



DOI:10.22144/ctujos.2024.371

ẢNH HƯỞNG CỦA CARBOHYDRATE ĐẾN CHẤT LƯỢNG TINH TRÙNG DÊ ĐƯỢC BẢO QUẢN TRONG NITƠ LỎNG

Trần Thị Thanh Khuông^{1*}, Nguyễn Nhật Tân¹, Nguyễn Thị Thùy Dương² và Hồ Thiệu Khôi³

¹Phòng thí nghiệm Tế bào gốc, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

²Sinh viên Khóa 46 ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

³Khoa Chăn nuôi, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): tttkhuong@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 13/06/2024

Sửa bài (Revised): 08/07/2024

Duyệt đăng (Accepted): 23/08/2024

Title: Effects of Different Carbohydrates on the Cryopreservation Quality of Goat Spermatozoa

Author(s): Tran Thi Thanh Khuong^{1*}, Nguyen Nhat Tan¹, Nguyen Thi Thuy Duong² and Ho Thieu Khoi³

Affiliation(s): Can Tho University

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm xác định ảnh hưởng của ba loại carbohydrate khác nhau là glucose, fructose và sucrose trong môi trường bảo quản lạnh đến chất lượng tinh trùng dê được bảo quản trong Nitơ lỏng. Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của 6 loại môi trường bảo quản với nồng độ carbohydrate khác nhau. Mẫu tinh dịch được thu nhận và pha loãng với môi trường và bảo quản trong nitơ lỏng (-196°C). Sau 72 giờ bảo quản, mẫu được giải đông và kiểm tra chất lượng. Kết quả cho thấy, môi trường bảo quản với nồng độ glucose 69 mM giúp tinh trùng dê giữ được chất lượng tối ưu nhất. Cụ thể, tỷ lệ di động tổng số, tỷ lệ di động tiến tới, tỷ lệ sống, tỷ lệ toàn vẹn màng tế bào, tỷ lệ kháng oxy hóa và tỷ lệ nguyên vẹn acrosome của tinh trùng lần lượt là 67%, 49,79%, 73,25%, 52,88%, 28,06% và 97,29%. Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường bổ sung glucose 69 mM là sự lựa chọn tối ưu trong bảo quản lạnh tinh trùng dê.

Từ khóa: Bảo quản lạnh, dê, carbohydrate, tinh trùng

ABSTRACT

The objective of the study was to determine the effects of three different carbohydrates: glucose, fructose and sucrose in the cold storage environment on the quality of goat sperm stored in liquid nitrogen. The experiment investigated the effects of 6 types of preservation environments with different carbohydrate concentrations. Semen samples were collected and diluted with medium and stored in liquid nitrogen (-196°C). After 72 hours of storage, the sample was thawed and checked for quality. The results showed that the preservation environment with a glucose concentration of 69 mM has goats' sperm maintain the optimal quality. Specifically, the total motility rate, progressive motility rate, viability rate, cell membrane integrity rate, antioxidant rate and acrosome integrity rate of sperm are 67%, 49.79%, 73.25%, 52.88%, 28.06% and 97.29%. Research results showed that 69 mM glucose supplemented medium is the optimal choice for cryopreservation of goat sperm.

Keywords: Cryopreservation, goats, carbohydrate, sperm

1. GIỚI THIỆU

Bảo quản đông lạnh được áp dụng rộng rãi, giúp lưu trữ tinh dịch trong một khoảng thời gian dài. Tinh trùng sau khi rã đông được sử dụng để thụ tinh nhân tạo nhằm nâng cao tỷ lệ đậu thai trên con cái, chọn lọc giống dê chất lượng để dê con có được các đặc tính tốt từ dê bố mẹ, tránh được các bệnh lây nhiễm khi giao phối, giải quyết được nhu cầu thiếu dê đực vào mùa sinh sản của các trang trại có số lượng dê cái áp đảo. Kể từ thí nghiệm đông lạnh đầu tiên thành công, các phương pháp đông lạnh được tiếp tục nghiên cứu và phát triển đến ngày nay, nhưng quá trình bảo quản tinh dịch ở nhiệt độ rất thấp đã gây tổn hại đến tinh trùng. Nhiều chất được thêm vào môi trường bảo quản lạnh tinh dịch để tăng khả năng sống và di động của tinh trùng sau khi rã đông như glycerol, lòng đỏ trứng gà, vitamin,... Bên cạnh đó, các carbohydrate trong môi trường bảo quản được xem như một chất nền quan trọng cung cấp năng lượng cho tinh trùng và duy trì áp suất thẩm thấu của môi trường pha loãng (Yildiz et al., 2000).

