

ẢNH HƯỞNG NỒNG ĐỘ SUCROSE VÀ GLYCEROL ĐẾN CHẤT LƯỢNG TINH ĐÔNG LẠNH CỦA THỎ ĐEN ĐỊA PHƯƠNG

Lâm Nhật Anh¹, Trần Văn Bé Năm², Trần Thị Thanh Khương^{3,*}

¹ Sinh viên K46 ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Bộ môn Sinh học phân tử, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

³ Phòng Thí nghiệm Tế bào gốc, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

* Email: tttkhuong@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Nhằm bảo tồn nguồn gen của thỏ đen bản địa vùng đồng bằng sông Cửu Long, bảo quản lạnh tinh trùng thỏ đen bằng phương pháp thủy tinh hóa đã được nghiên cứu. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của nồng độ sucrose và glycerol trong môi trường bảo quản đến chất lượng tinh trùng sau thủy tinh hóa, kết quả cho thấy, nồng độ sucrose và glycerol tác động đáng kể đến các chỉ số như: Tỷ lệ toàn vẹn acrosome, tỷ lệ di động tổng số và tỷ lệ sống của tinh trùng. Nồng độ sucrose 0,25M và glycerol 4% mang lại kết quả tốt nhất về chất lượng tinh trùng. Nghiên cứu này góp phần bảo tồn nguồn gen địa phương và phục hồi quần thể trong tương lai.

Từ khóa: Bảo quản lạnh, glycerol, sucrose, thủy tinh hóa, tinh trùng thỏ.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thỏ đen địa phương (*Oryctolagus cuniculus*) là một phân loài thỏ đang phải đối mặt với nguy cơ tuyệt chủng do sự cạnh tranh từ các giống thỏ lai và ngoại nhập được ưa chuộng vì năng suất thịt cao hơn và sử dụng trong phòng thí nghiệm [1, 2]. Việc bảo tồn nguồn gen thỏ đen địa phương mang ý nghĩa quan trọng trong việc duy trì đa dạng sinh học, phát triển chăn nuôi bền vững và đảm bảo an ninh lương thực.

Đông lạnh tinh trùng là một kỹ thuật hỗ trợ sinh sản hiệu quả giúp lưu trữ tinh trùng dài hạn trong nitơ lỏng ở nhiệt độ cực thấp (-196°C). Kỹ thuật này đóng vai trò quan trọng trong việc bảo tồn nguồn gen động vật quý, hiếm và phục hồi quần thể thông qua thụ tinh nhân tạo hoặc chuyển gen. Tuy nhiên, quá trình đông lạnh tinh trùng truyền thống có thể gây tổn thương cho tinh trùng do sự hình thành tinh thể băng và các tác động khác [3]. Thủy tinh hóa bảo quản tinh trùng bằng cách cho tinh trùng tiếp xúc trực tiếp với nitơ lỏng ở -196°C. Đây là một kỹ thuật đang nổi lên nhanh chóng để bảo quản lạnh và có lợi thế so với bảo

quản lạnh thông thường về nhiều mặt. Nó liên quan đến thời gian cân bằng ngắn, tốc độ làm mát nhanh, không có thiết bị đắt tiền như tủ đông sinh học được lập trình và không có tổn thương vật lý đối với các tế bào do các tinh thể băng. Thủy tinh hóa là một quy trình đơn giản đòi hỏi ít thời gian hơn và có khả năng trở nên an toàn hơn cũng như tiết kiệm chi phí hơn so với làm lạnh chậm [4]. Kỹ thuật này sử dụng dung dịch bảo quản lạnh có khả năng thẩm thấu nhanh vào tế bào tinh trùng, hạn chế tối đa sự hình thành tinh thể băng, từ đó bảo vệ tinh trùng khỏi tổn thương và nâng cao tỷ lệ sống sót sau khi rã đông [5].

Việc sử dụng môi trường TCG (Tris-Citrate-Glucose) là cơ sở thường được sử dụng để bảo quản lạnh tinh trùng thỏ [6]. Vấn đề chính trong bảo quản lạnh tinh trùng là sự hình thành tinh thể băng làm giảm khả năng sống sót của tinh trùng sau khi rã đông. Quá trình khử nước của nước tế bào, bổ sung chất bảo vệ lạnh (CPA) vào tế bào thường được thực hiện để tránh tạo ra các tinh thể băng [7]. Glycerol và sucrose là hai CPA dễ tìm và phổ biến nhất sẽ được sử dụng để xây dựng quy

trình thủy tinh hóa cơ bản trên đối tượng thỏ đen. Glycerol có khả năng thẩm thấu, rút nước trong tế bào ra ngoài tế bào, làm hạn chế sự kết tinh của nước và giảm tổn thương tế bào sau khi giải đông, khử nước tốt hơn ở nhiệt độ thấp và tăng tỷ lệ sống sót của tinh trùng sau khi trữ lạnh [8]. Năm 1949, Polge đã phát hiện ra glycerol như một chất bảo vệ đông lạnh (Cryoprotectants - CPA) tinh trùng hiệu quả [9]. Kể từ đó, glycerol đã được sử dụng thường xuyên và được xem là một nền tảng trong đông lạnh tinh trùng. Glycerol cũng đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu về bảo quản lạnh tinh trùng dê và thỏ vì vai trò bảo vệ của nó đối với tế bào [10, 11]. Một số CPA có khối lượng phân tử cao không thể thẩm qua màng tế bào. Đường có lẽ là CPA có khối lượng phân tử cao đầu tiên được sử dụng làm chất phụ gia trước khi đông lạnh. Cả monosacarit và disacarit đều được sử dụng để bảo quản lạnh tinh trùng, tuy nhiên so với monosacarit, disacarit như trehalose và sucrose được sử dụng rộng rãi hơn [12]. Sucrose là một chất bảo quản lạnh không thẩm thấu, được thêm vào để tăng độ thẩm thấu và ngăn ngừa tổn thương do tế bào trương phồng trong quá trình khử nước, có tác dụng ổn định màng sinh chất trong quá trình đông lạnh - rã đông [13], làm mất nước tế bào ở nhiệt độ cao cho phép làm lạnh nhanh mà không gây tổn thương nội bào.

