



DOI:10.22144/ctujos.2024.329

## ẢNH HƯỞNG CỦA SUCROSE VÀ LECITHIN ĐẾN CHẤT LƯỢNG TINH TRÙNG THỎ ĐEN VIỆT NAM BẢO QUẢN TRONG NITƠ LỎNG

Trần Thị Thanh Khuông<sup>1\*</sup>, Nguyễn Lâm Khánh Duy<sup>1</sup> và Lê Thị Kim Khôi<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Sinh viên K46 ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

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

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 13/04/2024

Sửa bài (Revised): 04/07/2024

Duyệt đăng (Accepted): 08/08/2024

**Title:** Effects of sucrose and lecithin on the Cryopreservation Quality of Vietnamese Indigenous Black Rabbit Spermatozoa

**Author(s):** Tran Thi Thanh Khuong\*, Nguyen Lam Khanh Duy and Le Thi Kim Khoi

**Affiliation(s):** Can Tho University

### TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là xác định nồng độ sucrose và lecithin phù hợp trong quá trình bảo quản lạnh tinh trùng thỏ đen Việt Nam. Ở thí nghiệm 1, tinh dịch được pha loãng với môi trường bảo quản Tris Citrate Glucose có bổ sung 15% lòng đỏ trứng và sucrose ở 4 nồng độ: 0M, 0,05M, 0,1M và 0,25M. Ở thí nghiệm 2, lòng đỏ trứng được thay thế bằng lecithin trong môi trường bảo quản ở các nồng độ: 1%, 1,5% và 2%. Mẫu được chuyển vào ống trữ tinh và được trữ trong nitơ lỏng (-196°C). Sau 72 giờ được bảo quản, kết quả kiểm tra chất lượng tinh trùng cho thấy, 0,05M sucrose kết hợp với 1,5% lecithin giúp tinh trùng giữ được chất lượng tốt nhất với tỷ lệ di động tổng số, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn màng tế bào, toàn vẹn acrosome và khả năng kháng oxy hóa lần lượt 56,39%, 63,74%, 49,04%, 64,43%, 20,41%. Nghiên cứu cho thấy việc kết hợp 0,05M sucrose và 1,5% lecithin trong môi trường bảo quản lạnh có ý nghĩa quan trọng trong nhân giống và bảo tồn thỏ đen Việt Nam.

**Từ khóa:** Bảo quản lạnh, lecithin, sucrose, tinh trùng, thỏ đen Việt Nam

### ABSTRACT

The objective of the study was to determine the appropriate concentrations of sucrose and lecithin during cryopreservation of Vietnamese black rabbit sperm. In experiment 1, semen was diluted with Tris Citrate Glucose stored medium supplemented with 15% egg yolk and sucrose at 4 concentrations: 0M, 0.05M, 0.1M and 0.25M. In experiment 2, egg yolks were replaced with lecithin in the stored medium at concentrations: 1%, 1.5% and 2%. The samples was transferred to straws and stored in liquid nitrogen (-196°C). After 72 hours of storage, sperm quality test results showed that 0.05M sucrose combined with 1.5% lecithin helps sperm maintain the best quality with overall motility rate, viability rate, membrane integrity, acrosome integrity and antioxidant capacity were 56.39%, 63.74%, 49.04%, 64.43%, 20.41%, respectively. This study showed that combining 0.05M sucrose and 1.5% lecithin in cryopreservation is important in breeding and preserving Vietnamese black rabbits.