Đường có thể kém hơn glycerol trong khả năng bảo vệ lạnh của tinh trùng, nhưng việc kết hợp đường và glycerol trong chất pha loãng đông lạnh giúp cải thiện khả năng phục hồi sau rã đông (Salamon & Lightfoot, 1969; Colas, 1975). Theo nghiên cứu, hàm lượng đường thấp được đưa vào chất pha loãng có gốc Tris làm chất nền dễ chuyển hóa cho tinh trùng (Mann, 1964). Trong môi trường Tris nhược trương, việc tăng nồng độ đường cải thiện khả năng phục hồi tế bào tinh trùng sau khi đông lạnh và tan băng (Salamon & Visser, 1972). Gần đây, môi trường đông lạnh chứa nồng độ đường cao mang lại khả năng bảo vệ lạnh tốt hơn glycerol hoặc dimethylsulphoxide chứa chất pha loãng đối với tinh trùng chuột (Tada et al., 1990), tuy nhiên có rất ít nghiên cứu xác định nguồn và nồng độ carbohydrate có trong môi trường bảo quản lạnh nhằm cải thiện chất lượng tinh trùng dê sau rã đông.

Hơn nữa, bảo quản lạnh tinh dịch dê rất khó khăn vì nó có nồng độ chất béo cao, có thể tương tác với các thành phần phổ biến nhất của chất pha loãng bảo quản lạnh, nên tinh dịch dê cần có sự chú ý đặc biệt để tối ưu hóa các thông số tinh trùng sau rã đông (Küçük et al., 2014). Việc tìm ra môi trường có loại carbohydrate tốt nhất với nồng độ tối ưu không chỉ cung cấp năng lượng tối đa cho hoạt động trao đổi chất để duy trì sự sống khi tiến hành đông lạnh trong nitơ lỏng, mà còn giúp bảo vệ và tăng khả năng sống sót cũng như di động của tinh trùng sau rã đông. Từ

những vấn đề trên, mục tiêu của nghiên cứu được xác định là khảo sát ảnh hưởng của carbohydrate đến chất lượng tinh trùng dê được bảo quản trong nitơ lỏng.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất

Hóa chất sử dụng để tạo môi trường gồm: Citric acid (Sigma, Hoa Kỳ), fructose (Sigma, Hoa Kỳ), gentamicin 40 mg/ml (Vidipha, Việt Nam), glucose (Sigma, Hoa Kỳ), sucrose (Merck, Đức), Tris-hydroxymethyl aminomethane (Biotech, Việt Nam).

Các hóa chất khác được dùng trong thí nghiệm gồm Eosin (Himedia, Ấn Độ), glycerol (Fisher Scientific, Hoa Kỳ), NaHCO₃ (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ), NaOH (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ), Nigrosin (Himedia, Ấn Độ) và sodium citrate (Biotech, Việt Nam).

2.2. Động vật thí nghiệm

Động vật gồm 2 con dê Boer đực, 2-3 năm tuổi, có khối lượng trung bình 42-45 kg được sử dụng để tiến hành thí nghiệm. Khẩu phần ăn của dê được thiết kế theo tiêu chuẩn để đảm bảo đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng của dê đực trưởng thành (NRC, 2007). Dê được cho ăn 3 lần/ngày theo khẩu phần. Nước uống được chuẩn bị đầy đủ để dê không bị khát. Khu chuồng trại được xây dựng cao ráo, thoáng mát, có mái che, có màng chống muỗi. Dê đã được tiêm phòng đầy đủ các bệnh truyền nhiễm phổ biến và ký sinh trùng theo tiêu chuẩn và được theo dõi sức khỏe định kỳ.

2.3. Thiết kế thí nghiệm

Mẫu tinh dịch được thu nhận từ 2 con dê đực khỏe mạnh, tinh được lấy 2 lần/ tuần, tại trại thí nghiệm động vật thuộc phòng thí nghiệm Tế bào gốc, Trường Đại học Cần Thơ. Sau đó, mẫu tinh dịch được đánh giá chất lượng trước khi bảo quản. Những mẫu đạt chất lượng sẽ được tiến hành pha loãng với môi trường bảo quản theo tỉ lệ 1:10. Sau đó, tinh trùng đã được pha loãng được pha theo tỉ lệ 1:1 với một trong 6 loại môi trường đông lạnh có các nồng độ và carbohydrate khác nhau: TCG1, TCG2, TCF1, TCF2, TCS1, TCS2 được bổ sung 8% glycerol và 15% lòng đỏ trứng. Mẫu được chuyển vào ống trữ tinh, ổn định và làm lạnh mẫu, sau đó mẫu được trữ trong nitơ lỏng (-196°C). Sau 72 giờ bảo quản, mẫu được rã đông và kiểm tra chất lượng qua các chỉ tiêu: tổng di động, di động tiến tới, tỷ lệ sống, tỷ lệ toàn vẹn màng, tỷ lệ kháng oxy hóa và tỷ lệ toàn vẹn acrosome.

Bảng 1. Thành phần có trong 100 mL môi trường được sử dụng để bảo quản đông lạnh tinh dịch dê

Tên môi trường	Tris- hydroxymethyl aminomethane	Citric acid	Carbohydrate	Gentamycin
TCG1	250mM	88mM	Glucose: 47mM	200µL
TCG2	250mM	88mM	Glucose: 69mM	200µL
TCF1	250mM	88mM	Fructose: 47mM	200µL
TCF2	250mM	88mM	Fructose: 56mM	200µL
TCS1	250mM	88mM	Sucrose: 47mM	200µL
TCS2	250mM	88mM	Sucrose: 56mM	200µL

2.4. Đánh giá độ di động tinh trùng

Mẫu tinh dịch được ủ ở nhiệt độ 37°C, tối thiểu 10 phút để nhiệt độ ổn định. Hút 10 µL tinh dịch cho trên lame kính và đặt lamén. Chờ mẫu ổn định (khoảng 60 giây), quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại 40×.

