



Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ

Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học

website: sj.ctu.edu.vn



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.029

BẢO QUẢN LẠNH TẾ BÀO TRỨNG CỦA HEO Ở GIAI ĐOẠN TRƯỞNG THÀNH BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỦY TINH HÓA TRONG CRYOTECH

Lại Đình Biên*, Lê Anh Thư và Phan Thị Mỹ Duyên

Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lại Đình Biên (email: bienld@cntp.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 14/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Vitrification of porcine-matured oocytes by the cryotech method

Từ khóa:

Bảo quản lạnh, chất bảo quản đông lạnh, cryotech, thủy tinh hóa, trứng trưởng thành

Keywords:

Cryopreservation, cryoprotectant, cryotech, matured oocyte, vitrification

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the effect of ethylene glycol (EG), dimethylsulfoxide (DMSO) concentrations and compare the effect of several cryoprotectants on the viability and morphology of pig oocytes during vitrification and post-thawing. The percentage of post-thawing development 2-4 cells embryos reported with the use 10.0% (v/v) ethylene glycol (EG) + 5.0% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO) had a significantly high survival rate, but lower than the control. Trehalose extracellular cryoprotectant also has a higher rate of the viability after freezing than sucrose (73.38%; 62.44%; 31.45% and 13.19%) and (85.32%; 75.07%; 36.61% and 7.56%) ($p < 0.05$). Prolonged pre-incubation time after thawing adversely affects the rates of embryonic cleavage and development. In conclusion, vitrification is a simple technique and easy to perform but it needs some experience to prevent any oocyte loss during vitrification and thawing processing. The use of 10.0% (v/v) ethylene glycol (EG) + 5.0% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO) and trehalose in vitrification solution could improve the percentage of post-thawing viable and embryonic development.

TÓM TẮT

Đề tài bảo quản lạnh tế bào trứng heo giai đoạn trưởng thành bằng phương pháp thủy tinh hóa trong cryotech với mục tiêu nhằm cải thiện tỷ lệ trứng sống, sự thụ tinh và phát triển phôi trong quá trình thủy tinh hóa và khảo sát sự ảnh hưởng thời gian nuôi cấy sau giải đông. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ trứng sống về hình thái và khả năng thụ tinh phát triển phôi 2 và 4 tế bào đạt được tỷ lệ cao khi sử dụng chất bảo quản ethylene glycol (EG) và dimethylsulfoxide (DMSO) với nồng độ tương ứng 10,0% (v/v) + 5,0% (v/v) (40,12%; 73,12%; 43,29% và 26,38%) có sự khác biệt thấp hơn mẫu đối chứng và trehalose tương ứng (73,38%; 62,44%; 31,45% và 13,19%) cho tỷ lệ sống qua hình thái và khả năng thụ tinh phát triển phôi có sự khác biệt với sucrose (85,32%; 75,07%; 36,61% và 7,56%) ($p < 0,05$). Kéo dài thời gian nuôi cấy trứng sau giải đông có ảnh hưởng đến sự phát triển phôi. Qua kết quả nghiên cứu cho thấy, phương pháp bảo quản thủy tinh hóa là phương pháp đơn giản và dễ thực hiện nhưng cần nhiều kinh nghiệm để ngăn chặn sự thất thoát trứng trong suốt quá trình đông lạnh và giải đông. Việc sử dụng 10,0% (v/v) ethylene glycol (EG) + 5,0% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO) và trehalose trong môi trường thủy tinh hóa có thể cải thiện tỷ lệ sống và phát triển phôi của trứng.

Trích dẫn: Lại Đình Biên, Lê Anh Thư và Phan Thị Mỹ Duyên, 2019. Bảo quản lạnh tế bào trứng của heo ở giai đoạn trưởng thành bằng phương pháp thủy tinh hóa trong cryotech. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 222-228.

1 GIỚI THIỆU

Kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm hay kỹ thuật IVF (*in vitro fertilization*) giúp trứng và tinh trùng thụ tinh bên ngoài cơ thể là bước đột phá quan trọng trong ngành y học và sinh học. Cho đến nay, thụ tinh ống nghiệm được áp dụng trên rất nhiều các loài động vật khác nhau và ở hầu hết các nước trên thế giới. Chang *et al.*, 1959 đã tạo ra chú thỏ (động vật có vú đầu tiên) bằng phương pháp thụ tinh ống nghiệm.