Nồng độ của chất bảo quản lạnh cao sẽ gây độc đến quá trình tổng hợp của tế bào được trữ

lạnh, thay đổi cấu trúc hai lớp của màng tế bào [14]. Đã có nghiên cứu về chất bảo quản lạnh cho thủy tinh hóa trên thỏ [15], tuy nhiên ở Việt Nam các nghiên cứu về thủy tinh hóa tinh trùng thỏ đen còn khá hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm đánh giá nồng độ thích hợp nhất của hai chất bảo quản lạnh là glycerol và sucrose để bổ sung vào môi trường bảo quản nhằm đạt chất lượng tối ưu nhất cho tinh trùng thỏ đen sau khi bảo quản lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Động vật thí nghiệm

Động vật thí nghiệm là 3 con thỏ đen địa phương từ 2,5 - 3 kg được nuôi tại trại thực nghiệm động vật của Phòng thí nghiệm Tế bào gốc, Trường Đại học Cần Thơ. Thỏ được nuôi và chăm sóc trong lồng cao cách mặt đất 1,2 m trong môi trường thoáng khí, với quang chu kỳ là 12 giờ sáng và 12 giờ tối, được vệ sinh 2 ngày 1 lần. Động vật được cho ăn khối lượng tiêu chuẩn, uống nước và tiêm phòng đầy đủ. Nghiên cứu đã được phê duyệt về mặt đạo đức đối với các quy trình chăm sóc, nuôi nhốt và khai thác tinh dịch động vật, tuân theo hướng dẫn của Ủy ban Đạo đức Động vật, Trường Đại học Cần Thơ (CTU - AEC24004). Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1 đến tháng 6 năm 2024.

2.2. Thiết kế thí nghiệm

Bảng 1. Thành phần môi trường dùng cho thí nghiệm

Nghiệm thức	Tris (g)	Citric axit (g)	Glucose (g)	Gentamicin (mg)	Egg yolk (%)	Glycerol (%)	Sucrose	Nước cất (mL)
1	3,02	1,48	0,625	8	15	4	0,1M	Đến 100
2	3,02	1,48	0,625	8	15	4	0,25M	Đến 100
3	3,02	1,48	0,625	8	15	4	0,5M	Đến 100

4	3,02	1,48	0,625	8	15	7	0,1M	Đến 100
5	3,02	1,48	0,625	8	15	12	0,1M	Đến 100

Mẫu tinh dịch được khai thác từ 3 con thỏ đen đực sinh sản bình thường tại trang trại thí nghiệm của Phòng thí nghiệm Tế bào gốc, Trường Đại học Cần Thơ. Mỗi cá thể thu mẫu 3 lần. Đánh giá chất lượng tinh tươi: Màu sắc, thể tích, pH, mật số. Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ sucrose và glycerol trong môi trường đông lạnh đến chất lượng tinh trùng thỏ đen. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với các nhân tố đánh giá là sự kết hợp nồng độ của sucrose (0,1M, 0,25M, 0,5M) và glycerol (4%, 7%, 12%) với 5 nghiệm thức tương ứng với 5 môi trường đã chuẩn bị. Mỗi nghiệm thức lặp lại 9 lần với 3 lần trên mỗi con thỏ đen 8 - 12 tháng tuổi, tần suất lấy tinh là 3 ngày/lần.

Quá trình thủy tinh hóa tinh trùng được tiến hành trong cọng rạ 0,25 ml [16]. Cọng rạ được nạp đầy 100 μ l [17], mẫu tinh dịch bằng micropipette và chèn theo chiều ngang vào ống trữ tinh 0,5 ml. Cả hai đầu của ống hút 0,5 ml được hàn kín bằng nhiệt. Mẫu được đặt cố định ở nhiệt độ phòng 5 phút và đặt theo chiều ngang trong bể chứa nitơ lỏng (LN2), cọng rạ được lấy ra khỏi bể nitơ lỏng, tiến hành trữ cọng rạ đã được đông trong bình chứa nitơ lỏng chuyên dụng. Phân tích sau làm ấm được thực hiện sau 72 giờ bảo quản trong thùng chứa LN2. Để làm ấm, lấy ống 0,25 ml ra khỏi LN2 và ngâm vào nước ấm 37°C trong 20 giây.

Các chỉ tiêu đánh giá bao gồm: Hoạt lực tinh trùng, tổng số tinh trùng tiến thẳng (VAC), tỷ lệ sống, toàn vẹn màng tế bào và toàn vẹn acrosome.

2.3. Khai thác tinh dịch

Dụng cụ thu nhận tinh dịch cầm bằng tay được chuẩn bị như mô tả của Naughton và cs (2003) [18]. Dụng cụ được làm ấm ở 40 - 42°C, đặt thỏ cái vào lồng thỏ đực, dụng cụ được đặt về phía sau và phía dưới để cho phép thỏ đực xâm nhập vào âm đạo nhân tạo. Xuất tinh xảy ra nhanh chóng và thiết bị được lấy ra. Động vật được khai thác tinh hai lần mỗi tuần.

2.3.1. Thể tích tinh dịch

Để yên mẫu tinh dịch trong ống chứa tinh 30 - 60 giây để tan bọt, sau đó tiến hành đánh giá thể tích mẫu. Thể tích mẫu được đánh giá bằng cách dùng pipette chính xác để xác định. Cuối cùng, kết quả đo được ghi nhận lại.

2.3.2. Màu sắc tinh dịch

Đánh giá màu sắc cảm quan bằng mắt: Mẫu tinh dịch tốt có màu trắng đục đặc trưng; mẫu có lẫn nước tiểu, phân hoặc máu sẽ được loại bỏ và không sử dụng.

2.3.3. pH tinh dịch

Giá trị pH của mẫu tinh dịch được kiểm tra bằng máy đo pH S220-Std-Kit (Mettler Toledo, Trung Quốc). Việc xác định pH tinh dịch cần được tiến hành nhanh, đảm bảo thời gian tối thiểu và chính xác. Chỉ sử dụng những mẫu tinh dịch có pH dao động từ 6,80 - 7,20.

2.3.4. Đánh giá nồng độ tinh trùng

Nồng độ tinh trùng (C, triệu/ml) được xác định bằng buồng đếm Neubauer trên kính hiển vi có độ phóng đại 400 lần.