Độ di động của tinh trùng đánh giá theo WHO (2010) được chia thành 3 loại: di động tiến tới (PR), di động không tiến tới (NP) và không di động (IM). Kính hiển vi Eclipse Si (Nikon) độ phóng đại 40× được sử dụng để quan sát độ di động của tinh trùng. Bắt đầu đánh giá nhanh một vi trường bất kỳ, không đợi tinh trùng bơi vào vùng đếm. Đánh giá độ di động của tất cả các tinh trùng (PR, NP, IM) (Fumuso et al., 2018).

2.5. Đánh giá tỷ lệ sống của tinh trùng

Tỷ lệ sống của tinh trùng được đánh giá theo phương pháp Eosin-Nigrosin (Agha-Rahimi et al., 2014). Quan sát dưới kính hiển vi Eclipse Si (Nikon) độ phóng đại 40× và đánh giá ít nhất 100 tinh trùng. Tính tỷ lệ tinh trùng sống sót dựa trên tổng số tinh trùng đếm được.

2.6. Đánh giá tính toàn vẹn màng của tinh trùng

Tính toàn vẹn màng tế bào tinh trùng được xác định dựa trên thử nghiệm sưng tấy giảm thẩm thấu (HOS test) (Ramu & Jeyendran, 2013). Hút 20 µL dung dịch tinh trùng trộn với 80 µL dung dịch Hos, ủ 37°C trong 30 phút. Hút 10 µL dung dịch mẫu đã trộn lên lam kính và quan sát dưới kính hiển vi Eclipse Si (Nikon) độ phóng đại 40×. Tinh trùng còn nguyên vẹn màng có biểu hiện sưng tấy ở đuôi, trong khi đó với màng bị hư hỏng không biểu hiện sưng tấy.

2.7. Đánh giá acrosome của tinh trùng

Tính toàn vẹn acrosome của tinh trùng được phân tích bằng phương pháp nhuộm Giemsa (Prihantoko et al., 2020) và sử dụng kính hiển vi Eclipse Si (Nikon) độ phóng đại 40× để quan sát. Tinh trùng có acrosome bình thường thì vùng cực

đầu sẽ bắt màu thuốc nhuộm Giemsa (màu tím), ngược lại tinh trùng có acrosome không bình thường thì vùng cực đầu sẽ không bắt màu thuốc nhuộm. Tỷ lệ tinh trùng toàn vẹn acrosome được xác định bằng phương pháp đếm số tinh trùng bắt màu thuốc nhuộm trên tổng số tinh trùng đếm được. Tính tỷ lệ tinh trùng toàn vẹn acrosome được xác định bằng phương pháp đếm số tinh trùng bắt màu thuốc nhuộm trên tổng số tinh trùng đếm được.

2.8. Đánh giá khả năng kháng oxy hóa của tinh trùng

Hoạt động loại bỏ gốc tự do bằng phương pháp khử màu ABTS+ được xác định theo phương pháp của Nenadis et al. (2004). Dung dịch ABTS+ mất dần màu xanh tương ứng với sự có mặt của chất kháng oxy hóa. Giá trị OD càng thấp thì khả năng kháng oxy hóa càng mạnh. Thử nghiệm được xác định bằng cách hút 10 µL mẫu tinh trùng cho vào 990 µL dung dịch gốc tự do ABTS+ và ủ tối 6 phút ở nhiệt độ phòng (28 – 30°C). Đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm.

2.9. Phân tích thống kê

Số liệu được ghi nhận bằng phần mềm Excel (2016). Phân tích phương sai theo mô hình tuyến tính tổng quát 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.4.3.1. Các kết quả được trình bày trung bình ± sai số chuẩn (SE). Ý nghĩa thống kê được đặt ở mức ý nghĩa $p < 0,05$ cho thấy mức độ đáng tin cậy cao đối với kết quả thu được. Hình ảnh biểu đồ được vẽ bằng phần mềm R.4.3.1 và phần mềm Excel.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

