

THEO DÕI TẾ BÀO GỐC SINH DỤC TRONG PHÁT TRIỂN PHÔI SỚM Ở GÀ VÀ CHIM CÚT

Nguyễn Mộng Hùng

1. Mở đầu

Gà (*Gallus gallus domesticus*) có vai trò quan trọng như là nguồn thực phẩm giàu protein. Bên cạnh đó, gà mái nuôi chuyển gen là đối tượng có tiềm năng cao trong sản xuất có hiệu quả các protein trị liệu cho công nghiệp dược phẩm, do giá cả chăn nuôi thấp, vòng đời ngắn với tốc độ sinh trưởng cao, môi trường vô trùng tự nhiên của trứng, lượng lớn protein được tạo ra trên một quả trứng, và lượng lớn trứng được tạo ra trên một con gà mái trên năm [1]

Chim cút (*Coturnix coturnix japonica*) cũng là một đối tượng nuôi quan trọng. Đã có nhiều thí nghiệm cấy ghép các mô và cơ quan giữa gà và chim cút. Điều quan trọng là do đặc điểm hình thái người ta có thể nhận biết được các tế bào chim cút lẫn trong các tế bào gà. Chúng tôi quan tâm đến đối tượng này với hy vọng sử dụng đặc điểm trên để theo dõi hành vi các tế bào gốc sinh dục.

Trong số các loại tế bào gốc, tế bào gốc sinh dục giữ một vai trò quan trọng cho công nghệ chuyển gen, vì tất cả những biến đổi kiểu gen trong các tế bào gốc này đều được truyền cho thế hệ sau. Đã từ lâu, người ta biết rằng các tế bào gốc sinh dục, hay các tế bào sinh dục nguyên thủy xuất hiện rất sớm trong quá trình phát triển phôi, di chuyển theo một phương thức nhất định và cuối cùng đi vào cư trú trong tuyến sinh dục và là thủy tổ của tất cả các tế bào sinh dục và giao tử của cơ thể [2].

Để có thể tiếp cận công nghệ tế bào gốc gia cầm nói chung và gà nói riêng, việc quan trọng là phải theo dõi được hành vi các tế bào gốc sinh dục trong quá trình phát triển phôi sớm. Công trình này có mục tiêu sử dụng các dấu hiệu hình thái để nhận biết và theo dõi các tế bào sinh dục nguyên thủy ở phôi gà giống Lương phượng và chim cút vào những ngày ấp đầu tiên.

2. Đối tượng và phương pháp

Đối tượng: Chúng tôi sử dụng trứng gà giống Lương phượng, nuôi tại Trung tâm Nghiên cứu Gia cầm Thụy Phương, trứng giống có tỷ lệ thụ tinh và ấp nở cao trên 95%.

Chúng tôi mua trứng chim cút đã thụ tinh từ một số cơ sở nuôi chim cút ở Đông Anh, Hà Nội.

Trứng gà và chim cút được ấp trong máy ấp mini Octagon pro 20, hãng Brinsea, Anh quốc, với mọi thông số về nhiệt độ, độ ẩm và đảo trứng được điều chỉnh hoàn toàn tự động.

Hàng ngày, từ ngày thứ nhất đến ngày thứ 6, phôi được lấy ra, định hình trong dung dịch Bouin. Mẫu được rửa nước, khử nước, đúc trong parafin và cắt các lát cắt mỏng 7 μm . Các lát được nhuộm Hematoxylin Eosin, nghiên cứu và chụp ảnh trên kính hiển vi Olympus BHS – PM-10AD theo phương pháp thông thường

Chúng tôi cũng làm các tiêu bản quét từ máu phôi 2-3 ngày ấp. Tiêu bản được nhuộm Giem xa và nghiên cứu như đối với các tiêu bản cắt lát.