2.3.5. Đánh giá tỷ lệ di động của tinh trùng

Mẫu được xem dưới kính hiển vi với độ phóng đại 400 lần, sự di động của tinh trùng được đánh giá [19]:

- Hoạt lực tinh trùng (A, %) = (Số tinh trùng di động tiến thẳng) / (Tổng số tinh trùng đếm được) $\times$ 100.

- Tổng số tinh trùng tiến thẳng (VAC, tỷ/lần) được xác định bằng tích của ba chỉ tiêu: Thể tích (V), hoạt lực tinh trùng (A) và nồng độ tinh trùng (C).

2.3.6. Đánh giá tỷ lệ sống của tinh trùng

Việc đánh giá tỷ lệ sống của tinh trùng được thực hiện bằng phương pháp nhuộm Eosin-Nigrosin. Eosin chỉ nhuộm các tinh trùng chết,

biến chúng thành màu hồng đậm, trong khi tinh trùng sống có màu trắng. Nigrosin tăng cường sự tương phản giữa nền và đầu tinh trùng, làm cho tinh trùng dễ quan sát hơn. Tổng cộng 100 tinh trùng đã được đếm trên mỗi lát kính, tỷ lệ tinh trùng sống dựa trên tinh trùng không bắt màu thuốc nhuộm [20].

2.3.7. Đánh giá tính toàn vẹn màng của tinh trùng

Việc đánh giá tính nguyên vẹn của màng tế bào plasma (IPM) của tinh trùng được thực hiện bằng phương pháp thử nổi giảm áp lực (HOS). Quan sát sự nguyên vẹn của màng tế bào plasma của tinh trùng được tiến hành bằng cách nhỏ một giọt hỗn hợp tinh trùng (tinh trùng và dung dịch nhược trương đã được ủ) lên một ổ kính và phủ bằng kính che phủ, sau đó quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 400x. Tinh trùng có màng nguyên vẹn sẽ giữ dung dịch nhược trương bên trong tế bào, khiến cho đuôi có vẻ cong hoặc cong. Ngược lại, tinh trùng có đuôi thẳng chỉ ra rằng màng tế bào plasma đã bị hỏng, vì nó không thể ngăn nước xâm nhập vào [21].

2.3.8. Đánh giá acrosome của tinh trùng

Tinh trùng được cố định trên lame kính và để khô ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó mẫu được ngâm trong dung dịch ethanol 96% trong 15 giây. Mẫu được đặt ở nhiệt độ phòng trong 5 phút để khô, tiếp đó mẫu được nhuộm với dung dịch giemsa 10% trong 10 phút. Sau đó, mẫu được rửa dưới vòi nước nhẹ, để khô ở nhiệt độ phòng và quan sát mẫu dưới kính hiển vi. Tinh trùng có acrosome bình thường thì vùng cực đầu sẽ bắt

màu thuốc nhuộm giemsa (màu lavender nhạt), ngược lại tinh trùng có acrosome không bình thường, vùng cực đầu sẽ không bắt màu thuốc nhuộm [22].

2.4. Phân tích thống kê

Số liệu được ghi nhận bằng phần mềm Excel (2016). Mô hình hỗn hợp tuyến tính ANOVA được sử dụng để phân tích dữ liệu, sau đó so sánh giá trị trung bình giữa các nghiệm thức bằng phương pháp Tukey trong phần mềm R.4.3.3. Các kết quả được trình bày $\pm$ sai số chuẩn (SE). Nhân tố cố định (fixed effect) là nồng độ glycerol và sucrose. Nhân tố ngẫu nhiên (random effect) là thỏ và lần khai thác tinh. Các chỉ tiêu phân tích bao gồm: Hoạt lực tinh trùng, tổng số tinh trùng tiến thẳng (VAC), tỷ lệ sống, toàn vẹn màng tế bào và toàn vẹn acrosome. Ý nghĩa thống kê được đặt ở $p < 0,05$ cho thấy, mức độ đáng tin cậy cao đối với kết quả thu được. Hình ảnh biểu đồ được vẽ bằng phần mềm R.4.3.3.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

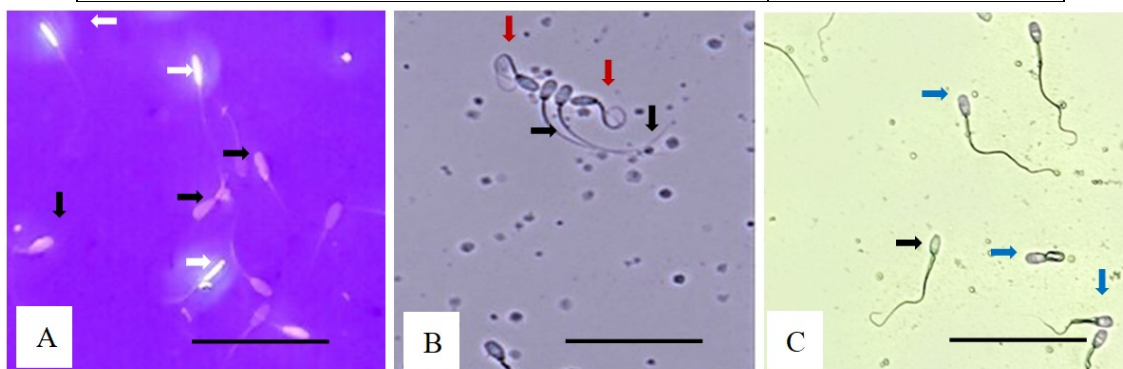
3.1. Chất lượng tinh dịch thỏ

Nghiên cứu trên tinh dịch mới khai thác từ giống thỏ đen địa phương ở vùng đồng bằng sông Cửu Long cho thấy, chất lượng tinh trùng tốt. Các thông số đo được được trình bày trong bảng 1, trong phạm vi bình thường đối với tinh dịch thỏ. Bảng 1 cho thấy, tinh dịch được thu nhận từ 3 con thỏ có màu trắng đục, đây là màu sắc đặc trưng của tinh dịch thỏ, độ pH và thể tích đạt chỉ tiêu về đánh giá đại thể, pH của tinh dịch thỏ dao động từ 6,9 - 7,2 là phù hợp cho sức sống của tinh trùng và khả năng đậu thai [23].