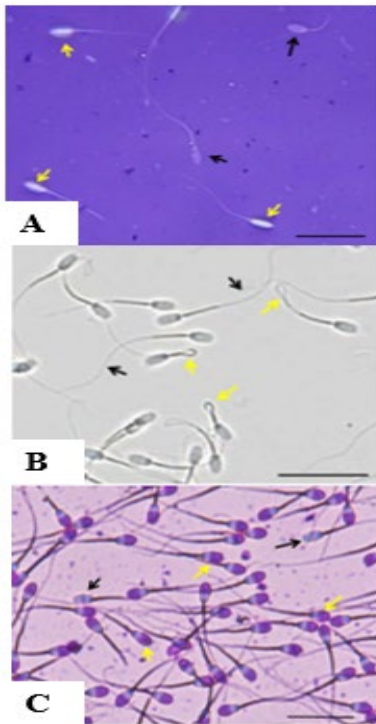
3.1. Chất lượng tinh dịch tươi

Kết quả trình bày trong Bảng 2 cho thấy, chỉ tiêu màu sắc mẫu thí nghiệm có màu trắng đục đặc trưng hơi ngả vàng của tinh trùng dê. Thể tích mẫu trung bình là 0,64 mL. Mẫu có pH trung bình là 6,96 và có nồng độ trung bình là $2,89 \times 10^9$ tinh trùng/mL tinh dịch. Kết quả còn cho thấy, tỷ lệ di động tổng số của tinh trùng là 82,44%, tỷ lệ sống và tỷ lệ di

động tiến tới của tinh trùng lần lượt là 88,5% và 70,94%. Các chỉ tiêu của mẫu đều đạt tiêu chuẩn về các giá trị màu sắc, thể tích, pH, nồng độ tinh dịch, di động tổng số, di động tiến tới và tỷ lệ sống của tinh trùng đê theo chỉ tiêu khảo sát (Duy et al., 2024). Mẫu có giá trị đạt chuẩn và phù hợp với chỉ tiêu khảo sát của thí nghiệm.

Bảng 2. Kết quả đánh giá chất lượng tinh tươi (Trung bình ± Sai số chuẩn, N = 8)

Chỉ tiêu đánh giá	Kết quả
Màu sắc	Trắng đục
Thể tích (mL)	0,64 ± 0,02
pH	6,96 ± 0,02
Tỷ lệ di động tổng số (%)	82,44 ± 0,53
Tỷ lệ di động tiến tới (%)	70,94 ± 0,42
Tỷ lệ sống (%)	88,5 ± 0,49



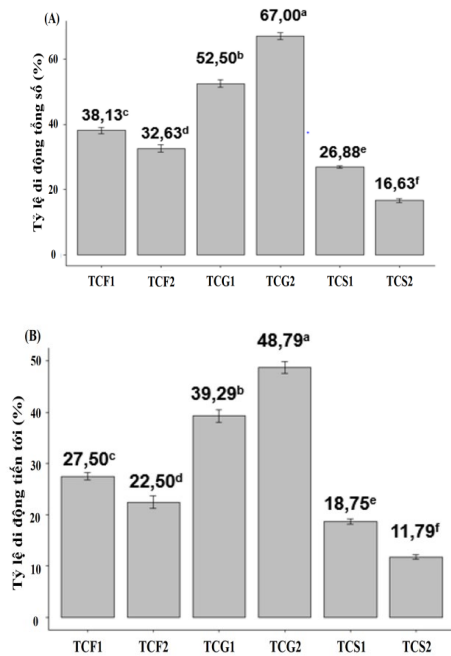
Hình 1. Kết quả kiểm tra chất lượng tinh trùng

A - Tinh trùng được nhuộm Eosin-Nigrosin. Tinh trùng sống không bắt màu thuốc nhuộm (mũi tên vàng), 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 vàng), 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 thể hiện phản cực đầu bắt màu thuốc nhuộm (mũi tên vàng), tinh trùng có acrosome bất thường thể hiện phản cực đầu không bắt màu thuốc nhuộm (mũi tên đen). Thanh tỷ lệ = 50µm.

3.2. Ảnh hưởng của các carbohydrate đến chất lượng tinh trùng đê bảo quản trong Nitơ lỏng

3.2.1. Ảnh hưởng của các carbohydrate đến di động tổng và di động tiến tới của tinh trùng đê bảo quản trong Nitơ lỏng

Kết quả dựa vào Hình 2 cho thấy nghiệm thức TCG2 với carbohydrate là glucose có nồng độ 69 mM cho tỷ lệ tinh trùng di động cao nhất, trong đó tỷ lệ di động tổng số là 67% và tỷ lệ di động tiến tới là 48,79%, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Nghiệm thức TCS2 cho kết quả tỷ lệ di động tổng số và tiến tới của tinh trùng thấp nhất (16,63% và 11,79%), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Tỷ lệ di động tổng số tốt nhất của tinh trùng trong nghiên cứu của Naing et al. (2010) là 60,5% khi sử dụng nồng độ glucose 69,38 mM, kết quả này thấp hơn tỷ lệ di động tổng số của tinh trùng ở nghiệm thức 2 là TCG2 trong nghiên cứu này. Tương tự, kết quả nghiên cứu của De los Reyes et al. (2002) khi sử dụng nồng độ glucose 185 mM cho kết quả tỷ lệ di động của tinh trùng là 60,7%, thấp hơn tỷ lệ di động tiến tới của tinh trùng ở nghiệm thức TCG2.