**Keywords:** Cryopreservation, lecithin, sucrose, sperm, Vietnamese Black Rabbit

## 1. GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, chăn nuôi thỏ ngày càng được nông dân quan tâm nhiều hơn. Mô hình chăn nuôi thỏ ở đồng bằng sông Cửu Long được xem như là một phương tiện để nâng cao thu nhập của người dân vùng nông thôn. Tuy nhiên, ngành chăn nuôi đang phải đối mặt với những thách thức như biến đổi khí hậu, sự gia tăng dân số và xói mòn đất (Silagadze, 2022). Số lượng thỏ đen Việt Nam có nguy cơ bị suy giảm dẫn đến giảm đa dạng sinh học và mất cân bằng sinh thái (Khuong et al., 2023a). Bảo quản lạnh tinh trùng là một phương pháp quan trọng để bảo tồn nguồn gen động vật và khôi phục quần thể thông qua kỹ thuật thụ tinh nhân tạo (Sharafi et al., 2022). Tuy nhiên, nhiệt độ giảm trong quá trình bảo quản lạnh gây tổn thương tinh trùng, ảnh hưởng đến chất lượng tinh trùng và sự thành công của quá trình thụ tinh nhân tạo (Pickett et al., 1971; Khan et al., 2021). Các yếu tố khác nhau trong quá trình đông lạnh, bao gồm môi trường bảo quản, kỹ thuật chuẩn bị và đông lạnh tinh trùng, chất chống oxy hóa, thay đổi nhiệt độ đột ngột, hình thành băng và áp lực thẩm thấu, được cho là lý do khiến chất lượng tinh trùng kém sau khi rã đông. (Kubovicova et al., 2022). Một số báo cáo cho rằng sự thay đổi áp suất thẩm thấu làm biến dạng cấu trúc màng, do đó thay đổi hình dạng tinh trùng (Ozkavukcu et al., 2008). Các loại đường (sucrose hoặc trehalose) giúp bảo vệ cấu trúc màng tế bào nguyên vẹn (Crowe et al., 1988). Sucrose giúp màng tế bào tinh trùng khỏi tác động sốc lạnh trong quá trình bảo quản ở nhiệt độ thấp (Moura et al., 2022) và đã được sử dụng thành công trong việc bảo quản lạnh tinh dịch của chó, cừu, lợn, ngựa, lừa, ... (Sánchez et al., 2011; Arando et al., 2017; Consuegra et al., 2018; Diaz-Jimenez et al., 2018; Serrano et al., 2023). Trong lòng đỏ trứng chứa 1 lượng nhỏ lecithin có khả năng bảo vệ tinh trùng khỏi tổn thương do quá trình bảo quản lạnh. Tuy nhiên, lòng đỏ trứng có nguy cơ bị nhiễm vi khuẩn và cũng có thể tạo ra nội độc tố (Bousseau et al., 1998). Lecithin đậu nành được chiết xuất từ thực vật nên có một số ưu điểm gồm khả năng tiêu chuẩn hóa thành phần, giảm rủi ro nhiễm khuẩn và có thể ngăn ngừa tổn thương màng tế bào khi bảo quản lạnh kéo dài (Dalmazzo et al., 2018; Sun et al., 2020). Lecithin đậu nành đã được đề xuất làm chất thay thế tiềm năng cho lòng đỏ trứng trong môi trường bảo quản lạnh (Mahiddine & Kim, 2021). Đã có nghiên cứu thay thế lecithin vào môi trường bảo quản lạnh tinh trùng thỏ (Nishijima et al., 2015; Younan et al., 2021), tuy nhiên nghiên cứu trên thỏ đen Việt Nam vẫn còn hạn chế. Xuất phát từ những vấn đề trên,

nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra nồng độ sucrose và lecithin tối ưu có thể bảo vệ tinh trùng thỏ đen Việt Nam trong quá trình bảo quản lạnh.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Động vật thí nghiệm

Trong nghiên cứu này, 3 con thỏ đực đen bản địa nặng từ 2,5-3kg được nuôi tại trang trại động vật thí nghiệm của Phòng thí nghiệm tế bào gốc, trường Đại học Cần Thơ. Thỏ được cho ăn theo khẩu phần dinh dưỡng khuyến cáo bởi National Research Council (NRC, 1977). Tất cả thỏ đều được tiêm phòng đầy đủ về các bệnh tan máu và ký sinh trùng. Nghiên cứu đã được phê duyệt về mặt đạo đức đối với các quy trình chăm sóc, nuôi nhốt và thu thập tinh dịch động vật, tuân theo hướng dẫn của Ủy ban Đạo đức Động vật Trường Đại học Cần Thơ (CTU-AEC24004).

### 2.2. Thiết kế thí nghiệm

Mẫu tinh dịch được thu nhận từ 3 con thỏ (2 lần/tuần), mỗi con thỏ được thu nhận tinh 3 lần. Các mẫu tinh dịch sau đó được đánh giá về chất lượng. Nghiên cứu bao gồm 2 thí nghiệm. Thí nghiệm 1, mẫu tinh dịch được pha loãng với môi trường Tris Citrate Glucose (TCG) có chứa 5% glycerol với 15% lòng đỏ trứng gà và bổ sung sucrose với 4 nồng độ 0M, 0,05M, 0,1M và 0,25M. Thí nghiệm 2, mẫu tinh dịch được pha loãng với môi trường TCG có chứa 5% glycerol với nồng độ sucrose tối ưu ở thí nghiệm 1, lòng đỏ trứng trong môi trường được thay bằng lecithin với 3 nồng độ 1%, 1,5% và 2%.

Các mẫu được chuyển vào cọng rạ 0,5 mL, được ổn định 30 phút ở 15°C, 60 phút ở 5°C, 15 phút trên hơi nitơ lỏng trong và cuối cùng được bảo quản trong bình chứa nitơ lỏng. Sau 72 giờ bảo quản, mẫu được rã đông ở 37°C trong 30 giây và chất lượng tinh trùng được đánh giá về khả năng di động, khả năng sống sót, tính toàn vẹn màng tế bào, toàn vẹn acrosome và khả năng kháng oxy hóa.

### 2.3. Đánh giá sự di động của tinh trùng

Mẫu tinh trùng được xem dưới kính hiển vi Eclipse Si (Nikon) độ phóng đại 40× (Fumuso et al., 2018), sự di động của tinh trùng được đánh giá và phân loại như sau:

- Di động tiến tới: Tinh trùng bơi và di chuyển khắp nơi trong thị trường.
- Di động tại chỗ: Tinh trùng cử động nhưng không bơi, chỉ ở một vị trí cố định.
- Bất động: Tinh trùng nằm im, không cử động.

