F., Li X., Tian X., 2011, Simulated Microgravity Compromises Mouse Oocyte Maturation by Disrupting Meiotic Spindle Organization and Inducing Cytoplasmic Blebbing, *PLoS One*, 6(7), pp. 1-8.
- [11] Daniel R., Fletcher A., Mullins D., 2010, Cell mechanics and the cytoskeleton, *Nature*, 463(1), pp. 485–492.
- [12] Mark S., 2014, The impact of sex and gender on adaptation to space: Executive summary, *Journal of Women's Health*, 23(11), pp. 941–947.

- [13] Burden H., Zary J., Lawrence I., Jonnalagadda P., Davis M., Hodson C., 1997, Effects of space flight on ovarian hypophyseal function in postpartum rats, *Journal of Reproduction and Fertility*, 109, pp. 193-197.
- [14] Wong A., Desantis M., 1997, Rat Gestation during Space Flight: Outcomes for Dams and Their Offspring Born after Return to Earth, *Integrative Physiological and Behavioral Science*, 32, pp. 322-342.
- [15] Schatten G., Simerly C., Schatten H., 1985, Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 82(12), pp. 4152-4156.
- [16] Souza K., Blackt S., Wassersugi R., 1995, Amphibian development in the virtual absence of gravity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(6), pp. 1975-1978.
- [17] Aimar C., Bautz A., Durand D., Membre H., Chardard D., Gualandris-Parisot L., Husson D., Dournon C., 2000, Microgravity and Hypergravity Effects on Fertilization of the Salamander *Pleurodeles waltl* (*Urodele Amphibian*), *Biology of Reproduction*, 63(2), pp. 551-558.
- [18] Ijiri K., 1998, Development of space-fertilized eggs and formation of primordial germ cells in the embryos of medaka fish, *Advances in Space Research*, 21 (8-9), pp. 1155-1158.
- [19] Ronca A.E., Baker E.S, Bavendam T.G, Beck K.D., Miller V.M., Tash J.S., Jenkins M., 2014, Effects of Sex and Gender on Adaptations to Space: Reproductive Health, *Journal of Women's Health*, 23(11), pp. 967-974.
- [20] Steller J.G., Blue R.S, Burns R., Bayuse T.M., Antonsen E.L, Jain V., Blackwell M.M, Jennings R.T., 2020, Gynecologic risk mitigation considerations for long-duration spaceflight, *Aerospace Medicine and Human Performance*, 91(7), pp. 543-564.
- [21] Drago-Ferrante R., 2022, Extraterrestrial Gynecology: Could Spaceflight Increase the Risk of Developing Cancer in Female Astronauts? An updated review, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7465), pp. 1-31.

- [22] Ferranti F., Del Bianco M., Pacelli C., 2021, Advantages and limitations of current microgravity platforms for space biology research, *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(1), pp. 1–18.
- [23] Riwaldt S., Corydon T., Pantalone D., Sahana J., Wise P., Wehland M., Kruger M., Melnik D., Kopp S., Infanger M, Grimm D., 2021, Role of Apoptosis in Wound Healing and Apoptosis Alterations in Microgravity, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(679650), pp. 1-22.
- [24] Clément G., Slenzka K., 2006, *Fundamentals of space biology, research on cells, Animal, and plants in space*, Springer Science, pp 1-394.
- [25] Loon J., 2007, Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research, *Advances in Space Research*, 39(7), pp. 1161–1165.
- [26] Sladkova M., Peppo G., 2014, Bioreactor systems for human bone tissue engineering, *Processes*, 2(2), pp. 494–525.
- [27] Borst A., Loon J., 2009, Technology and developments for the random positioning machine, RPM, *Microgravity Science and Technology*, 21(4), pp. 287–292.
- [28] Wuest S., Richard S., Kopp S., Grimm D., Egli M., 2015, Simulated microgravity: Critical review on the use of random positioning machines for mammalian cell culture, *Biomed Research International*, pp. 1-8.
- [29] Trounson A., Gosden R., Ritter U.E., 2013, *Biology and Pathology of the Oocyte*, Cambridge University Press, 2, pp 1-417.
- [30] Silveira J., Andrade G., Perecin F., Meireles F., Winger Q., Bouma G., 2018, Isolation and analysis of exosomal MicroRNAs from ovarian follicular fluid, *Methods in Molecular Biology*, 1733, pp. 53–63.
- [31] Faustini M., Curone G., Torre M. L., Vigo D., 2018, Bioencapsulation of Oocytes and Granulosa Cells, *Methods in Molecular Biology*, 1817, pp. 89–93.
- [32] Alam M., Miyano T., 2020, Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro, *Reproductive Medicine Biology*, 19(1), pp. 13–23.
- [33] Amsterdam A., Rotmensch S., 1987, Structure-function relationships during granulosa cell differentiation, *Endocrine Reviews*, 8(3), pp. 309–337.
- [34] Soede N., Langendijk P., Kemp B., 2011, Reproductive cycles in pigs, *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), pp. 251–258.