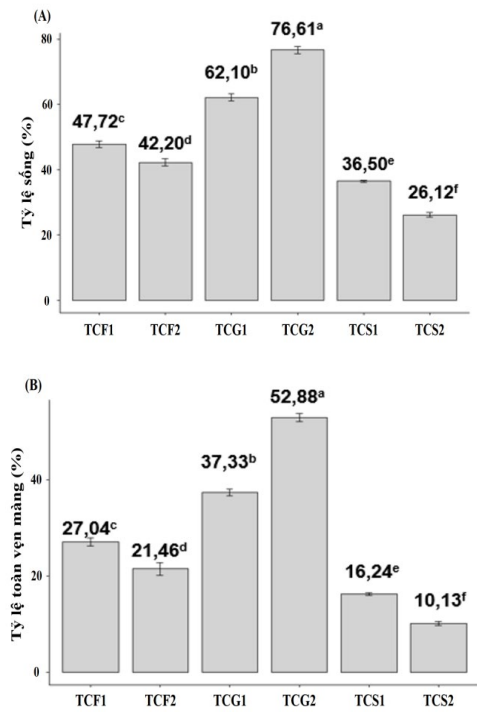


Hình 2. Biểu đồ biểu diễn tỷ lệ di động tổng số (A) và tiến tới (B) sau bảo quản

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái in thường theo sau a, b, c, d, e, f khác nhau là khác biệt có ý nghĩa thống kê, $P < 0,05$. TCG1 (glucose 47 mM), TCG2 (glucose 56 mM), TCF1 (fructose 47 mM), TCF2 (fructose 56 mM), TCS1 (sucrose 47 mM), TCS2 (sucrose 56 mM).

3.2.2. Ảnh hưởng của các carbohydrate đến tỷ lệ sống và tỷ lệ toàn vẹn màng của tinh trùng đê bảo quản trong Nitơ lỏng

Dựa vào kết quả từ Hình 3 cho thấy tỷ lệ sống và tỷ lệ toàn vẹn màng (76,61% và 52,88%) cao nhất được ghi nhận ở nghiệm thức TCG2 sử dụng carbohydrate là glucose với nồng độ 69 mM, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Sau quá trình bảo quản lạnh, tỷ lệ sống của tinh trùng thấp nhất là 26,12% và tỷ lệ toàn vẹn màng thấp nhất là 10,13% đều ở nghiệm thức TCS2, sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Theo nghiên cứu của Naing et al. (2010), khi sử dụng nồng độ glucose 69,38 mM cho kết quả tỷ lệ sống của tinh trùng là 62,3%, thấp hơn tỷ lệ sống của tinh trùng ở nghiệm thức TCG2.



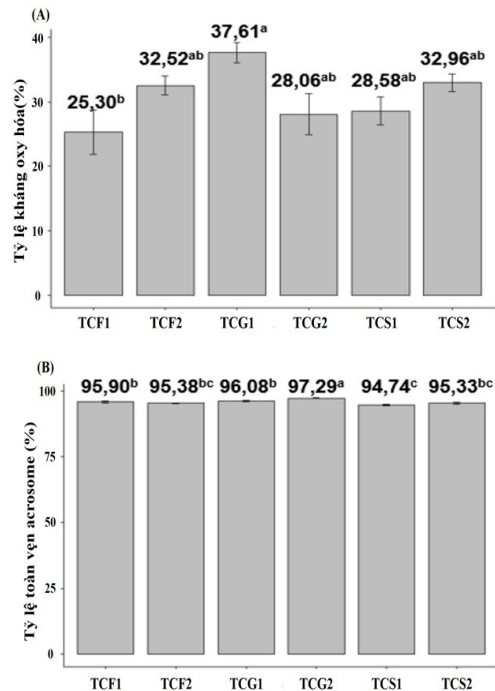
Hình 3. Biểu đồ biểu diễn tỷ lệ sống (A) và tỷ lệ toàn vẹn màng (B) sau bảo quản

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái in thường theo sau a, b, c, d, e, f khác nhau là khác biệt có ý nghĩa thống kê, $P < 0,05$. TCG1 (glucose 47 mM), TCG2 (glucose 69 mM), TCF1 (fructose 47 mM), TCF2 (fructose 56 mM), TCS1 (sucrose 47 mM), TCS2 (sucrose 56 mM).

3.2.3. Ảnh hưởng của các carbohydrate đến tỷ lệ toàn vẹn acrosome và tỷ lệ kháng oxy hóa của tinh trùng đê bảo quản trong Nitơ lỏng

Sau quá trình bảo quản lạnh khả năng kháng oxy hóa của tinh trùng giảm, kết quả trình bày trong

Hình 4 cho thấy tỷ lệ kháng oxy hóa cao nhất là 37,61% được ghi nhận ở nghiệm TCG1 với glucose nồng độ 47 mM có trong môi trường bảo quản nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$), khả năng kháng oxy hóa của tinh trùng ở các nghiệm thức TCG1, TCG2, TCF2, TCS1, TCS2 khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Hình 4 cũng cho thấy tất cả các nghiệm thức đều có tỷ lệ tính toàn vẹn acrosome cao, trong khoảng 94,47% đến 97,29%, nghiệm thức TCG2 có tỷ lệ tính toàn vẹn acrosome cao nhất ($P < 0,05$), đạt 97,29%, các nghiệm thức còn lại khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Kết quả này cao hơn ở tất cả các carbohydrate có trong thí nghiệm của Naing et al. (2010), cụ thể tỷ lệ tính toàn vẹn acrosome của tinh trùng trong môi trường có glucose, fructose và sucrose lần lượt là 68,9%, 66,9% và 64,8%. Tương tự, kết quả nghiên cứu của De los Reyes et al. (2002) khi sử dụng nồng độ glucose 185 mM cho kết quả tỷ lệ tính toàn vẹn acrosome của tinh trùng là 45,5%, thấp hơn tỷ lệ tính toàn vẹn acrosome của tinh trùng ở nghiệm thức TCG2.