Bảng 2. Kết quả đánh giá đại thể tinh trùng thỏ sau khi thu mẫu (TB $\pm$ SEM, n = 9)

Chỉ tiêu đánh giá	Kết quả
Màu sắc	Trắng đục
pH	7,03 $\pm$ 0,09
Thể tích (ml)	0,63 $\pm$ 0,04

Nồng độ tinh trùng (triệu/ml)	858,75 ± 17,33
Hoạt lực tinh trùng (%)	72,03 ± 0,42
Tổng số tinh trùng tiến thẳng (tỷ/lần khai thác)	38,95 ± 6,45
Tỷ lệ sống (%)	92,91 ± 0,54
Tỷ lệ toàn vẹn màng tế bào (%)	80,53 ± 0,38
Tỷ lệ toàn vẹn acrosome (%)	80,41 ± 0,71



Hình 1. Kiểm tra chất lượng tinh trùng

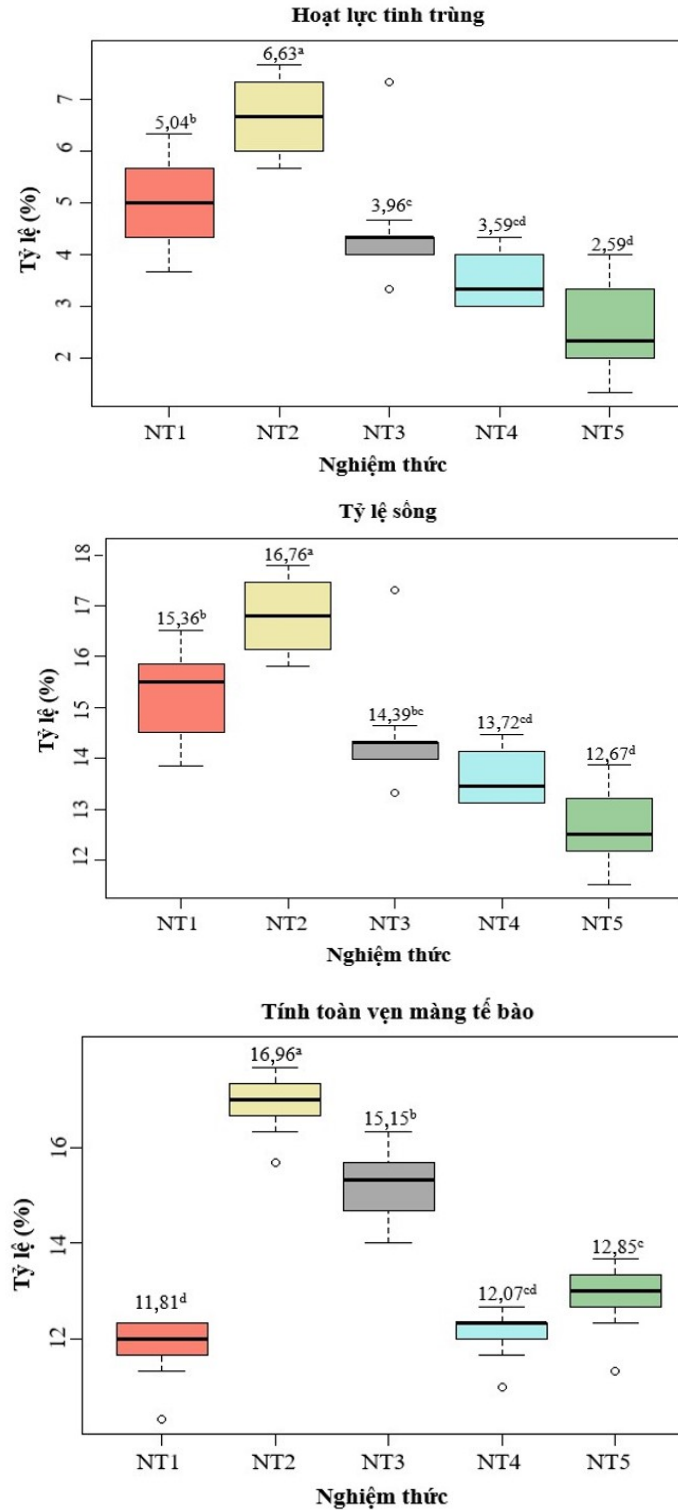
Ghi chú: A: Tinh trùng được nhuộm Eosin-Nigrosin. Tinh trùng sống không bắt màu thuốc nhuộm (mũi tên trắng), tinh trùng chết bắt màu thuốc nhuộm (mũi tên đen); B: Tinh trùng được xét nghiệm HOS. Tinh trùng có màng tế bào toàn vẹn thể hiện phản ứng cuộn tròn đuôi (mũi tên trắng), tinh trùng có màng tế bào bị tổn thương thì không có phản ứng (mũi tên đen); C: Tinh trùng được nhuộm acrosome. Tinh trùng có acrosome bình thường có phần cực đầu bắt màu thuốc nhuộm (mũi tên trắng), tinh trùng có acrosome bất thường có phần cực đầu không bắt màu thuốc nhuộm (mũi tên đen). Thanh tỷ lệ = 50 μ m.

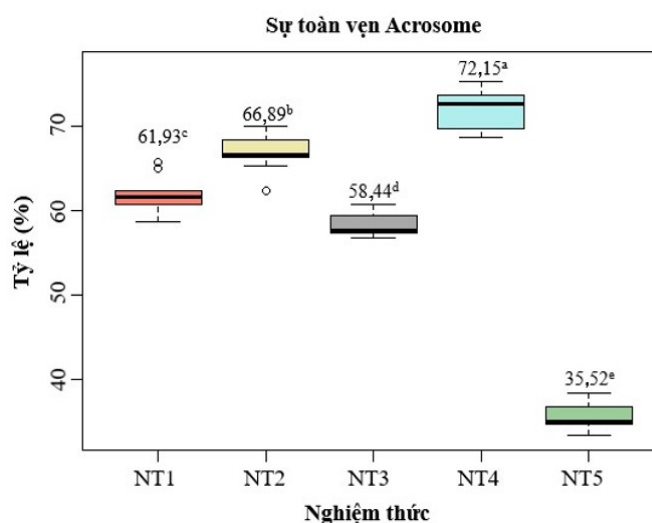
3.2. Kết quả thí nghiệm: Ảnh hưởng của sự kết hợp giữa các nồng độ của sucrose và glycerol đến chất lượng tinh trùng thô được bảo quản bằng phương pháp thủy tinh hóa