- [35] Abdelnour S, Swelum A., Abd El-Hack M., Khafaga A., Taha A., Abdo M., 2020, Cellular and functional adaptation to thermal stress in ovarian granulosa cells in mammals, *Journal of Thermal Biology*, 92(102688), pp. 1-9.
- [36] Zhang T., Sun X., Li L., Ma J., Zhang R., Li N, Liu X., Dyce P., Shen W., 2019, Ochratoxin A Exposure Impairs Porcine Granulosa Cell Growth via the PI3K/AKT Signaling Pathway, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 67(9), pp. 2679–2690.
- [37] Hashimoto S., Ohsumi K., Tsuji Y., Harauma N., 2007, Growing Porcine Oocyte-Granulosa Cell Complexes Acquired Meiotic Competence During In Vitro Culture, *Journal of Reproduction and Development*, 53(2), pp. 379-384.
- [38] Hughes D., Mehmet H., 2003, *Cell Proliferation and Apoptosis*, BIOS Scientific, pp. 1-403.
- [39] Lodish H., Berk A., Kaiser C., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., 2016, *Molecular Cell Biology*, Macmillian Learning, 8, pp. 1-1278.
- [40] Wang Z., 2021, Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling, *Cells*, 10(12), pp. 1-23.
- [41] Elmore S., 2007, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicologic Pathology*, 35(4), pp. 495–516.
- [42] Hongmei Z., Ntuli T.M., 2012, Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review, *Apoptosis and Medicine*, pp. 1-20.
- [43] Green D., Llambi F., 2015, Cell death signaling, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12), pp. 1-25.
- [44] Jacobson M., Weil M., Raff M., 1997, Programmed Cell Death in Animal Development, *Cell*, 88(3), pp. 347–354.
- [45] Zheng Y., Ma L., Liu N., Tang X., Guo S., Zhang B., Jiang Z., 2019, Autophagy and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells during follicular development, *Animals*, 9(12), pp.1–11.
- [46] Grimm D., Infanger M., Westphal K., Ulbrich C., Pietsch J., Kossmehl P., Vadrucchi S., Baatout S., Flick B., Paul M., Bauer J., 2009, A delayed type of three-dimensional growth of human Endothelial Cells Under Simulated Weightlessness, *Tissue Engineering*, 15(8), pp. 2267-2275.

- [47] Girardi C., Pitta C, Casara S., Calura E., Romualdi C., Celloti L., Mognato M., 2014, Integration analysis of MicroRNA and mRNA expression profiles in human peripheral blood lymphocytes cultured in modeled microgravity, *Biomed Research International*, 2014(296747), pp. 1-16.
- [48] Tan S., Pei W., Huang H., Zhou G., Hu W., 2020, Additive effects of simulated microgravity and ionizing radiation in cell death, induction of ROS and expression of RAC2 in human bronchial epithelial cells, *NPJ Microgravity*, 6(34), pp. 1-6.
- [49] Chi H.N.Q., Son H.N., Chung D.C., Huan L.D., Diem T.H, Long L.T., 2020, Simulated Microgravity Reduces Proliferation and Reorganizes the Cytoskeleton of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells, *Physiological Research*, 69(5), pp. 897–906.
- [50] Corydon T., Koop S., Wehland M., Braun M., Schutte A., Mayer T., Hulsing T., Oltmann H., Schmitz B., Hemmersbach R., Grimm D., 2016, Alterations of the cytoskeleton in human cells in space proved by life-cell imaging, *Scientific Reports*, 6(20043), pp. 1–14.
- [51] Rijken P., De Groot R., Hertog J., Boonstra J., Verkleij A., Laat S., Kruijer W., 1990, Microgravity decreases c-fos induction and serum response element activity, *Journal of Cell Science*, 97(1), pp. 33–38.
- [52] Grimm, D. Pietsch J., Wehland M., Richter P., Strauch S., Lebert M., Magnusson N., Wise P., JBauer., 2014, The impact of microgravity-based proteomics research, *Expert Review Proteomics*, 11(4), pp. 465–476.
- [53] Tabony J., Glade N., Papaseit C., Demongeot J., 2002, Microtubule Self-organisation and its Gravity Dependence, *Advances in Space Biology Medicine*, 28, pp. 9–58.
- [54] Han J., Dai J., 2016, Microgravity may help future organ/tissue manufacture, *Science China Life Sciences*, 59(8), pp. 850–853.
- [55] Nassef M., Kopp S., Wehland M., Melnik D., Sahana J., Kruger M., Corydon T., Oltmann H., Schmitz B., Schutte A., Bauer T., Infanger M., Grimm D., 2019, Real microgravity influences the cytoskeleton and focal adhesions in human breast cancer cells, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), pp. 1–25.
- [56] Gravity Controller, <https://www.asone-int.com/2017/06/22/gravity-controller-gravite/>