Hình 4. Biểu đồ biểu diễn tỷ lệ kháng oxy hóa (A) và tỷ lệ toàn vẹn acrosome (B) của tinh trùng sau bảo quản

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái in thường theo sau a, b, c, d, e, f khác nhau là khác biệt có ý nghĩa thống kê, $P < 0,05$. TCG1 (glucose 47 mM), TCG2 (glucose 56 mM), TCF1 (fructose 47 mM), TCF2 (fructose 56 mM), TCS1 (sucrose 47 mM), TCS2 (sucrose 56 mM).

3.3. Thảo luận

Điều quan trọng nhất của việc bảo quản lạnh là vấn đề bảo quản chất lượng tinh dịch đạt hiệu quả tối ưu, giúp tinh trùng duy trì được khả năng thụ tinh tốt và đảm bảo chất lượng tinh trùng. Quá trình bảo quản lạnh sẽ dẫn đến các tổn thương trên màng tế bào, thiếu chất dinh dưỡng, những vấn đề trên sẽ gây ra ảnh hưởng tiêu cực đến tỷ lệ sống chết, khả năng di động, đặc biệt là khả năng di động tiến tới và toàn vẹn màng tế bào, toàn vẹn acrosome của tinh trùng. Mức độ giảm các thông số hay chất lượng tinh trùng có giảm xuống hay không phụ thuộc vào việc sử dụng phương pháp bảo quản lạnh, nhiệt độ bảo quản hoặc nồng độ chất bảo quản lạnh khác nhau. Nghiên cứu của Anjos et al. (2021) đã khẳng định các loại đường trong môi trường bảo quản lạnh giúp tăng tỷ lệ thành công sau rã đông của tinh trùng, giảm thiểu hư hỏng do nhiệt độ, đặc biệt là trong việc giảm sản xuất ROS, peroxid hóa lipid và cải thiện tính toàn vẹn của màng plasma. Nghiên cứu cho thấy các tế bào có mức ROS thấp hơn đáng kể trong các mẫu được bảo quản lạnh bằng đường. Hoạt động của các enzyme chống oxy hóa cao hơn ở các nghiệm thức có bổ sung đường, đường hỗ trợ các chất chống oxy hóa hoạt động tốt hơn. Việc bổ sung đường đóng một vai trò quan trọng trong việc bảo vệ màng tinh trùng trong quá trình bảo quản lạnh, cho thấy tiềm năng cải thiện chất lượng tinh trùng sau tan băng và bảo vệ tế bào khỏi bị tổn thương do lạnh. Chẳng hạn như tác dụng của sucrose trong bảo vệ, chống lại stress oxy hóa ở tinh trùng lợn đực sau rã đông bằng cách giảm nồng độ ROS và cải thiện khả năng sống sót của tế bào khi so sánh với lactose (Pezo et al., 2020).

Động vật cần năng lượng để hoạt động, năng lượng được nạp vào chịu trách nhiệm cho sự phát triển của tất cả các tế bào sống. Có hai con đường sản xuất ATP ở tinh trùng động vật có vú là đường phân và hô hấp ty thể. Các báo cáo cho thấy glucose hoặc quá trình glycolysis là một trong những yếu tố liên quan đến việc truyền tín hiệu thông qua quá trình phosphoryl tyrosine để cung cấp năng lượng cho tế bào (Mukai & Okuno, 2004). ATP có nguồn gốc từ glucose đóng vai trò là nguồn năng lượng tức thời, hoạt động chức năng của ty thể cũng tăng lên trong quá trình hoạt động của tinh trùng (Fraser & Lane, 1987). Adenosine triphosphate cần thiết cho hoạt động ATPase, hình thành adenosine monophosphate tuần hoàn và quá trình phosphoryl hóa.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Naing et al. (2010), glucose có trong