Hình 2 cho thấy, sau khi thủy tinh hóa, khả năng di động của tinh trùng thô giảm đáng kể. Việc bổ sung 0,25M sucrose và 4% glycerol cho môi trường bảo quản đạt được tỷ lệ di động tổng số và tỷ lệ sống cao nhất (6,63% và 16,76%). Tỷ lệ này giảm dần khi tăng nồng độ sucrose và glycerol. Ở nồng độ sucrose 0,1M, tỷ lệ di động tổng số và tỷ lệ sống giảm theo chiều hướng tăng

nồng độ glycerol. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Nghiệm thức bổ sung 0,1M sucrose và 12% glycerol có tỷ lệ di động tổng số và tỷ lệ sống thấp nhất (2,59% và 12,67%). Về tính toàn vẹn màng tế bào, việc bổ sung 0,25M sucrose và 4% glycerol đạt hiệu quả cao nhất (16,96%), khác biệt có ý nghĩa so với các nồng độ khác. Ngược lại, tỷ lệ tinh trùng có màng nguyên vẹn thấp nhất (11,81%) được ghi nhận ở nghiệm thức bổ sung 0,1M sucrose và 4% glycerol. Kết quả cũng cho thấy, cùng nồng độ 4% glycerol, môi trường có bổ sung 0,25M sucrose đạt giá trị toàn vẹn acrosome cao nhất (66,89%), ở nồng độ sucrose 0,1M, môi

trường bổ sung 7% glycerol lại đạt giá trị toàn vẹn acrosome cao nhất (72,15%) khi so sánh tất cả các nghiệm thức. Ngoài nghiệm thức 5, tất cả nghiệm thức còn lại đều có tỷ lệ toàn vẹn màng acrosome cao hơn 50%.





Hình 2. Biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá tinh trùng sau bảo quản lạnh

Ghi chú: Ở mỗi chỉ tiêu đánh giá, các giá trị trung bình có chữ cái in thường (a, b, c, d) theo sau khác nhau là khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$); NT1: Môi trường có chứa 0,1M sucrose + 4% glycerol; NT2: Môi trường có chứa 0,25 sucrose + 4% glycerol; NT3: Môi trường có chứa 0,5M sucrose + 4% glycerol; NT4: Môi trường có chứa 0,1M sucrose + 7% glycerol; NT5: Môi trường có chứa 0,1M sucrose + 12% glycerol.

3.3. Thảo luận

Nghiên cứu này nhằm mục đích xác định nồng độ chất bảo quản lạnh tối ưu cho tinh trùng thỏ để cải thiện chất lượng của chúng sau khi bảo quản lạnh. Nhiều nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, các chất CPA có thể có tác động độc hại đến khả năng sống sót và sinh sản của tinh trùng sau khi rã đông, tùy thuộc vào nồng độ sử dụng [24]. Qua nghiên cứu cho thấy, chất lượng tinh trùng đều giảm sau đông lạnh. Những thay đổi về độ thẩm thấu, thời gian và sự hình thành tinh thể băng nội bào trong quá trình đông lạnh gây tổn thương màng tế bào và màng ty thể [25].

Để đảm bảo sự sống của tế bào và tránh làm hỏng cấu trúc ngoại bào do quá trình đông băng gây ra, bằng phương pháp thủy tinh hóa tạo ra trạng thái thủy tinh được xác định bằng độ nhớt đạt đến giá trị đủ cao (~ 1.013 poises) để hoạt động giống như chất rắn, nhưng không có bất kỳ sự kết tinh nào [26]. Tuy nhiên, điều này chỉ hữu ích ở nồng độ thích hợp, nếu nồng độ quá cao, chúng có thể gây độc cho tế bào. Nhưng với loại tế bào và những loài khác nhau thì có nồng độ thích hợp khác nhau [27].

Nghiên cứu về sự khác biệt về chất lượng tinh trùng lừa giữa 2 phương pháp đóng gói là vi giọt và thủy tinh hóa [28], phương pháp sử dụng cộng ra cho kết quả cao hơn đáng kể so với phương pháp nhỏ giọt đối với: TM ($54,7 \pm 10,1$ so với $28,6 \pm 6,5\%$) và PM ($44,2 \pm 9,4$ so với $17,7 \pm 6,4\%$). Mặt khác, nghiên cứu về tinh trùng ngựa cho kết quả thủy tinh hóa bằng vi giọt thu được chất lượng tinh trùng hiệu quả hơn bảo quản trong ống hút [29], với các giá trị TM ($54,46 \pm 3,2$ so với $36,47 \pm 3,2\%$), PM ($38,63 \pm 3,4$ so với $15,11 \pm 2,0\%$), IMS ($65,40 \pm 2,8$ so với $50,50 \pm 2,8\%$) và AIS ($48,89 \pm 2,8$ so với $15,46 \pm 1,7\%$). Điều này cho thấy, mỗi loài sẽ phù hợp với những cách thức bảo quản lạnh tinh trùng khác nhau.

Một nghiên cứu khác của Rosato và Iaffaldano (2013) [30] về thủy tinh hóa tinh trùng thỏ với tỷ lệ di động tổng số đạt $0,16 \pm 0,4\%$ và $1,8 \pm 1,6\%$ khi thủy tinh hóa bằng phương pháp nhỏ giọt mà không bổ sung CPA. Với thí nghiệm bổ sung CPA là BSA và sucrose, chất lượng tinh trùng được cải thiện đáng kể với nghiệm thức BSA kết hợp sucrose ở nồng độ 0,1M và 0,25M, với tỷ lệ di động xấp xỉ 3% và tỷ lệ toàn vẹn màng xấp xỉ 6%.

Nghiên cứu này giúp xác định nồng độ sucrose và glycerol phù hợp cho thủy tinh hóa tinh trùng thỏ, sau khi đã đông chất lượng tinh trùng thỏ có sự khác biệt giữa các nồng độ, nghiệm thức 2 được bổ sung 0,25M sucrose và 4% glycerol được cho là tốt nhất, tỷ lệ di động, tỷ lệ sống và toàn vẹn màng lần lượt là 6,63%, 16,76%, 16,96%. Sự toàn vẹn acrosome cao nhất đối với nghiệm thức 3, mặc dù chưa có tiêu chuẩn cụ thể nào của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) cho sự toàn vẹn màng, tuy nhiên một số nghiên cứu cho rằng, tỷ lệ tinh trùng với màng acrosome nguyên vẹn trên 50% được xem là đạt yêu cầu cho thụ tinh [31, 32].