Trong nghiên cứu sinh lý bệnh học heo được xem là đối tượng động vật quan trọng. Kỹ thuật chuyển gene cho các hướng nghiên cứu khác: khai thác tế bào gốc phôi, cấy phôi. Xa hơn nữa, công nghệ này còn ứng dụng trong y học để cấy ghép cơ quan và nội tạng. Chính vì vậy, bảo quản lạnh trứng từ heo có thể là một biện pháp thay thế hữu hiệu trong việc duy trì sinh sản nhằm bảo tồn các kiểu gene quý hiếm. Đây là một cuộc cách mạng không chỉ kiểm soát khả năng sinh sản ở heo mà còn với sự gia tăng sử dụng heo trong ứng dụng về công nghệ Y sinh học.

Hiện nay, nguồn trứng chủ yếu được bảo quản bằng phương pháp đông lạnh, song tỷ lệ sống sau rã đông theo tổng kết của các chuyên gia trên thế giới chưa cao. Một trong những tác nhân giới hạn thành công của kỹ thuật đông lạnh trứng là xảy ra tổn thương lạnh trong suốt quá trình đông lạnh. Trứng rất dễ bị tổn thương khi tiếp xúc với nhiệt độ thấp, tinh trùng bị oxy hóa trong quá trình đông lạnh và để tránh điều này bằng việc sử dụng phương pháp thủy tinh hóa với nồng độ chất bảo quản cao (Ada *et al.*, 2013).

Hiện nay, trữ lạnh cực nhanh hay thủy tinh hóa (*vitrification*) là một trong những kỹ thuật đầu tay áp dụng phổ biến ở tất cả các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm. Phương pháp thủy tinh hóa được mô tả đầu tiên bởi Rall and Fahy (1987) được thực hiện thành công trên chuột bằng cách đưa vào dung dịch chất bảo vệ lạnh đậm đặc và làm lạnh nhanh trong nitơ lỏng; phôi sau giải đông được cấy chuyển sinh ra con chuột non bình thường. Thủy tinh hóa là phương pháp trữ lạnh dựa trên nguyên lý cơ bản là: tăng tốc độ làm lạnh hoặc tăng nồng độ chất bảo vệ đông lạnh hoặc cả hai (Ada *et al.*, 2013). Tỷ lệ sống sau trữ lạnh của phương pháp thủy tinh hóa cao hơn hạ nhiệt độ chậm (*slow freezing*) và hạn chế sự tổn thương tế bào bởi sự hình thành tinh thể đá. Vì vậy, việc lựa chọn chất bảo quản và nồng độ chất bảo quản trong phương pháp này là điều cần thiết (Vajta *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2009).

Để nâng cao tỉ lệ tế bào trứng sống sau đông, giải đông và góp phần nâng cao tỉ lệ tạo phôi trong ống

nghiệm từ tế bào trứng đông lạnh, đề tài: “Bảo quản lạnh tế bào trứng heo giai đoạn trưởng thành bằng phương pháp thủy tinh hóa trong cryotech” được thực hiện.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Tế bào trứng trưởng thành được chọc hút từ những buồng trứng của heo thu trực tiếp tại lò mổ (chợ Gò Vấp, thành phố Hồ Chí Minh). Khi mang trứng về đến phòng thí nghiệm, tiến hành cắt bỏ các phần ống dẫn trứng còn sót lại, chỉ thu nhận buồng trứng. Rửa nhanh buồng trứng 2 lần với cồn alcohol 90°, rửa 3 lần với nước muối NaCl 0,9% và 2 lần PBS⁻ (phosphate-buffered saline). Ngâm để bảo quản mẫu trong bình tam giác có chứa PBS⁻ có kháng sinh và đầy bằng giấy bạc. Bảo quản trong tủ âm ở nhiệt độ 37°C đến khi sử dụng.

Tinh trùng heo nhập ngoại giống lợn Yorkshshire từ Mỹ, được mua tại Công ty TNHH sản xuất và thương mại Thế Sang (quận Gò Vấp, Thành phố Hồ Chí Minh)

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu: tissue culture medium 199 (TCM-199) (M3769, Sigma), fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco), dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma), ethylene glycol (EG) (Sigma), dầu khoáng (Merck), phosphate-buffered saline (PBS có bổ sung kháng sinh 1% (v/v) penicillin-streptomycin).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Việc thu nhận trứng, phân loại trứng trưởng thành và chuẩn bị tinh trùng được thực hiện theo Gordon (2003).

Phân loại trứng trưởng thành

Chuyển trứng vào môi trường nuôi TCM-199. Hút trứng đã rửa từ giọt môi trường, sau đó chuyển vào giếng nuôi và tiến hành nuôi trứng ở 37°C. Sau 22-24h nuôi cấy, đánh giá sự trưởng thành của trứng bằng cách quan sát dưới kính hiển vi, trứng cho là trưởng thành khi có thể cực thứ nhất xuất hiện, tế bào chất sáng, đều, lớp cumulus giãn nở rộng.