môi trường bảo quản lạnh tinh trùng dê làm tăng khả năng di chuyển của tinh trùng về phía trước trong tinh dịch dê sau rã đông so với việc bổ sung sucrose. Tác dụng của việc bổ sung đường vào đối với tinh trùng được bảo quản lạnh khác nhau tùy theo loại đường do chức năng khác nhau về trọng lượng hóa học và phân tử của chúng. Các phân tử có trọng lượng phân tử thấp có thể đi qua màng sinh chất của tinh trùng và cung cấp năng lượng để hoạt động trong quá trình trao đổi chất và sinh lý bình thường. Đường có trọng lượng phân tử cao không có khả năng khuếch tán qua màng sinh chất và tạo ra áp suất thẩm thấu dẫn đến tình trạng mất nước của tế bào. Do đó, nó gây ra tỷ lệ hình thành băng nội bào thấp hơn và mang lại khả năng sống sót cao hơn cho tinh trùng (Nagase et al., 1964; Purdy, 2006). Việc bổ sung glucose vào chất chống đông mang lại sự cải thiện tốt hơn về tỷ lệ chuyển động so với việc bổ sung các disaccharides khác sau khi bảo quản lạnh. Phát hiện này xác nhận các báo cáo của Corteel (1974) và Ponglowhapan et al. (2004). Glucose rất cần thiết cho việc sử dụng năng lượng của tinh trùng và hỗ trợ khả năng vận động và di chuyển của tinh trùng. Glucose cung cấp nguyên liệu trực tiếp cho quá trình đường phân và dẫn truyền điện tử trong ty thể. Còn sucrose cần phải trải qua quá trình thủy phân đường đôi thành đường đơn. Glucose được cho là một loại đường tuyệt vời cho quá trình trao đổi chất của tinh trùng dê (Corteel, 1974; Purdy, 2006). Khả năng vận động sau bảo quản lạnh được cải thiện ở các chất chống đông được bổ sung monosaccharide (glucose hoặc fructose). Monosaccharide hiệu quả hơn disaccharide ở nồng độ được thử nghiệm trong các thí nghiệm để duy trì khả năng di chuyển sau rã đông của tinh trùng dê Boer trong các chất bảo quản dựa trên Tris. Đã có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của việc bổ sung đường trong chất bảo quản lạnh tinh đến chất lượng tinh trùng được bảo quản lạnh, monosaccharide nâng cao tác dụng tốt hơn đối với chất lượng tinh dịch so với disaccharides và trisaccharide trong bảo quản lạnh mào tinh trùng hươu đỏ (Fernández-Santos et al., 2007).

Theo nghiên cứu của Mann (1964), hàm lượng đường thấp được đưa vào chất pha loãng có gốc Tris làm chất nền dễ chuyển hóa cho tinh trùng. Kết quả thí nghiệm này cho thấy đối với môi trường sử dụng glucose làm carbohydrate (TCG1 và TCG2), các chỉ số về tỷ lệ di động, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn màng tế bào và tính toàn vẹn acrosome đều cao hơn môi trường sử dụng fructose và sucrose làm carbohydrate (TCF1, TCF2, TCS1 và TCS2). Điều này có nghĩa glucose có tác dụng tốt hơn hai loại

đường còn lại (fructose và sucrose) trong việc bảo quản lạnh tinh trùng. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Salamon và Visser (1972), trong môi trường bảo quản lạnh dựa trên Tris, glucose được phát hiện là thành phần carbohydrate phù hợp hơn so với fructose và đường khác. Với môi trường sử dụng sucrose làm carbon hydrate (TCS1 và TCS2) các chỉ số về tỷ lệ di động, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn màng tế bào đều thấp nhất. Tinh trùng được đông lạnh trong môi trường có chứa disaccharide thấp hơn đáng kể so với tinh trùng được đông lạnh bằng các carbohydrate không chứa disaccharides, sự hiện diện của disaccharides không làm tăng khả năng chịu nhiệt hoặc bảo vệ tính toàn vẹn màng của tinh trùng đông lạnh. Hơn nữa, disaccharides được sử dụng làm chất tan chính không cải thiện chất lượng tinh trùng dễ đông lạnh ngoại trừ việc bảo vệ tính toàn vẹn của acrosome.

Nghiên cứu ảnh hưởng của carbohydrate trong môi trường bảo quản lạnh tinh trùng dê đã chứng minh tầm quan trọng của carbohydrate và nồng độ trong môi trường bảo quản lạnh tinh trùng ở nitơ lỏng giúp cải thiện chất lượng tinh trùng, từ đó khẳng định vai trò của carbohydrate và nồng độ carbohydrate trong khả năng bảo quản lạnh tinh trùng, cung cấp năng lượng và hạn chế sự tụt giảm chất lượng tinh trùng.

Qua kết quả của thí nghiệm này, có thể nhận thấy các carbohydrate là nhân tố gây ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng tinh trùng bảo quản lạnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Agha-Rahimi, A., Khalili, M. A., Nabi, A., & Ashourzadeh, S. (2014). Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding. *Reproductive biomedicine online*, 28(3), 352-358. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.11.015>

Colas, G., (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J. Reprod. Fertil.*, 42, 277-285. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0420277>

Corteel, J.M., (1974). Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal: effet du glucose (viabilité of spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma: glucose effect). *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 14, 741-745.