Tinh trùng thỏ dễ bị tổn thương sau đông lạnh do nhiều nguyên nhân được đề cập như: Cấu trúc tế bào của tinh trùng thỏ, stress oxy hóa và kỹ thuật đông lạnh đều làm giảm chất lượng của tinh trùng. Như đã đề cập, một trong những nguyên nhân gây ra sự sụt giảm đáng kể chất lượng của tinh trùng thỏ sau khi bảo quản đông lạnh bằng thủy tinh hóa là do hình dạng cấu trúc của nó. Cụ thể, theo Isachenko và cs (2011) [33], tinh trùng có đầu lớn hơn nên dễ bị sốc lạnh hơn, làm giảm khả năng sống sót của tinh trùng [34] và đầu của tinh trùng thỏ tương đối lớn [35], gây trở ngại cho việc thủy tinh hóa. Bên cạnh đó, độ thẩm thấu cũng là một yếu tố ảnh hưởng lớn, các tế bào có độ thẩm nước cao cho thấy khả năng chịu lạnh nhanh tốt hơn so với những tế bào có độ thẩm nước thấp hơn [36], thì tinh trùng thỏ có khả năng thẩm nước thấp [37]; cụ thể, hệ số thẩm L_p thấp và năng lượng hoạt hóa E_a cao, trái ngược với tình trạng được thấy ở tinh trùng của tất cả các loài khác được kiểm tra có L_p cao và E_a thấp. Tuy nhiên, đối với tốc độ làm mát của phương pháp đông lạnh chậm vẫn phù hợp và được sử dụng.

Stress oxy hóa là một trong những yếu tố quan trọng nhất góp phần làm giảm chất lượng tinh dịch sau khi đông trong quá trình bảo quản lạnh tinh trùng [38]. Quá trình đóng băng - tan băng làm tăng cường quá trình hô hấp của tinh trùng, hoặc quá trình trao đổi chất oxy hóa và các điện tử dư thừa được hình thành rò rỉ trực tiếp qua màng trong của ty thể và liên kết với oxy dẫn đến sự hình thành gốc tự do superoxide (phân tử có hoạt tính cao). Chúng có thể kết hợp dễ dàng với

các phân tử khác, trực tiếp gây ra quá trình oxy hóa có thể dẫn đến thay đổi cấu trúc, chức năng và cuối cùng làm tổn thương tế bào [39]. Bảo quản lạnh cũng gây ra tổn thương cấu trúc của ty thể, làm thay đổi các quá trình sinh hóa liên quan đến sản xuất ATP và cuối cùng làm giảm khả năng sống sót và khả năng vận động của tinh trùng khi đông lạnh [40].

Để giảm thiểu thời gian tiếp xúc với nitơ lỏng, ngăn chặn sự hình thành tinh thể băng và stress oxy hóa, việc sử dụng chất bảo vệ nồng độ cao là điều đúng đắn. Trên thực tế, việc sử dụng glycerol nồng độ cao gây độc cho tế bào. Tỷ lệ toàn vẹn acrosome tăng dần khi tăng từ 0 - 4% [41], nồng độ glycerol hiệu quả ở 7% cho hiệu quả xấp xỉ 80% toàn vẹn acrosome [42]. Việc bổ sung sucrose có thể cải thiện khả năng sống sót của tinh trùng thỏ sau quá trình đông lạnh thông thường và thủy tinh hóa, nó có tác dụng ổn định màng sinh chất trong quá trình đông lạnh - giải đông bằng cách tương tác với phospholipid màng ngoài việc tăng áp suất thẩm thấu. Protein, axit amine và các phân tử thẩm thấu khác sẽ ổn định các bào quan của tế bào, nhưng nó vẫn cần được loại bỏ trong quá trình rã đông [43].

Phương pháp đông lạnh thủy tinh hóa đặc biệt phù hợp cho các khu vực thiếu điều kiện áp dụng các phương pháp bảo quản tinh trùng truyền thống. Kỹ thuật này mang lại lợi ích to lớn trong việc bảo tồn các loài động vật hoang dã quý, hiếm, vì không đòi hỏi thiết bị phức tạp hay điều kiện bảo quản khắt khe. Thủy tinh hóa tinh trùng có thể thực hiện nhanh chóng, đảm bảo khả năng sống sót và bảo tồn chức năng của tinh trùng, góp phần quan trọng vào công tác bảo tồn sinh học và duy trì đa dạng di truyền. Mặc dù tinh trùng thỏ không được sử dụng cho mục đích thương mại, nhưng giá trị thí nghiệm và bảo tồn giống loài của nó là rất cần thiết, đặc biệt là đối với loài thỏ đen địa phương đang có nguy cơ sụt giảm số lượng.

Mặc dù nghiên cứu này đã đạt được những kết quả quan trọng, nhưng vẫn còn một số hạn chế cần được ghi nhận. Kích thước mẫu nhỏ có thể ảnh hưởng đến tính khái quát hóa của kết quả, do đó cần thực hiện thêm các nghiên cứu