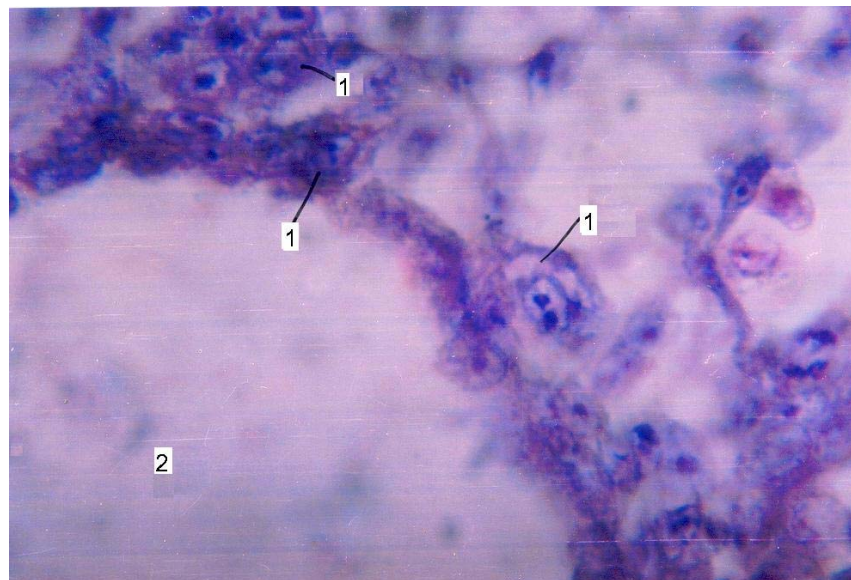
Trong các tiêu bản này, chúng tôi theo dõi các tế bào sinh dục nguyên thủy theo các dấu hiệu hình thái đặc trưng như: hình cầu, có kích thước lớn hơn hẳn các tế bào xung quanh, có nhân lớn, nổi rõ một hoặc 2 tiểu hạch. [3]

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Theo dõi các tế bào sinh dục nguyên thủy ở phôi 1-3 ngày ấp

Theo Nieuwkoop và Sataurya [4], tế bào sinh dục nguyên thủy xuất hiện ở lá trên phôi bì, di cư xuống lá dưới và ở ngày ấp đầu tiên tập trung ở liềm mầm, một vùng ngoài phôi ở phía đầu dải nguyên thủy. Trong 3 ngày đầu tế bào sinh dục nguyên thủy di cư theo mạch máu để đi vào gờ sinh dục. Chúng tôi làm nhiều tiêu bản phôi sớm, nhưng do hình thái chưa ổn định nên chưa khẳng định được sự nhận biết các tế bào sinh dục nguyên thủy ở giai đoạn này. Chúng tôi sẽ nghiên cứu chi tiết bằng các phương pháp hoá mô và sẽ có thông báo sau.

Trong các tiêu bản phôi 3 ngày ấp, chúng tôi phát hiện thấy rõ các tế bào đặc trưng cho tế bào sinh dục nguyên thủy gần các mạch máu chính. Hình 1 là ảnh chụp lát cắt qua vùng máu của phôi chim cút 3 ngày ấp. Như trên hình thấy rõ một số tế bào có hình thái tế bào sinh dục nguyên thủy. Chúng có kích thước lớn hơn hẳn các tế bào xung quanh. Nếu tế bào bình thường chim cút có một hạt chất nhiễm sắc lớn (tài liệu cũ vẫn gọi là tiểu hạch), thì tế bào sinh dục nguyên thủy có nhân lớn và có 2 “tiểu hạch” rõ rệt. Chúng nằm ở các vị trí rất gần với thành mạch, có thể chúng vừa di cư từ mạch máu, trên đường đi tới gờ sinh dục. Quan sát các tiêu bản quét cũng phát hiện được một số tế bào có hình thái giống với tế bào sinh dục nguyên thủy trong máu phôi gà và chim cút.



Hình 1. Ảnh hiển vi vùng mô quanh động mạch chủ lưng phôi chim cút 3 ngày ấp.

1- Các tế bào có hình thái tế bào sinh dục nguyên thủy.

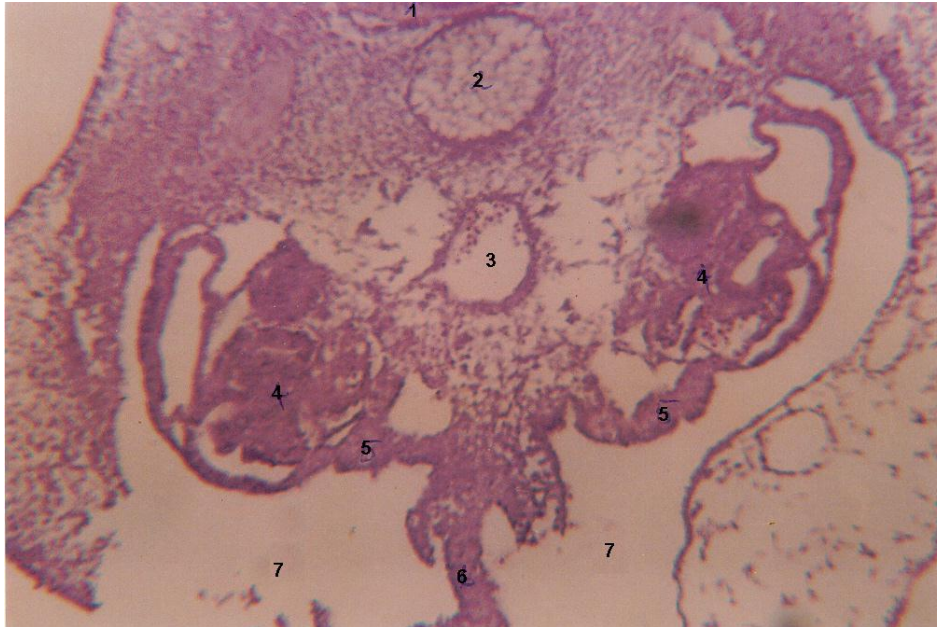
2- Xoang động mạch chủ lưng. Hemotoxinilin – Eosin, TK-10, VK- 100