Chuẩn bị tinh trùng

Phương pháp thường được sử dụng để hoạt hóa tinh trùng ở heo là phương pháp bơi lên (*swim-up*). Phương pháp bơi lên dựa vào khả năng bơi khác nhau của tinh trùng để tách các tinh trùng di động ra khỏi tinh dịch. Phương pháp này chỉ phù hợp cho các mẫu tinh trùng có khả năng di chuyển tốt. Tinh trùng sau khi xử lý phải đạt mật độ cần thiết để tạo vi giọt thụ tinh (Gordon, 2003).

Thụ tinh in vitro

Chuẩn bị 4 vi giọt tinh trùng trong đĩa petri Ø35 với 95µl dung dịch tinh trùng (mật độ 6×10^6 tế bào/ml), phủ dầu khoáng và giữ trong tủ ẩm 38,5°C, 5% CO₂. Chuyển trứng vào vi giọt tinh trùng; chuyển 16-20 trứng trưởng thành trong 5µl môi trường TCM-199 vào mỗi vi giọt đã chuẩn bị sẵn. Ủ những đĩa này trong 5 giờ ở điều kiện 38,5°C và 5% CO₂ (Arias *et al.*, 2015).

Nuôi trứng đã thụ tinh

Sau 5 giờ thụ tinh, trứng được kiểm tra cho kết quả thụ tinh. Giữ đĩa này trong tủ ẩm 38,5°C, 5% CO₂. Các trứng đã thụ tinh thành công tiếp tục được nuôi thông qua các đánh giá xuất hiện tiền nhân và xuất hiện thể cực thứ hai. Sau 7-10 ngày nuôi, kiểm tra sự phát triển của phôi và đánh giá.

2.3 Thiết kế thí nghiệm

2.3.1 *Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng nồng độ chất bảo quản nội bào trong đông lạnh tế bào trứng*

Thí nghiệm được tiến hành với (n=722) tế bào trứng trưởng thành, mỗi nghiệm thức lặp lại 8 lần.

Chọn trứng có tế bào chất đồng đều và có thể cực thứ nhất, chuyển vào đĩa số 1 môi trường cân bằng ES (Equilibrium) (TCM-199 + 10% FBS) trong thời gian 30 giây, chuyển trứng sang đĩa số 2 VS₁ (vitrification solution) (TCM-199 + 10% FBS + 50µgmL⁻¹ gantamycin sulfate) với A (172) (5%DMSO + 5%EG); B (216) (10% DMSO + 10% EG); C (166) (10%DMSO + 5%EG) và D (168) (5%DMSO + 10%EG) để trong vòng 45 giây. Chuyển trứng sang đĩa số 3 VS₂ (TCM-199 + 10% FBS + 1M sucrose) với A (10% DMSO + 10% EG); B (20% DMSO + 20% EG); C (20% DMSO + 10% EG) và D (10% DMSO + 20% EG) trong 25 giây. Sau đó chuyển trứng vào dụng cụ trữ (cryotech), mỗi giọt chứa khoảng 5-7 trứng, đặt lên cryotech. Bước cuối cùng là chuyển mẫu vào nitrogene lỏng và tiến hành đông lạnh. Trứng đông lạnh và được thụ tinh ngay sau giải đông. Trứng sống được nuôi cấy 18-24 giờ thụ tinh và đánh giá sự phát triển phôi (Fakhrildin *et al.*, 2013). Từ số trứng thu hồi sau giải đông tiến hành xác định tỷ lệ sống dựa trên quan sát hình thái trứng.

2.3.2 *Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng chất bảo quản ngoại bào sucrose và trehalose*

Thí nghiệm được tiến hành với (n=1.450) tế bào trứng trưởng thành, mỗi nghiệm thức lặp lại 8 lần. Với sucrose (766 trứng) và trehalose (684 trứng).

Chọn trứng có tế bào chất đồng đều và có thể cực thứ nhất, chuyển vào đĩa thụ tinh hóa với 20% DMSO + 20% EG tương ứng 1M sucrose hoặc trehalose. Sau đó chuyển trứng vào dụng cụ trữ (cryotech), mỗi giọt chứa khoảng 5-7 trứng, đặt lên cryotech. Bước cuối cùng là chuyển mẫu vào nitro lỏng và tiến hành đông lạnh. Trứng đông lạnh và được thụ tinh ngay sau giải đông. Trứng sống được nuôi cấy 18-24 giờ thụ tinh và đánh giá sự phát triển phôi.