với kích thước mẫu lớn hơn để xác nhận lại kết quả và tăng cường tính thuyết phục. Nghiên cứu chỉ tập trung vào một số chỉ tiêu đánh giá chất lượng tinh trùng sau thủy tinh hóa như: Tỷ lệ di động, tỷ lệ sống, tỷ lệ tinh trùng có màng nguyên vẹn và tỷ lệ acrosome nguyên vẹn. Cần bổ sung thêm các chỉ tiêu khác như: Sự phân mảnh ADN, tiềm năng hoạt động của ty thể, khả năng thụ tinh và tỷ lệ thai chết lưu để có cái nhìn toàn diện hơn về tác động của sucrose và glycerol đối với chất lượng tinh trùng thỏ sau thủy tinh hóa. Nghiên cứu này chưa tiến hành thụ tinh nhân tạo trên thỏ cái để đánh giá hiệu quả chất lượng tinh trùng sau bảo quản lạnh, đây là một bước quan trọng để đánh giá tiềm năng ứng dụng của kỹ thuật thủy tinh hóa tinh trùng thỏ trong thực tế. Ngoài ra, nghiên cứu này không có nhóm đối chứng để so sánh kết quả giữa các nồng độ sucrose và glycerol khác nhau. Việc bổ sung nhóm đối chứng sẽ giúp củng cố kết quả nghiên cứu và tăng cường giá trị khoa học của nghiên cứu. Nhìn chung, nghiên cứu này đã cung cấp những thông tin quan trọng về nồng độ sucrose và glycerol tối ưu cho thủy tinh hóa tinh trùng thỏ đen. Tuy nhiên, cần bổ sung thêm các nghiên cứu tiếp theo để khắc phục những hạn chế hiện có và hoàn thiện quy trình thủy tinh hóa tinh trùng thỏ, góp phần nâng cao hiệu quả bảo tồn nguồn gen của loài này.

4. KẾT LUẬN

Nồng độ sucrose 0,25M và glycerol 4% là nồng độ tối ưu cho thủy tinh hóa tinh trùng thỏ. Nồng độ này cho tỷ lệ di động, tỷ lệ sống, tỷ lệ tinh trùng có màng nguyên vẹn và tỷ lệ acrosome nguyên vẹn cao nhất. Kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa khoa học quan trọng vì cung cấp thông tin về nồng độ sucrose và glycerol tối ưu cho thủy tinh hóa tinh trùng thỏ lần đầu được nghiên cứu trên đối tượng thỏ đen địa phương vùng đồng bằng sông Cửu Long, góp phần bảo tồn và phát triển nguồn gen của loài thỏ địa phương này.

Kết quả nghiên cứu này có thể thành cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo trong việc cải thiện tinh trùng thỏ và ứng dụng kỹ thuật bảo quản tinh trùng dạng lỏng để thụ tinh nhân tạo. Nghiên cứu cung cấp cái nhìn tổng quan về ảnh

hưởng của phương pháp thủy tinh hóa và xây dựng một quy trình thủy tinh hóa tinh trùng thỏ đen địa phương vùng đồng bằng sông Cửu Long dựa trên hai chất bảo quản lạnh cơ bản là sucrose và glycerol.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hà Ngân (2023). Chăn nuôi Hà Nội năm 2023: Đối mặt với quá trình đô thị hóa nhanh. <https://nhachannuoi.vn/chan-nuoi-ha-noi-nam-2023-doi-mat-voi-qua-trinh-do-thi-hoa-nhanh/>. Truy cập ngày 23/5/2024.
2. Nguyễn Thị Vĩnh Châu và Nguyễn Văn Thu (2014). Hiện trạng chăn nuôi thỏ ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, (32): 1 - 8.
3. Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60: 481 - 492.
4. Kuleshova, L. L. and A. Lopata (2002). Vitriification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and Sterility*, 78(3): 449 - 454.
5. Singh, M., *et al.* (1995). Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, 43(6): 1047 - 1053.
6. Eo, Y., *et al.* (2019). Effect of Extenders with TCG and DMSO on the Viability of Rabbit Sperm. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 34(2): 100 - 105.
7. Curry, M. R., Redding, B. J. & Watson, P. F. (1995). Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiology*, 32(2): 175 - 181.
8. Farshad, A., *et al.* (2009). The effect of different concentrations of glycerol and DMSO on viability of Markhoz goat spermatozoa during different freezing temperatures steps. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(3): 239.
9. Polge, C., Smith, A. & Parkes, A. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666.
10. Khuong, T. T. T., Duy, N. L. K., Ngan, N. T. K., Nam, T. V. B., Tuyen, D. N. D. & Thanh, L. P. (2024). Cryopreservation of goat spermatozoa in

the Mekong delta region of Vietnam: Evaluating cryoprotectant effectiveness. *Veterinary Integrative Sciences*, 22(1): 131 – 140.

11. Tran, T. T. K., Chiem, T. N., Tran, V. B. N., Duong, N. D. T. (2023). Cryopreservation of local black rabbit spermatozoa in the Mekong delta region of Vietnam: Evaluating cryoprotectant effectiveness. *Reprod Domest Anim*, 58(8): 1139 - 1145.

12. Huang, C. (2022). Update on techniques for cryopreservation of human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 24(6): 563.

13. Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Consuegra, C., Ortiz, I., Pereira, B., Carrasco, J., Gomez-Arrones, V., Domingo, A. & Hidalgo, M. (2019). Optimization of donkey sperm vitrification: Effect of sucrose, sperm concentration, volume and package (0.25 and 0.5 mL straws). *Animal reproduction science*, 204, 31 - 38.

14. Hammerstedt, R. H., *et al.* (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of andrology*, 11(1): 73 - 88.

15. Rosato, M. P. & Iaffaldano, N. (2013). Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 79(3), 508 - 516.

16. Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Ortiz, I. & Hidalgo, M. (2019). Vitrification of stallion sperm using 0.25 ml straws: Effect of volume, concentration and carbohydrates (sucrose/trehalose/raffinose). *Animal reproduction science*, 206, 69 - 77.

17. Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Consuegra, C., Ortiz, I., Pereira, B., Carrasco, J., Gomez-Arrones, V., Domingo, A. & Hidalgo, M. (2019). Optimization of donkey sperm vitrification: Effect of sucrose, sperm concentration, volume and package (0.25 and 0.5 mL straws). *Animal reproduction science*, 204, 31 - 38.

18. Naughton, C. K., *et al.* (2003). Development of an inexpensive artificial vagina for semen collection from rabbits. *Journal of Andrology*, 24(5): 712 - 715.

19. Fumuso, F. G., Giuliano, S. M., Chaves, M. G., Neild, D. M., Miragaya, M., Gambarotta, M. & Carretero, M. I. (2018). Seminal plasma affects the survival rate and motility pattern of raw llama spermatozoa. *Animal reproduction science*, 192, 99 - 106.

20. Kanna, S. and A. Shetty (2023). Eosin Nigrosin staining technique in assessment of sperm vitality in medical laboratories—A snippet from our experience on implementing the staining, interpretation and quality control procedures. *Indian Journal of Obstetrics and Gynecology Research*, 10(2): 227 - 229.