3.2. Theo dõi các tế bào sinh dục nguyên thủy ở phôi 3-5 ngày ấp

Hình 2 là ảnh chụp hiển vi với độ phóng đại thấp lát cắt qua phôi gà 5 ngày ấp đi qua vùng gờ sinh dục. Có thể thấy rõ hai gờ sinh dục, trái và phải, nằm hai bên mạc treo ruột, nổi giữa mạc treo ruột và trung thận, đồng thời nằm ở một phần giới hạn giữa trung thận và xoang bụng.

Gờ sinh dục phải và trái ở phôi gà 5 ngày ấp là những cấu trúc tương đối nhỏ, kích thước chỉ khoảng 1×2 mm. Biểu mô phức tạp đa phần gồm những tế bào nhỏ đẹp, không khác nhiều lắm so với biểu mô lân cận. Trên tiêu bản, nhất là ở gờ sinh dục phía bên trái

(Hình 3), thấy rõ các tế bào sinh dục nguyên thủy hay các tế bào gốc sinh dục, chúng có kích thước lớn hơn hẳn các tế bào xung quanh, kích thước đạt tới 50-60µm, tế bào chất sáng, nhân lớn, sáng, thấy rõ một hoặc 2 tiểu hạch.

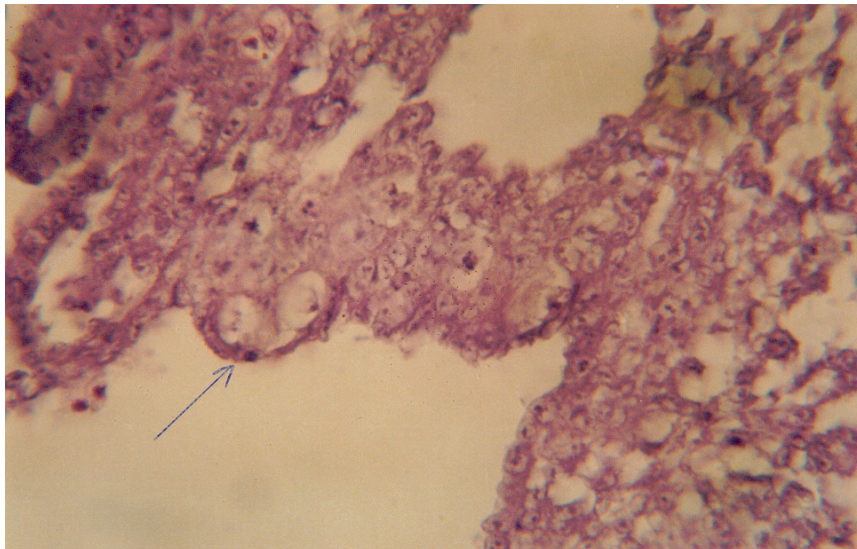


Hình 2. Lát cắt ngang phôi đi qua phần trung thận phôi gà 5 ngày ấp.(VK-4X TK-10).