2.3.3 *Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng thời gian nuôi cấy và sự phát triển phôi từ tế bào trứng sau giải đông*

Thí nghiệm được tiến hành với (n=696) tế bào trứng trưởng thành, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

Chọn trứng có tế bào chất đồng đều và có thể cực thứ nhất, tiến hành trữ lạnh trên cryotech với 20% DMSO + 20% EG tương ứng 1M sucrose hoặc trehalose. Sau giải đông, trứng được chia 3 nhóm xử lý khi thụ tinh: (1) thụ tinh ngay sau giải đông; (2) nuôi cấy trứng sau giải đông 2 giờ trước thụ tinh; (3) nuôi cấy trứng sau giải đông 4 giờ trước thụ tinh. Mẫu đối chứng, trứng tươi nuôi trưởng thành 24 giờ trong môi trường nuôi cấy IVF (thụ tinh trong ống nghiệm). Quá trình IVF, sự phân chia và phát triển của phôi được đánh giá và so sánh với các nhóm khảo sát (Cean *et al.*, 2013).

2.3.4 *Xử lý số liệu*

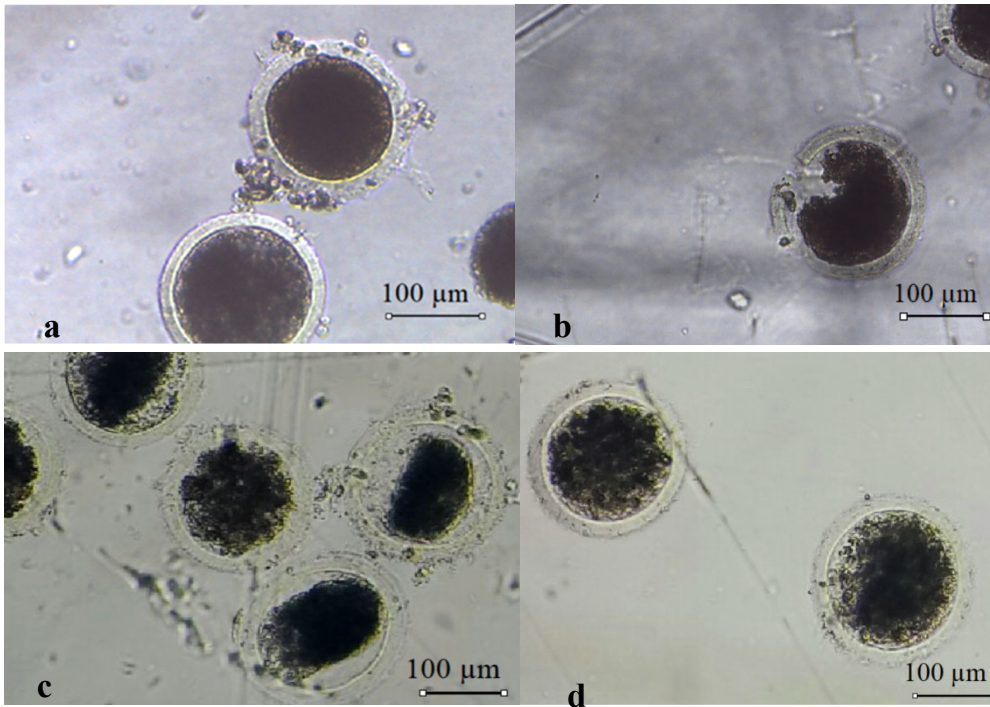
Số liệu thu được xử lý bằng phần mềm Statgraphics Centurion 16, tính toán thống kê sai số chuẩn và độ khác biệt có ý nghĩa nhỏ nhất (LSD-least significant difference) với độ tin cậy 95% bằng phương pháp phân tích phương sai ANOVA.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 *Ảnh hưởng nồng độ chất bảo quản nội bào trong đông lạnh tế bào trứng*

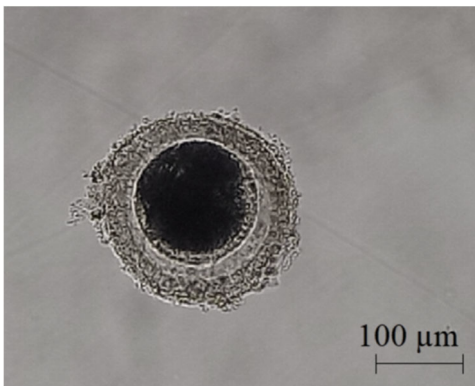
Tỷ lệ sống

Từ số trứng thu hồi sau giải đông tiến hành xác định tỷ lệ sống dựa trên quan sát hình thái trứng. Tỷ lệ sống của trứng có sự khác biệt giữa các nhóm ($p < 0,05$), nhóm B và C có tỷ lệ sống cao hơn nhóm A và D, khả năng sống không khác biệt ($p > 0,05$) so với trứng tươi (Bảng 1)