- [57] Son H.N., Chi H.N.Q., Chung D.C., Long L.T, 2019, Morphological changes during replicative senescence in bovine ovarian granulosa cells, *Cell Cycle*, 18(13), pp. 1490–1497.
- [58] Livak K., Schmittgen T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method, *Methods*, 25(4), pp. 402–408.
- [59] Yang R., Liu Y., Cheng Y., Wang C., Song J., Lu G., Feng T., Wang S., Sun X., Meng J., Hao L., 2021, Effects and Molecular Mechanism of Single-Nucleotide Polymorphisms of MEG3 on Porcine Skeletal Muscle Development, *Frontiers in Genetic*, 12, pp. 1-12.
- [60] Tang Q. H., Zhang Y. M., Fan L., Tong G., He L., Dai C., 2010, Classic swine fever virus NS2 protein leads to the induction of cell cycle arrest at S-phase and endoplasmic reticulum stress, *Virology Journal*, 7(4), pp. 1-12.
- [61] Fan X., Xi H., Zhang Z., Liang Y., Li Q., He J., 2017, Germ cell apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in porcine testis under normal and heat stress conditions, *Acta Histochemica*, 119(3), pp. 198–204.
- [62] Cytell TM Cell Imaging System. <https://www.imsol.co.uk/cytell-cell-imaging-system/>
- [63] Li C., Liu Z., Wu G., Zang Z., Zhang J.Q., Li X., Tao J., Shen M., Liu H., 2021, FOXO1 mediates hypoxia-induced G0/G1 arrest in ovarian somatic granulosa cells via activating the TP53INP1-p53-CDKN1A pathway, *Development (Cambridge)*, 148(14), pp.1-14.
- [64] Nygard A.B., Jørgensen C.B., Cirera S., Fredholm M., 2007, Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR, *Biomed Central Molecular Biology*, 8(67), pp. 1-6.
- [65] Kawahara Y., Manabe T., Matsumoto M., Kajiume T., Matsumoto M., Yuge L., 2009, LIF-free embryonic stem cell culture in simulated microgravity, *PLoS One*, 4(7), pp. 2–5.
- [66] Tigan A. S., Bellutti F., Kollmann K., Tebb G., Sexl V., 2016, CDK6—a review of the past and a glimpse into the future: From cell-cycle control to transcriptional regulation, *Oncogene*, 35(24), pp. 3083–3091.

- [67] Bertoli C., Skotheim J.M., De Bruin R.A.M., 2013, Control of cell cycle transcription during G1 and S phases, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), pp. 518–528.
- [68] Kollmann K., Briand C., Bellutti F., Chicher N., Blunder S., Zojer M., Hoeller C., 2019, The interplay of CDK4 and CDK6 in melanoma, *Oncotarget*, 10(14), pp 1346–1359.
- [69] Garrido-Castro A.C., Goel S., 2017, CDK4/6 Inhibition in Breast Cancer: Mechanisms of Response and Treatment Failure, *Current Breast Cancer Reproduction*, 9(1), pp. 26–33.
- [70] Sherr C.J., Roberts J.M., 2004, Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases, *Genes and Development*, 18(22), pp. 2699–2711.
- [71] Tou J., Ronca A., Grindeland R., Wade C., 2002, Models to study gravitational biology of mammalian reproduction, *Biology of Reproduction*, 67(6), pp.1681–1687.
- [72] Wang C., Wu J., Cui Y., Song S., Zhang J., Zhou J., Zhang J., 2016, Simulated weightlessness by tail-suspension affects follicle development and reproductive capacity in rats, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 9(12), pp. 12208–12218.
- [73] Zhang S., Zheng D., Wu Y., Lin W., Chen Z., Meng L. Liu, J, Zhou Y, 2016, Simulated microgravity using a rotary culture system compromises the in vitro development of mouse preantral follicles, *PLoS One*, 11(3), pp. 1–11.
- [74] Matson J. P., Cook J.G., 2017, Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses, *FEBS Journal*, 284(3), pp. 362–375.
- [75] Tan E.P., Duncan F.E., Slawson C., 2017, The sweet side of the cell cycle, *Biochemical Society Transactions*, 45(2), pp. 313–322.
- [76] Sherr C.J., Beach D., Shapiro G.I., 2016, Targeting CDK4 and CDK6: From discovery to therapy, *Cancer Discovery*, 6(4), pp. 353–367.
- [77] Kalaszczynska I., Geng Y., Lino T., Mizuno S., Choi Y., Kondratiuk I., Silver D.P., Wolgemuth D.J., Akashi K., Sicinski P., 2009, Cyclin A Is Redundant in Fibroblasts but Essential in Hematopoietic and Embryonic Stem Cells, *Cell*, 138(2), pp. 352–365.