Có thể thấy sơ đồ cơ thể phôi. 1- một phần ống thần kinh, 2- dây sống,

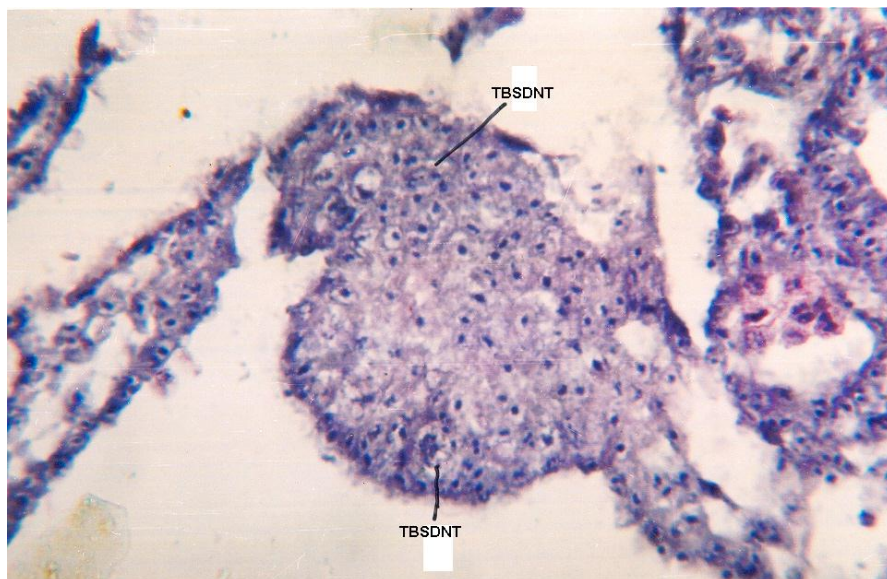
3- động mạch chủ, 4- thận, 5- gờ sinh dục, 6 – mạc treo ruột, 7- xoang cơ thể.

Thấy rõ gờ sinh dục nằm ở phía bụng-giữa trung thận, hai bên mạc treo ruột.. ở phôi 5 ngày ấp tuyến sinh dục chưa tách biệt mà chỉ hình thành như hai gờ sinh dục ở phía bụng trung thận



Hình 3. Gờ sinh dục bên trái, (VK-40 X TK-10), thấy rõ các tế bào gốc sinh dục (mũi tên) là các tế bào lớn, nhân sáng, to; trong nhân có một hoặc 2 tiểu hạch. Có thể thấy gờ sinh dục lúc này chỉ có bề dày bằng khoảng 3 lần đường kính tế bào sinh dục nguyên thủy

Phôi chim cú phát triển nhanh hơn phôi gà. Thời gian ấp nở trứng chim cú là 18 ngày, trong khi đó, thời gian ấp nở phôi gà là 21 ngày. Hình 4 trình bày lát cắt qua gờ sinh dục phôi chim cú 4 ngày ấp. Gờ sinh dục đã có dạng tuyến sinh dục hình bầu dục. Thấy rõ một số tế bào sinh dục nguyên thủy (TBSDNT) nằm sâu trong bề dày tuyến. Thấy rõ số lượng tế bào sinh dục trong tuyến đã tăng lên rất nhiều. Cấu trúc tuyến này tương đương với tuyến sinh dục phôi gà 6,5 ngày ấp.



Hình 4. Ảnh hiển vi lát cắt qua tuyến sinh dục phôi chim cú 4 ngày ấp, (VK-40, TK-10). Thấy rõ các tế bào sinh dục nguyên thủy (TBSDNT). Bên phải tuyến là trung thận, bên trái tuyến là mạc treo ruột

Như vậy, các kết quả trên của chúng tôi cũng phù hợp với các kết quả nghiên cứu kinh điển. Ở phôi gà vào 4 ngày ấp đầu tiên, các tế bào sinh dục nguyên thủy hình thành và di cư theo mạch máu, gờ sinh dục đang hình thành và vào ngày ấp thứ 5 đã thấy rõ trong gờ sinh dục. Phôi chim cú phát triển nhanh hơn phôi gà, ở phôi chim cú vào ngày ấp thứ 4 đã thấy các tế bào sinh dục nguyên thủy tăng sinh trong tuyến sinh dục. Các dẫn liệu trên rất quan trọng trong việc định hướng cho công tác tách và nuôi cấy các tế bào gốc sinh dục.

4. Kết luận

Đã nhận biết được các tế bào gốc sinh dục gắn thành mạch ở phôi chim cú 3 ngày ấp.

Đã xác định được các tế bào gốc sinh dục bắt đầu cư trú và tăng sinh trong phôi gà 5 ngày ấp và phôi chim cú 4 ngày ấp.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện với kinh phí của đề tài KC-04.24

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mozdziak P.E. & Petite J.N., Status of transgenic chicken for Developmental Biology, *Developmental Dynamics* 229, 2004, 414-421
2. Tsunekawa N., Naito, M., Nihida, T., *Isolation of Chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells*, *Development* 115, 2000, 923-1186.
3. Petite, J.N. and Chang, I. , *Method of producing an undifferentiated Avian Cell Culture using avian primordial germ cell*, U.S. Patent # 6.333.192. Brief Summary, December 25, 2001.
4. Nieuwkoop P.D., and Sutasuria L.A., *Primordial germ cells in the chordate*, Cambridge University Press, 1979, 187p