Hình 1: Hình dạng trứng sau giải đông

- a) Trứng sống; b) Trứng chết do vỡ màng;
- c) Trứng chết do bị teo nhân; d) Trứng phân mảnh

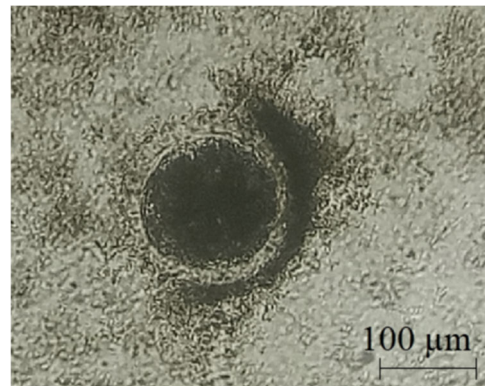


Hình 2: Phôi 2 tế bào

Tỷ lệ thụ tinh và tạo phôi

Ở nhóm nghiệm thức A và C tỷ lệ thụ tinh và tạo phôi 2 tế bào thấp hơn đáng kể so với nhóm B và D (Bảng 1 và Bảng 2) và thấp hơn nhiều so với mẫu trứng tươi (79,98%; 53,87%), ở nhóm D tỷ lệ thụ tinh và tạo phôi so với mẫu nhóm trứng tươi không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) ($0,5829 > 0,05$). Tỷ lệ phát triển phôi 4 tế bào ở nhóm D (26,38%) có sự khác biệt vượt trội so với các nhóm A, B, C ($p < 0,05$) ($0,00 < 0,05$) và không khác so với mẫu trứng tươi (28,76 %) ($p < 0,05$) ($0,603 > 0,05$).

Theo công bố của Liu *et al.* (2008), nghiên cứu của nhóm tác giả sử dụng công cụ thủy tinh hóa là Cryotop và OPS với việc sử dụng loại môi trường



Hình 3: Phôi 4 tế bào

thủy tinh hóa tương ứng (OPS:10% DMSO+ 10% EG và 20% DMSO+ 20% EG+ 0,6M sucrose); (Cryotop: 7,5% DMSO + 7,5% EG và 15% DMSO + 15%EG + 0,5M sucrose) cho tỷ lệ sống và tỷ lệ phân chia từ các tế bào trứng heo trưởng thành đông lạnh là 50,20% và 11,50% thấp hơn kết quả nghiên cứu này. Bảo quản lạnh tế bào trứng bằng phương pháp thủy tinh hóa, công cụ trữ lạnh là cryotech đã giảm những tổn thương ảnh hưởng đến chất lượng đông lạnh và cải thiện tỷ lệ thụ tinh và phát triển phôi. Phương pháp thủy tinh hóa đã khắc phục được nhược điểm của những phương pháp trước như đông lạnh chậm về sự hình thành tinh thể đá và thời gian đông lạnh rút ngắn hơn. Cryotech là công cụ cải tiến, ưu điểm về cấu trúc và diện tích tiếp xúc, cryotech

đã nâng cao tỷ lệ sống của trứng và tỷ lệ thụ tinh. Gajda *et al.* (2015), nghiên cứu đã khảo sát sự ảnh hưởng môi trường thủy tinh hóa qua sự phát triển phôi tại môi trường có hoặc không huyết thanh (EB: 10%EG + 10%DMSO và Vsa: 15% DMSO + 15% EG + 0,5M sucrose + 20% FCS); và môi trường thủy tinh hóa không huyết thanh (EB: 10% EG + 10% DMSO và Vsb: 15% DMSO + 15% EG + 0,5M sucrose) (VS-vitrification solution-môi trường thủy

tinh hóa) cho tỷ lệ phát triển của trứng sau giải đông với tỷ lệ sống và tỷ lệ thụ tinh của trứng heo giai đoạn MII ở môi trường thủy tinh hóa đạt (55,60%; 33,40%(Vsa)), (57,40%; 20,00% (Vsb)), kết quả thấp hơn tỷ lệ thụ tinh của nhóm nghiên cứu. Kết quả này cho rằng, môi trường thủy tinh hóa trứng cần huyết thanh vì khi giải đông trứng cần dinh dưỡng để phục hồi hoàn toàn.