- [78] Loukil A., Cheng C.T., Bendris N., Lemmers B., Peter M., Blanchard J.M., 2015, Cyclin A2: At the crossroads of cell cycle and cell invasion, *World Journal of Biological Chemistry*, 6(4), pp. 346-350.
- [79] Jha R., Wu Q., Singh M., Preininger M.K., Han P., Ding G., Cho H.C, Jo H., Maher K., Wagner M.B., Xu C., 2016, Simulated Microgravity and 3D Culture Enhance Induction, Viability, Proliferation and Differentiation of Cardiac Progenitors from Human Pluripotent Stem Cells, *Scientific Reports*, 6(30956), pp.1–14.
- [80] Deng B., Liu R., Tian X., Han Z., Chen J., 2019, Simulated microgravity inhibits the viability and migration of glioma via FAK/RhoA/Rock and FAK/Nek2 signaling, *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Animal*, 55(4), pp. 260–271.
- [81] Catauro M., Bollino F., Papale F., 2016, Response of SAOS-2 cells to simulated microgravity and effect of biocompatible sol-gel hybrid coatings, *Acta Astronautica*, 122, pp. 237–242.
- [82] Ebnerasuly F., Hajebrahimi Z., Tabaie S.M., Darbouy M., 2018, Simulated microgravity condition alters the gene expression of some ECM and adhesion molecules in adipose derived stem cells, *International Journal of Molecular Cellular Medicine*, 7(3), pp.146–157.
- [83] Avitabile E., Fusco L., Minardi S., Orecchioni M., Zavan B., Yilmazer A., Rauner M., Pippia P., Tasciotti E., Delogu L.G., 2020, Bioinspired Scaffold Action Under the Extreme Physiological Conditions of Simulated Space Flights: Osteogenesis Enhancing Under Microgravity, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8 (722), pp. 1-12.
- [84] Lee S.K., Park K.K., Kim H.J., Kim K.R., Kang E.J., Kim Y.L., Yoon H., Kim Y.S., Chung W.Y., 2015, Platycodin D Blocks Breast Cancer-Induced Bone Destruction by Inhibiting Osteoclastogenesis and the Growth of Breast Cancer Cells, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(5), pp. 1809–1820.
- [85] Tsujimoto Y., 1998, Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: Apoptosomes or mitochondria, *Genes to Cells*, 3(11), pp. 697–707.
- [86] Crawford-Young S.J., 2006, Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis, *International Journal Development Biology*, 50(2–3), pp. 183–191.

- [87] Nakaseko Y., Yanagida M., 2001, Cell biology: Cytoskeleton in the cell cycle, *Nature*, 412(6844), pp. 291–292.
- [88] Kline-Smith S.L., Walczak C.E., 2004, Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: Refocusing on microtubule dynamics, *Molecular Cell*, 15(3), pp. 317–327.
- [89] Maiato H., Sampaio P., Sunkel C.E., 2004, Microtubule-associated proteins and their essential roles during mitosis, *International Review of Cytology*, 241, pp. 53–153.
- [90] Habela C. W., Sontheimer H., 2007, Cytoplasmic Volume Condensation is an Integral Part of Mitosis, *Cell Cycle*, 6(13), pp. 1613-1620.
- [91] Neelam S., Richardson B., Barker R., Udave C., Gilroy S., Cameron M.J, Levine H.G., Zhang Y., 2020, Changes in nuclear shape and gene expression in response to simulated microgravity are linc complex-dependent, *International Journal of Molecular Science*, 21(18), pp. 1–17.
- [92] Po A., Giuliani A., Masiello M. G, Cucina A., Catizone A., Ricci G., Chiacchiarini M., Tafani M., Ferretti E., Bizzarri M., 2019, Phenotypic transitions enacted by simulated microgravity do not alter coherence in gene transcription profile, *NPJ Microgravity*, 5(27), pp. 1-13.
- [93] Corydon T.J., Mann V., Slumstrup L., Kopp S., Sahara J., Askou A.L., Magnusson N.E., Echegoyen D., Bek T., Sundaresan A., Riwaldt S., Bauer J., Infanger M., Grimm D., 2016, Reduced Expression of Cytoskeletal and Extracellular Matrix Genes in Human Adult Retinal Pigment Epithelium Cells Exposed to Simulated Microgravity, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(1–2), pp. 1–17.
- [94] Alam M. H., Miyano T., 2020, Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro, *Reproductive Medicine and Biology*, 19(1). pp. 13–23.
- [95] Morey-Holton E.R., Globus R.K., 2002, Hindlimb unloading rodent model: Technical aspects, *Journal of Applied Physiology*, 92 (4), pp. 1367–1377.
- [96] Dinarelli S., Longo G., Dietler G., Francioso A., Mosca L., Panitteri G., Boumis G., Belleli A., Girasole M., 2018, Erythrocyte's aging in microgravity highlights how environmental stimuli shape metabolism and morphology, *Nature*, 8(5277), pp.1-12.
- [97] Cheng K., Feng X., Yang C., Ma C., Niu S., Jia L., Yang X., Liang J., Bo Y., Geng K., Li Q., Zhang H., Lei X., Zhang Y., 2023, Simulated microgravity reduces quality

of ovarian follicles and oocytes by disrupting communications of follicle cell, *Nature partner journal microgravity*, 9(7), pp. 1-10.