De los Reyes, M., Saenz, L., Lapierre, L., Crosby, J., & Barros, C. (2002). Evaluation of glucose as a cryoprotectant for boar semen. *Veterinary*

Carbohydrate có tác dụng thâm thấu và cung cấp năng lượng cho tế bào tinh trùng trong quá trình bảo quản lạnh, giúp tăng khả năng di động, khả năng sống và tính nguyên vẹn acrosome sau khi rã đông của tinh trùng. Nhìn chung, các chỉ tiêu về độ di động, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn màng tế bào ở nghiệm thức TCG2 với glucose là carbohydrate và nồng độ là 69 mM cho chất lượng tinh trùng tối ưu nhất so với các nghiệm thức còn lại.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy carbohydrate đã tác động lên các thông số của tinh trùng được làm lạnh và đông lạnh: khả năng vận động, tính toàn vẹn của màng, tính toàn vẹn acrosome và khả năng sống sót. Carbohydrate trong môi trường bảo quản lạnh là glucose có thể giúp tăng khả năng sống và di động tốt nhất sau khi rã đông, cụ thể glucose 69 mM.

Thực hiện thêm các nghiên cứu có bổ sung các chất chống oxy hóa vào môi trường bảo quản nhằm nâng cao chất lượng tinh trùng bảo quản lạnh. Kết hợp gieo tinh nhân tạo để thấy được ý nghĩa thực tiễn của nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài khoa học công nghệ cấp Bộ “Nghiên cứu sản xuất tinh dê đông lạnh công nghệ và đánh giá hiệu quả gieo tinh nhân tạo trên đàn dê thịt và dê sữa nuôi tại Đồng bằng sông Cửu Long”, mã số đề tài B2024-TCT-04.

record, 151(16), 477-480.

<https://doi.org/10.1136/vr.151.16.477>

Duy, N. L. K., Liêm, B. T., Vy, N. P. N., & Khương, T. T. T. (2024). Ảnh hưởng của môi trường bảo quản và thời gian bảo quản đến chất lượng tinh trùng dê. *TNU Journal of Science and Technology*, 229(05), 227-234.

<https://doi.org/10.34238/tnu-jst.9186>

Fernández-Santos, M. R., Martínez-Pastor, F., García-Macías, V., Estesó, M. C., Soler, A. J., De Paz, P., Garde, J. J. (2007). Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 67(4), 738-753.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.005>

Fraser, L. R., & Lane, M. R. (1987). Capacitation- and fertilization-related alterations in mouse sperm oxygen consumption. *Reproduction*,

- 81(2), 385-393.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0810385>
- Fumuso, F. G., Giuliano, S. M., Chaves, M. G., Neild, D. M., Miragaya, M. H., Gambarotta, M. C., & Carretero, M. I. (2018). Seminal plasma affects the survival rate and motility pattern of raw llama spermatozoa. *Animal reproduction science*, 192, 99-106.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.019>
- Küçük, N., Aksoy, M., Uçan, U., Ahmad, E., Naseer, E., Ceylan, A. (2014). Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. *Cryobiology*, 68(3), 327-331.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.009>
- Mann, T., (1964). The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract. *Methuen, London*.
- Mukai, C., & Okuno, M. (2004). Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of reproduction*, 71(2), 540-547.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.026054>
- Nagase, H., Niwa, T., Yamashita, S., Irie, S., (1964). Deep freezing of bull semen in concentrated pellet form. II. Protective action of sugars. In: Proceedings of the 5th International Congress of Animal. *Reproduction A. I., Trento, 4*, 489-502.
- Naing, S. W., Wahid, H., Azam, K. M., Rosnina, Y., Zuki, A. B., Kazhal, S., & San, M. M. (2010). Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Animal reproduction science*, 122(1-2), 23-28.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.06.006>
- Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M. and Zhang, H. Y. . (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS (*+) assay. *J Agric Food Chem*, 52(15), 4669-74.
<https://doi.org/10.1021/jf0400056>
- Pezo, F., Zambrano, F., Uribe, P., Risopatrón, J., Moya, C., de Andrade, A. F. C., et al. (2020). Oxidative and nitrosative stress in frozen-thawed pig spermatozoa. II: effect of the addition of saccharides to freezing medium on sperm function. *Cryobiology*, 97, 5-11.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.015>
- Ponglowhapan, S., Essén-Gustavsson, B., Linde Forsberg, C., (2004). Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 62(8), 1498-1517.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.02.014>
- Purdy, P. H., (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Res.* 63(3), 215-225.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>
- Ramu, S., & Jayendran, R. S. (2013). The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. *Spermatogenesis: Methods and protocols*, 21-25.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_3
- Salamon, S. and Lightfoot, R.J., (1969). Freezing ram semen by the pellet method. I. The effect of diluent composition on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 22, 1527-1546.
<https://doi.org/10.1071/B19691527>
- Salamon, S., Visser, D., (1972). Effect of composition of Tris-based diluents and thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Aust. J. Biol. Sci.* 25, 605.
<https://doi.org/10.1071/bi9720605>
- Tada, N., Sato, M., Yamanoi, J., Mizorogl, T., Kasai, K. and Ogawa, S., 1990. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J. Reprod. Fertil.*, 89, 511-516.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0890511>
- Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., & Tekeli, T. (2000). Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54(4), 579-585.
[https://doi.org/10.1016/s0093691x\(00\)00373-3](https://doi.org/10.1016/s0093691x(00)00373-3)