Bảng 1 : Kết quả khảo sát ảnh hưởng nồng độ chất bảo quản nội bào

Nghiệm thức	Trứng sống (%)	Trứng thụ tinh (%)	Phôi 2 tế bào (%)	Phôi 4 tế bào (%)
A	48,41 ± 2,74 ^a	47,49 ± 3,67 ^a	24,37 ± 1,68 ^a	10,36 ± 1,80 ^a
B	77,10 ± 2,37 ^b	62,28 ± 2,98 ^b	39,77 ± 2,15 ^b	6,86 ± 1,22 ^a
C	67,35 ± 6,18 ^b	47,84 ± 4,56 ^a	24,23 ± 4,08 ^a	9,51 ± 1,76 ^a
D	40,12 ± 6,21 ^a	73,72 ± 6,32 ^{bc}	43,29 ± 4,63 ^{bc}	26,38 ± 4,10 ^b
Trứng tươi	78,62 ± 8,67 ^b	79,98 ± 4,70 ^c	53,87 ± 1,94 ^c	28,76 ± 2,28 ^b

^{a,b,c} Các số liệu mang chữ số mũ giống nhau trên cùng một cột là không khác biệt ở mức ý nghĩa $p < 0,05$

3.2 Ảnh hưởng chất bảo quản ngoại bào sucrose và trehalose

Tỷ lệ sống và thụ tinh

Tỷ lệ trứng thu hồi lần lượt ở nghiệm thức sucrose và trehalose là (97,75%; 95,8%) (Bảng 2). Tỷ lệ trứng sống với việc xử lý bằng trehalose thấp hơn so với sucrose và không có sự khác biệt so với mẫu trứng đối chứng (78,62%) (Bảng 2); với tỷ lệ trứng thụ tinh ở hai thí nghiệm không có sự khác biệt ($p > 0,05$) giữa sucrose và trehalose (75,07%; 62,44%) và không có sự khác biệt ($p > 0,05$) đối với mẫu đối chứng (79,98%). Với nghiên cứu của Fakhridin *et al.*, 2013 khi thực hiện khảo sát nồng độ chất bảo quản ngoại bào trên bò bằng phương pháp thủy tinh hóa ở nồng độ 0,25M và 0,5M lần lượt là 76,02% và 92,68% (sucrose); 76,5% và 91,01% (trehalose) cho trứng có hình thái bình thường sau rã đông thì với kết quả nghiên cứu đạt được có tỷ lệ sống tương đương và tỷ lệ sống của trứng không có sự khác biệt giữa các nhóm ($p > 0,05$) (Bảng 2).

Tỷ lệ trứng phát triển phôi

Tỷ lệ phân chia tạo phôi ở lô (nghiệm thức) sử dụng chất bảo quản ngoại bào sucrose và trehalose (36,61%; 31,4%) không có sự khác biệt nhưng lại thấp hơn rất nhiều so với mẫu đối chứng (53,87%). Sự hình thành phôi 4-8 tế bào và tạo phôi đầu thì ở lô trehalose đạt tỷ lệ cao hơn đáng kể

Bảng 2: Kết quả khảo sát chất bảo quản ngoại bào

Nghiệm thức	Tỷ lệ trứng sống (%)	Tỷ lệ trứng thụ tinh (%)	Tỷ lệ phôi 2 tế bào (%)	Tỷ lệ phôi 4-8 tế bào (%)
Sucrose	85,32 ± 3,73 ^a	75,07 ± 5,47 ^a	36,61 ± 2,43 ^b	7,86 ± 0,53 ^c
Trehalose	73,38 ± 3,08 ^b	62,44 ± 5,67 ^a	31,45 ± 3,87 ^b	13,19 ± 1,47 ^b
Đối chứng	78,62 ± 8,67 ^{ab}	79,98 ± 4,70 ^a	53,87 ± 1,94 ^a	28,76 ± 2,28 ^a

^{a,b,c} Các số liệu mang chữ số mũ giống nhau trên cùng một cột là không khác biệt ở mức ý nghĩa $p < 0,05$

(13,19%; 6,63 %) so với nhóm sucrose (7,86%; 0,29 %), so với nhóm mẫu đối chứng được thực hiện trên trứng tươi (28,76 %; 18,41 %). Dựa vào kết quả (Bảng 2) có thể thấy với tỷ lệ sống, tỷ lệ thụ tinh với phân chia tế bào ở giai đoạn của cả hai chất sucrose và trehalose không có sự khác biệt nhau, đến giai đoạn hình thành phôi 4 thì ở trehalose cao hơn đáng kể so với sucrose; có sự khác biệt đáng kể so với mẫu trứng tươi không đông lạnh.