- [98] Ivics Z., Garrels W., Mátés L., Yau T., Bahir S, Zidek V., Landa V., Geurts A., Pravenec M., Rulicke T., Kues W., Izsvák Z., 2014, Germline transgenesis in pig by cytoplasmic microinjection of Sleeping Beauty transposons, *Nature protocols*, 9(4), pp. 810-827.
- [99] Chi H.N.Q., Son H.N., Chung D.C., Huan L.D., Diem T.H., Long L.T., 2020, Simulated microgravity reduces proliferation and reorganizes the cytoskeleton of human umbilical cord mesenchymal stem cells, *Physiological Research*, 69(5), pp. 897-906.

PHỤ LỤC

1. Thử nghiệm WST-1

Kết quả đo giá trị O.D. bằng máy Glomax

STT	Control	SMG
1	5.35E-01	4.46E-01
2	5.27E-01	4.62E-01
3	4.96E-01	4.65E-01
4	4.95E-01	4.60E-01
5	4.70E-01	5.05E-01
6	4.73E-01	4.60E-01
7	5.04E-01	3.68E-01
8	4.54E-01	5.00E-01
9	4.34E-01	4.96E-01
10	5.49E-01	4.53E-01
11	4.59E-01	4.42E-01
12	4.56E-01	4.37E-01
13	5.04E-01	4.21E-01
14	5.12E-01	4.47E-01
15	5.05E-01	4.83E-01
16	5.03E-01	4.84E-01
17	4.68E-01	4.20E-01
18	4.44E-01	4.51E-01
19	4.90E-01	4.41E-01
20	4.81E-01	4.03E-01
21	4.57E-01	4.52E-01
22	5.12E-01	4.46E-01
23	4.50E-01	4.52E-01
24	4.71E-01	4.28E-01

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.947)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.475)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 24	0	0.485	0.0303	0.00619	
Col 2 24	0	0.451	0.0309	0.00631	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.0142	0.0142	15.203	<0.001
Residual	46	0.0431	0.000937		
Total	47	0.0574			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.972

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050	
Col 1 vs. Col 2	0.0345		2	5.514	--	Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

2. Thử nghiệm đo mật độ tế bào

Kết quả xác định số lượng tế bào/giếng bằng chương trình Cell cycle

App.

STT	Control	SMG
1	3735	1956
2	4622	2036
3	2901	2372
4	3081	2430
5	4588	1933
6	3866	1089
7	2999	3504
8	3334	4467
9	3943	4102
10	3404	3359
11	4261	3424
12	5393	4521
13	4490	3948
14	5310	4195

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.196)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.212)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 14	0	3994.786	815.314	217.902	
Col 2 14	0	3095.429	1108.387	296.229	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups1	5661902.893	5661902.893	5.981	0.022	
Residual	26	24612351.786	946628.915		
Total	27	30274254.679			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.022).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.571

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	899.357	2	3.459	--	Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

3. Thử nghiệm đo diện tích nhân

STT	Control	SMG
1	180	185
2	183	199
3	185	196
4	186	193
5	179	185
6	182	182
7	200	183
8	198	191
9	185	192
10	187	197
11	191	192
12	186	189
13	192	179
14	196	194
15	188	186
16	187	193
17	190	187
18	179	182

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.577)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.813)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
------------	---	---------	------	---------	-----

Col 1	18	0	187.444	6.167	1.453
Col 2	18	0	189.167	5.793	1.365

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	26.694	26.694	0.746	0.394
Residual	34	1216.944	35.792		
Total	35	1243.639			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.394$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.048

The power of the performed test (0.048) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one exists. Negative results should be interpreted cautiously.

4. Phân tích hình thái nhân tế bào

STT	Control	SMG
1	0.76	0.83
2	0.73	0.85
3	0.79	0.88
4	0.82	0.90
5	0.79	0.85
6	0.78	0.81
7	0.89	0.77
8	0.89	0.74
9	0.78	0.74
10	0.77	0.77

11	0.77	0.74
12	0.76	0.74
13	0.75	0.79
14	0.75	0.76
15	0.73	0.74
16	0.73	0.75
17	0.73	0.72
18	0.75	0.74

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Failed ($P < 0.050$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0.402$)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 18	0	0.776	0.0482	0.0114	
Col 2 18	0	0.784	0.0553	0.0130	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups1	0.000625	0.000625	0.232	0.633	
Residual	34	0.0915	0.00269		
Total	35	0.0921			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.633$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.048

The power of the performed test (0.048) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