21. Yendraliza, Y., Tania, T., Misrianti, R. & Zumarni, Z. (2019). Livability and recovery rate of Bali cattle spermatozoa during preservation in tris-based egg yolk diluent with different sucrose levels. *Jurnal Kedokteran Hewan-Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 13(2): 55 - 60.

22. Prihantoko, K., Yulastuti, F., Haniarti, H., Kusumawati, A., Widayati, D. & Budiyo, A. (2020). The acrosome integrity examination of post-thawed spermatozoa of several ongole grade bull in Indonesia using giemsa staining method. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.

23. Vasan, S. (2011). Semen analysis and sperm function tests: How much to test?. *Indian Journal of Urology*, 27(1): 41 - 48.

24. Rosato, M. P. & Iaffaldano, N. (2013). Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 79(3), 508 - 516. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.008>

25. Donnelly, E. T., *et al.* (2001). Cryopreservation of human semen and prepared sperm: Effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertility and Sterility*, 76(5): 892 - 900.

26. Pegg, D. E. (2015). Principles of cryopreservation. Cryopreservation and freeze - drying protocols. Springer New York, 3 – 19.
27. Ozimic, S., Ban-Frangez, H. & Stimpfel, M. (2023). Sperm cryopreservation today: Approaches, efficiency and pitfalls. Current issues in Molecular Biology, 45(6), 4716 – 4734. <https://doi.org/10.3390/cimb45060300>
28. Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Pereira, B., Ortiz, I., Consuegra, C., Bottrel, M., ... & Hidalgo, M. (2018). Vitrification in straws conserves motility features better than spheres in donkey sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 56 - 58.
29. Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Ortiz, I., ... & Hidalgo, M. (2019). Vitrification of large volumes of stallion sperm in comparison with spheres and conventional freezing: Effect of warming procedures and sperm selection. *Journal of equine veterinary science*, 39, 102680.
30. Rosato, M. P. & Iaffaldano, N. (2013). Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 79(3), 508 - 516.
31. Khan, I. M., Cao, Z., Liu, H., Khan, A., Rahman, S. U., Khan, M. Z., Sathanawongs, A. & Zhang, Y. (2021). Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze - thawed traits and relevance OMICS to assess sperm cryo - tolerance in farm animals. *Frontiers in veterinary science*, 8, 609180. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>
32. Prihantoko, K., Yulianti, F., Haniarti, H., Kusumawati, A., Widayati, D. & Budiyo, A. (2020). The acrosome integrity examination of post-thawed spermatozoa of several ongole grade bull in Indonesia using giemsa staining method. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.
33. Isachenko, V., Maettner, R., Petrunkina, A. M., Mallmann, P., Rahimi, G., Sterzik, K., Sanchez, R., Risopatron, J., Damjanoski, I. & Isachenko, E. (2011). Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in large (up to 0.5 mL) volume: A novel technology. *Clin Lab*, 57(9 - 10), 643 - 650.
34. Mahadevan, M. & Trounson, A. (1984). Effect of cooling, freezing and thawing rates and storage conditions on preservation of human spermatozoa. *Andrologia*, 16(1), 52 - 60.
35. Akhondzadeh, S., et al. (2023). Effects of antifreeze protein type I and glycerol in diluents on cryopreserved goat epididymal sperm. *Biopreservation and Biobanking*, 21(1): 65 - 73.
36. Nei, T. (1969). Freezing injury to aerated and non-aerated cultures of *Escherichia coli*. *Freezing and drying of microorganisms*, 3 - 16.
37. Curry, M. R., Redding, B. J. & Watson, P. F. (1995). Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiology*, 32(2), 175 - 181. <https://doi.org/10.1006/cryo.1995.1016>.
38. Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sariözkan, S., Başpınar, N., Taşpınar, M., Çoyan, K., Bilgili, A., Akalın, P. P., Büyükleblebici, S. & Aydos, S. (2010). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, 61(3), 248 - 253.
39. Agarwal, A., Makker, K. & Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *American Journal of reproductive immunology*, 59(1), 2 - 11.
40. Khan, I. M., Cao, Z., Liu, H., Khan, A., Rahman, S. U., Khan, M. Z., Sathanawongs, A. & Zhang, Y. (2021). Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze - thawed traits and relevance OMICS to assess sperm cryo - tolerance in farm animals. *Frontiers in veterinary science*, 8, 609180. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>
41. Fiser, P. & Fairfull, R. (1990). Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar

spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Molecular Reproduction and Development*, 25(2), 123 - 129.

42. Robbins, R., Saacke, R. G. & Chandler, P. (1976). Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. *Journal of Animal Science*, 42(1), 145 - 154.

43. Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Consuegra, C., Ortiz, I., Pereira, B., Carrasco, J., Gomez-Arrones, V., Domingo, A. & Hidalgo, M. (2019). Optimization of donkey sperm vitrification: Effect of sucrose, sperm concentration, volume and package (0.25 and 0.5 mL straws). *Animal reproduction science*, 204, 31 - 38.

STUDY ON PRESERVATION OF LOCAL BLACK RABBIT SPERM USING VITRIFICATION: IMPACT OF SUCROSE AND GLYCEROL ON SPERM QUALITY

Lam Nhut Anh¹, Tran Van Be Nam², Tran Thi Thanh Khuong³

¹ Student of Course 46, majoring in Biotechnology, Can Tho University

² Department of molecular biology, Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University

³ Stem Cell Laboratory, Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University

Summary

To preserve the genetic resources of indigenous black rabbit in the Mekong delta region, the vitrification method for cryopreserving black rabbit sperm was studied. The research investigated the effect of sucrose and glycerol concentrations in the preservation medium on sperm quality after vitrification. The results showed that the concentrations of sucrose and glycerol significantly affected parameters such as acrosome integrity, total motility, and sperm viability. A concentration of 0.25M sucrose and 4% glycerol yielded the best results in terms of sperm quality. This study contributes to the conservation of local genetic resources and future population restoration.

Keywords: Cryopreservation, glycerol, sucrose, rabbit sperm, vitrification.

Ngày nhận bài: 25/7/2024

Ngày chuyển phản biện: 14/8/2024

Ngày thông qua phản biện: 22/9/2024

Ngày duyệt đăng: 20/10/2024