Ở nghiên cứu của Somfai *et al.*, (2013), nhóm tác giả thực hiện phương pháp thủy tinh hóa tế bào trứng ở giai đoạn túi mầm (chưa trưởng thành) kết quả trứng với tỷ lệ thụ tinh đạt 54,1% (sucrose) thấp hơn ở nghiên cứu đạt 75,07% (Bảng 2). Trứng giai đoạn túi mầm lớp phức hợp cumulus khá dày dẫn đến khả năng thâm thấu giữa các chất bảo quản bị hạn chế, về dinh dưỡng bên trong tế bào túi mầm không đủ nuôi dưỡng tế bào phục hồi sau đông lạnh, dẫn đến tỷ lệ thụ tinh chưa cho kết quả cao. Một nghiên cứu khác của nhóm Zhang *et al.*, 2017 cũng sử dụng phương pháp thủy tinh hóa nhằm khảo sát sự ảnh hưởng của sucrose và trehalose qua các giai đoạn phát triển của trứng sau đông lạnh với tỷ lệ thụ tinh phân chia tế bào đạt 58,5% (sucrose) và 54,9% (trehalose) và tạo blastocysts chỉ xảy ra ở nhóm trehalose (6,7%). Với kết quả nghiên cứu hiện tại, tỷ lệ phân chia phôi ở nhóm trehalose cũng cho tỷ lệ cao hơn ở nhóm sucrose, về tính chất sinh học trehalose có khả năng khử nước nhanh và triệt để hơn.

3.3 Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy và sự phát triển phôi từ tế bào trứng sau giải đông

Qua Bảng 3 thể hiện tỷ lệ sống sau giải đông qua các khoảng thời gian nuôi cấy trước thụ tinh ở 0 giờ (89,14%), 2 giờ (87,63%), 4 giờ (88,69%). Nhìn chung, tỷ lệ sống sau giải đông đạt từ 87-89%, tương

đối ổn định ở những lần thí nghiệm của cả 3 khoảng thời gian khảo sát. Tỷ lệ sống của trứng sau đông lạnh không có sự khác biệt ($p > 0,05$) giữa nhóm 0 giờ, 2 giờ và 4 giờ khi thực hiện thụ tinh hóa trứng heo theo tỷ lệ (VS1) 5% DMSO + 10 EG và (VS2) 10% DMSO + 20% EG + 1 M trehalose.

Bảng 3: Kết quả thời gian nuôi cấy ảnh hưởng đến sự thụ tinh và phát triển phôi

Thời gian (h)	Tỷ lệ trứng sống (%)	Tỷ lệ trứng thụ tinh (%)	Tỷ lệ trứng phân chia (%)	Tỷ lệ phôi 4 tế bào (%)
Đối chứng	100,00±0,00 ^a	69,45±1,87 ^a	53,87±1,94 ^a	28,76±2,28 ^a
0	89,14±0,52 ^b	53,56±2,40 ^{bc}	33,51±0,89 ^c	8,26±0,38 ^b
2	87,63±1,92 ^b	56,17±0,76 ^b	39,44±1,78 ^b	7,40±0,39 ^b
4	88,69±1,04 ^b	49,27±1,05 ^c	31,20±0,47 ^c	10,34±0,71 ^b

^{a,b,c} Các số liệu mang chữ số mũ giống nhau trên cùng một cột là không khác biệt ở mức ý nghĩa $p < 0,05$

Tỷ lệ trứng thụ tinh được nuôi qua các mốc thời gian khảo sát thì có sự khác biệt ($p < 0,05$) giữa các nhóm nuôi cấy 0 giờ, 2 giờ và 4 giờ, với tỷ lệ lần lượt là (53,56%; 56,17%; 49,27%). Tỷ lệ trứng thụ tinh ở nhóm nuôi cấy 4 giờ (49,27%) khá thấp so với mẫu đối chứng (57,11%) và hai nhóm xử lý 0 giờ, 2 giờ (53,56%; 56,17%).

Kết quả về tỷ lệ phân chia của trứng thụ tinh tại giai đoạn hợp tử và tỷ lệ phân chia phôi 2 tế bào cho thấy, không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) giữa nhóm 0 giờ và 4 giờ (33,51%; 31,20%), có sự khác biệt ($p < 0,05$) giữa các nhóm khi so sánh với nhóm nuôi cấy 2h (39,44%). Tỷ lệ phân chia phôi 4 tế bào ở thời gian nuôi cấy 4 giờ cho tỷ lệ phân chia phôi cao nhất. Thời gian nuôi cấy sau rã đông giúp tế bào trứng giảm bớt độc tính còn lại của chất bảo quản và sự ổn định về cấu trúc nhiễm sắc thể.