5. Đo diện tích tế bào

STT	Control	SMG
1	2895.055	9041.104
2	3379.669	4331.675
3	4295.226	4575.186
4	2948.725	2581.835
5	3461.753	4220.847
6	2161.03	4283.285
7	3171.3	3037.636
8	3374.933	2747.297
9	1856.371	6103.369
10	2000.019	5112.157
11	2920.311	4849.915
12	2191.023	4890.5
13	2295.207	4194.31
14	2620.388	3969.532
15	3482.274	6866.681
16	2052.111	3918.02
17	3453.86	4223.969
18	1905.306	4603.283
19	1906.884	4028.848
20	1578.547	5769.323
21	2478.318	3724.46
22	1772.708	3466.901

23	3951.102	4565.82
24	4091.593	8107.647
25	2628.28	3566.803
26	2246.272	4879.574
27	3046.595	6109.613
28	1463.313	2865.93
29	2178.394	4141.238
30	2939.254	3134.416
31	3922.689	4447.187
32	2737.2	5887.956
33	1490.148	3457.535
34	2457.797	4000.751
35	3535.945	3248.366
36	2948.725	2792.565
37	3411.239	4239.578
38	4227.348	9517.198
39	1580.125	7461.408
40	6211.581	5731.86
41	2603.024	6179.857
42	3067.116	

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Failed ($P < 0.050$)

Equal Variance Test: Failed ($P < 0.050$)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 42	0	2831.875	945.729	145.929	

Col 2 41 0 4753.059 1639.773 256.089

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups ¹	76576068.82076576068.820	43.007	<0.001		
Residual	81	144224740.676	1780552.354		
Total	82	220800809.496			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0.001$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 2 vs. Col 1	1921.1842	9.274	--	Yes	

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

6. Phân tích chu kỳ tế bào

6.1. G0/G1 phase

Control	SMG
G0/G1 (%)	G0/G1 (%)
55.4	55.2
55.3	46.7

47.9	62.4
42.3	55.3
49.6	75.5
52.7	82.6
20.6	55.6
26.7	54.9
45.6	58.9
49.7	49.4
46.1	56.0
50.4	56.8
52.7	56.6
49.2	55.6
55.6	60.4
52.4	54.8
52.4	59.2
51.1	59.2

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Failed ($P < 0.050$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0.788$)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 18	0	47.539	9.435	2.224	
Col 2 18	0	58.617	8.363	1.971	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
---------------------	----	----	----	---	---

Between Groups1	1104.454	1104.454	13.896	<0.001
Residual	34	2702.388	79.482	
Total	35	3806.842		

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.952

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 2 vs. Col 1	111.078	2	5.272	--	Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

6.2.S Phase

Control	SMG
S (%)	S (%)
9.02	32.0
10.4	36.9
8.39	26.7
14.7	35.6
7.79	19.6
7.76	14.0

64.5	10.4
59.1	6.83
10.9	7.95
6.31	9.81
7.57	10.1
7.71	10.8
9.38	6.52
7.87	8.70
9.81	8.71
8.83	7.62
11.8	10.3
9.49	7.77

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Failed ($P < 0.050$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0.936$)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 18	0	15.074	17.131	4.038	
Col 2 18	0	15.017	10.399	2.451	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups1	0.0289	0.0289	0.000144	0.990	
Residual	34	6826.971	200.793		
Total	35	6827.000			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.990$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.048

The power of the performed test (0.048) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one exists. Negative results should be interpreted cautiously.

6.3. G2/M phase

Control	SMG
G2/M (%)	G2/M (%)
32.9	12.1
31.4	15.4
41.3	10.4
41.8	8.81
40.6	4.71
37.5	2.94
13.9	28.4
13.5	32.1
42.0	26.8
41.7	36.1
43.6	31.3
40.3	28.9
36.0	31.3
41.7	31.2
31.9	27.5
35.7	33.5
28.5	25.5
34.9	28.0

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Failed ($P < 0.050$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0.439$)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 20	2	34.955	8.881	2.093	
Col 2 20	2	23.052	10.775	2.540	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups1	1275.162	1275.162	13.080	<0.001	
Residual	34	3314.738	97.492		
Total	35	4589.900			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0.001$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.938

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	11.903	2	5.115	--	Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

7. Cường độ nhân tế bào

STT	Control	SMG
1	1011.863	1251.271
2	1618.823	891.2922
3	1576.472	885.6406
4	1347.669	1025.361
5	1276.28	701.3022
6	2522.187	1011.594
7	1832.375	1288.009
8	1011.607	1236.519
9	1381.764	863.7921
10	1146.517	1086.862
11	1118.491	594.2129
12	1000.491	1005.206

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Failed ($P < 0.050$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0.153$)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 12	0	1403.712	441.907	127.568	
Col 2 12	0	986.755	214.392	61.890	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups1	1043	115.920	1043115.920	8.648	0.008
Residual	22	2653701.668	120622.803		
Total	23	3696817.589			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = 0.008$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.763

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	416.956	2	4.159	--	Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

8. Sự biểu hiện gene *bax* mức phiên mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed($P = 0.638$)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.369)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	1.001	0.0570	0.0329	
Col 2 3	0	1.080	0.182	0.105	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.00937	0.00937	0.516	0.512
Residual	4	0.0726	0.0182		
Total	5	0.0820			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.512).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

9. Sự biểu hiện gene *bcl-2* mức phiên mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.250)

Equal Variance Test: Passed(P = 1.000)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	1.000	0.00799	0.00461	
Col 2 3	0	1.109	0.150	0.0864	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.0178	0.0178	1.588	0.276
Residual	4	0.0449	0.0112		
Total	5	0.0627			

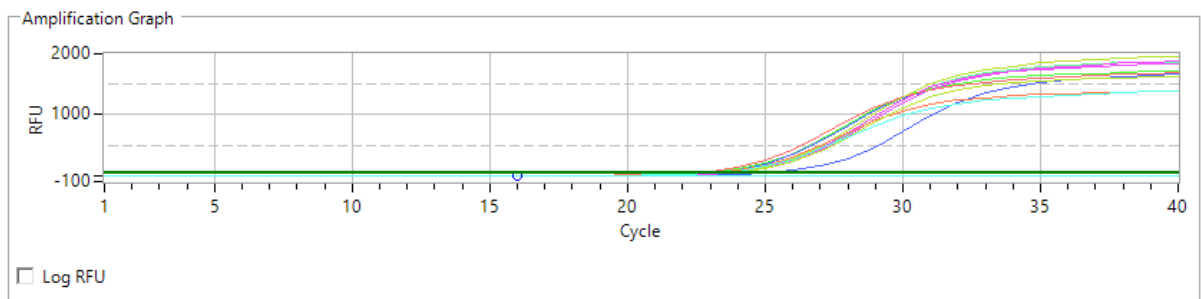
The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.276$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.091

The power of the performed test (0.091) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

bax; bcl-2



10. Sự biểu hiện gene tubulin mức phiên mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.952)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.289)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	1.004	0.115	0.0663	
Col 2 3	0	0.766	0.0531	0.0306	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.0851	0.0851	10.631	0.031
Residual	4	0.0320	0.00800		
Total	5	0.117			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.031).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.649

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050	
Col 1 vs. Col 2	0.238		2	4.611	--	Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

11. Sự biểu hiện gene actin mức phiên mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.703)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.306)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	1.003	0.0993	0.0573	
Col 2 3	0	0.291	0.0281	0.0162	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.761	0.761	143.055	<0.001
Residual	4	0.0213	0.00532		
Total	5	0.783			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

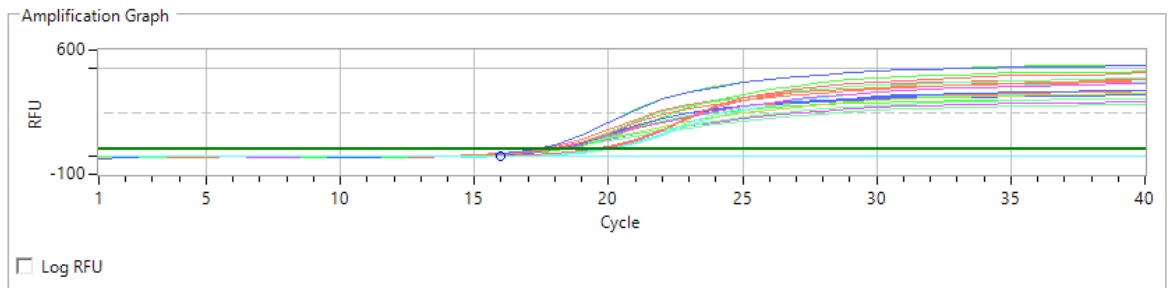
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	0.7122	16.915	--	Yes	

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

tubulin, actin



12. Sự biểu hiện gene *cdk4* mức phiên mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.317)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.985)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	1.002	0.0833	0.0481	
Col 2 3	0	0.773	0.0862	0.0498	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.0786	0.0786	10.946	0.030
Residual	4	0.0287	0.00718		
Total	5	0.107			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.030).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.663

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	0.229		2	4.679	-- Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

12. Sự biểu hiện gene *cdk6* mức phiên mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.332)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.536)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	1.004	0.112	0.0646	
Col 2 3	0	0.452	0.240	0.139	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.457	0.457	13.026	0.023
Residual	4	0.140	0.0351		
Total	5	0.598			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.023).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.742