Sự phát triển của phôi cho thấy, tỷ lệ phôi 4 không có sự khác biệt ($P < 0,05$) giữa các nhóm nuôi cấy 0 h (8,26 %), 2 h (7,40%) và 4 h (10,34%). Tuy nhiên, tỷ lệ phôi 4 tế bào của các nhóm khảo sát thấp hơn nhóm đối chứng (28,75%). Theo kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả Chian *et al.*, (2004), tỉ lệ tế bào phân chia theo từng mốc thời gian nuôi cấy sau rã đông 0h; 2h; 4h lần lượt là 71,90%;70,10% và 51,60% cao hơn nhiều so với kết quả tỷ lệ phân chia phôi ở nghiên cứu hiện tại.

4 KẾT LUẬN

Xác định được nồng độ chất bảo quản nội bào tối ưu, với nồng độ môi trường thủy tinh hóa 10% DMSO + 5% EG, VS2: 20% DMSO + 10% EG + 1 M sucrose, cho tỷ lệ sống, tỷ lệ thụ tinh và phát triển phôi phát triển 2-4 tế bào cao.

Chất bảo quản ngoại bào tối ưu, khi thực hiện đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa trứng heo giai đoạn trưởng thành, cho tỷ lệ sống, tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ phát triển phôi từ 2-4 tế bào cao là

trehalose ở môi trường thủy tinh hóa VS2. Thời gian nuôi cấy sau rã đông không ảnh hưởng đến hiệu quả thụ tinh.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn công ty TNHH giống Thế Sang, lò mổ Gò Vấp đã cung cấp mẫu tinh trùng và trứng heo. Xin chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm Công nghệ Tế bào, khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TAI LIỆU THAM KHẢO

- Ada Cean, Ivan Alexandra, Ilie Daniela. et al., 2013. The cytotoxic effect of cryoprotective agents on invitro fertilization rate of mammalian oocytes. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, 46(2): 98-103.
- Appeltant, R., Somfai, T., Santos, E. C; Dang-Nguyen, T. Q., Nagai, T., & Kikuchi, K., 2017. Effects of vitrification of cumulus-enclosed porcine oocytes at the germinal vesicle stage on cumulus expansion, nuclear progression and cytoplasmic maturation. Reproduction, Fertility and Development, 29 (12): 2419-2429.
- Arias, M. E., Risopatrón, J., Sánchez, R. et al., 2015. Intracytoplasmic sperm injection affects embryo developmental potential and gene expression in cattle. Reproductive biology, 15(1): 34-41.
- Cean, A., Alexandra, I. and Daniela, I., 2013. The cytotoxic effect of cryoprotective agenets on in vitro fertilization rates of mammalian oocytes. Scientific Papers in Animal Science and Biotechnologies, 46: 98-103.
- Chang, M. C., 1959. Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature, 184(4684): 466-467.
- Chian., R. C. and Kuwayama., 2004. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. Journal of Reproduction and Development, 50(6): 685-696.

- Fakhrildin, M. B. M. and Al-Moussawi, R. H., 2013. Effect of two types and two concentrations of cryoprotectants on ovine oocytes morphology and viability post-vitrification. *Iraqi Journal of Embryos and Infertility Researches*, 3(6): 32-37.
- Gajda, B., Skrzypczak, Z., Ska, M. et al., 2015. Successful production of piglets derived from mature oocytes vitrified using ops method. *Cryoletters*, 36: 8-18.
- Gordon, I.R., 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*, Second Edition. Cambridge MA and CABI, USA, 537 pages.
- Kuwayama, M., 2007. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 67(1): 73-80.
- Lin, L., Kragh, P. M., Purup, S. et al., 2009. Osmotic stress induced by sodium chloride, sucrose or trehalose improves cryotolerance and developmental competence of porcine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(2): 338-344.
- Rall, W. F., and Fahy, G. M., 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313(6003): 573-575.
- Somfai, T., Nakai, M., Tanihara, F. et al., 2013. Comparison of ethylene glycol and propylene glycol for the vitrification of immature porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 59(4): 378-384.
- Vajta, G and Kuwayama, M., 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65(1): 236-244.
- Zhang, Z., Wang, T and Hao, Y. et al., 2017. Effects of trehalose vitrification and artificial oocyte activation on the development competence of human immature oocytes. *Cryobiology*, 74: 43-49.