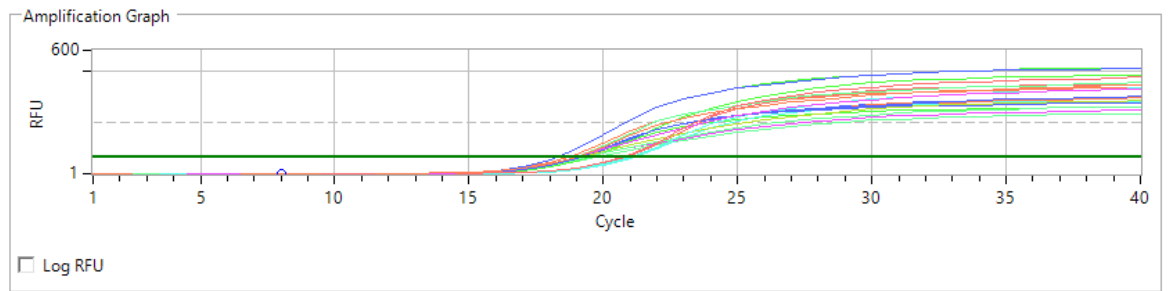
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	0.552		2	5.104	-- Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

cdk4, cdk6



13. Sự biểu hiện gene cyclin D mức phiên mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.505)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.683)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	1.050	0.379	0.219	
Col 2 3	0	0.983	0.299	0.173	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.00678	0.00678	0.0582	0.821
Residual	4	0.466	0.116		
Total	5	0.473			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.821).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

14. Sự biểu hiện gene cyclin A mức phiên mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.990)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.083)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	1.003	0.0907	0.0523	
Col 2 3	0	0.369	0.0337	0.0195	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.603	0.603	128.879	<0.001
Residual	4	0.0187	0.00468		
Total	5	0.622			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

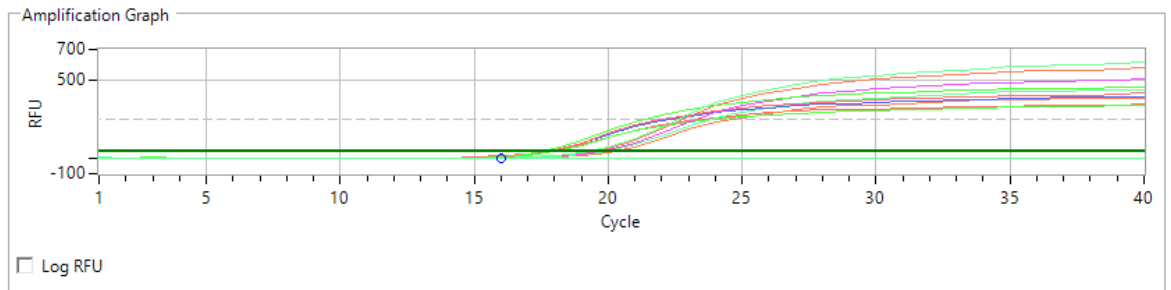
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	0.6342	16.055	--	Yes	

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

cyclin A; cyclin D



15. Sự biểu hiện của tubulin mức dịch mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.310)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.620)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	0.544	0.00808	0.00467	

Col 2 3 0 0.496 0.0118 0.00680

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.00351	0.00351	134.391	0.004
Residual	4	0.000408	0.000102		
Total	5	0.00391			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.004).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.988

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2		0.0483	2	8.294	-- Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

16. Sự biểu hiện của actin mức dịch mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.556)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.751)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	0.613	0.0588	0.0339	
Col 2 3	0	0.374	0.0476	0.0275	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.0855	0.0855	29.904	0.005
Residual	4	0.0114	0.00286		
Total	5	0.0970			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.005).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.977

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	0.239		2	7.734	-- Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

17. Sự biểu hiện của CDK4 mức dịch mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.532)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.824)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	0.395	0.0420	0.0243	
Col 2 3	0	0.276	0.0542	0.0313	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.0210	0.0210	8.932	0.040
Residual	4	0.00941	0.00235		
Total	5	0.0304			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.040).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.568

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050	
Col 1 vs. Col 2	0.118		2	4.226	--	Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

18. Sự biểu hiện của CDK6 mức dịch mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.367)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.565)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	0.699	0.0278	0.0161	
Col 2 3	0	0.618	0.00985	0.00569	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.00996	0.00996	22.857	0.009
Residual	4	0.00174	0.000436		
Total	5	0.0117			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.009).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.934

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	0.0815		2	6.761	-- Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

19. Sự biểu hiện của cyclin D mức dịch mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.916)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.148)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	0.111	0.0255	0.0147	
Col 2 3	0	0.101	0.00789	0.00455	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
---------------------	----	----	----	---	---

Between Groups	1	0.000138	0.000138	0.387	0.568
Residual	4	0.00142	0.000356		
Total	5	0.00156			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.568$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

20. Sự biểu hiện của cyclin A1 +A2 mức dịch mã

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed($P = 0.275$)

Equal Variance Test: Passed($P = 0.710$)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1 3	0	0.879	0.0714	0.0412	
Col 2 3	0	0.689	0.0566	0.0327	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.0540	0.0540	13.014	0.023
Residual	4	0.0166	0.00415		

Total 5 0.0706

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = 0.023$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.742

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050	
Col 1 vs. Col 2	0.190		2	5.102	--	Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.