Số lượng tinh trùng di động theo từng loại được đếm trực quan và tỷ lệ di động từng loại được tính như sau:

- Tỷ lệ tinh trùng di động từng loại (%)

$$= \frac{\text{Số tinh trùng di động theo phân loại}}{\text{Tổng số tinh trùng đếm được}} \times 100.$$

- Tỷ lệ di động tổng số = Tỷ lệ di động tiến tới + Tỷ lệ di động tại chỗ.

#### 2.4. Đánh giá tỷ lệ sống của tinh trùng

Khả năng sống của tinh trùng được kiểm tra bằng phương pháp nhuộm Eosin-Nigrosin (Agha et al., 2014). Tinh trùng chết sẽ bắt màu thuốc nhuộm, trong khi tinh trùng sống thì không bắt màu.

- Tỷ lệ sống của tinh trùng (%)

$$= \frac{\text{Số tinh trùng sống}}{\text{Tổng số tinh trùng đếm được}} \times 100$$

#### 2.5. Đánh giá tính toàn vẹn màng của tinh trùng

Tính toàn vẹn của màng tinh trùng được đánh giá bằng xét nghiệm độ trương giảm thâm thấu – HOS (Ramu & Jeyendran, 2013) và được quan sát bằng kính hiển vi Eclipse Si (Nikon) độ phóng đại 40×. Tinh trùng có màng tế bào toàn vẹn thể hiện phản ứng cuộn tròn đuôi, trong khi tinh trùng có màng tế bào bị tổn thương thì không có phản ứng.

- Tỷ lệ toàn vẹn màng của tinh trùng (%)

$$= \frac{\text{Số tinh trùng cuộn tròn đuôi}}{\text{Tổng số tinh trùng đếm được}} \times 100$$

#### 2.6. 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 được quan sát bằng kính hiển vi Eclipse Si (Nikon) độ phóng đại 40×. 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.

- Tỷ lệ toàn vẹn màng acrosome tinh trùng (%)

$$= \frac{\text{Số tinh trùng có acrosome bình thường}}{\text{Tổng số tinh trùng đếm được}} \times 100$$

#### 2.7. Đánh giá khả năng kháng oxy hóa của tinh trùng

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

#### 2.8. 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.4.3.1. Các kết quả được trình bày ± sai số chuẩn (SE). 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.4.3.1.

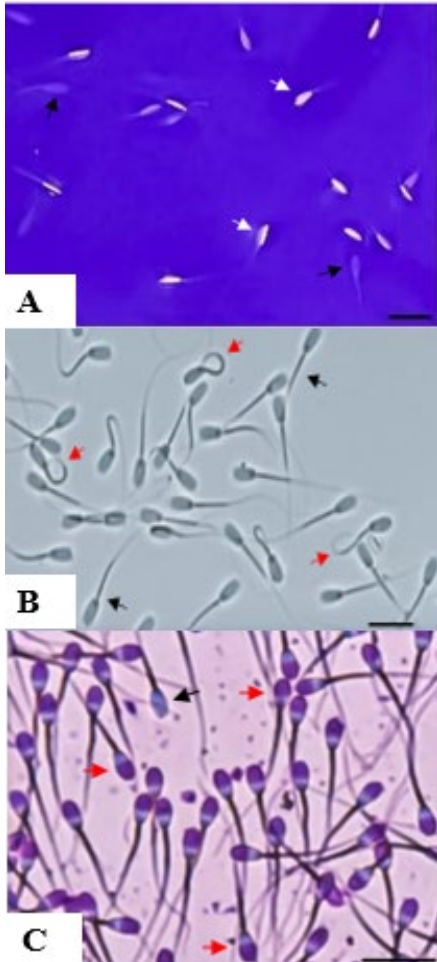
### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Chất lượng tinh dịch tươi

Bảng 1 trình bày kết quả chất lượng tinh dịch thô sau khi thu nhận. Nhìn chung các mẫu tinh dịch thu được từ 3 thỏ đực đen địa phương đều có màu sắc, pH và thể tích nằm trong giá trị bình thường (Khuong et al., 2023b). Từ kết quả đánh giá chất lượng cho thấy, mẫu tinh trùng thỏ đen đủ chất lượng cho các thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 1. Kết quả đánh giá chất lượng tinh trùng thô sau khi thu nhận**

Chỉ tiêu đánh giá	Kết quả
Màu sắc	Trắng đục
pH	7,06 ± 0,13
Di động tổng số (%)	90,02±0,51
Di động tiến tới (%)	78,40±0,51
Tỷ lệ sống (%)	92,96±0,51
Tỷ lệ toàn vẹn màng tế bào (%)	80,58±0,37
Tỷ lệ toàn vẹn Acrosome (%)	78,03±0,85



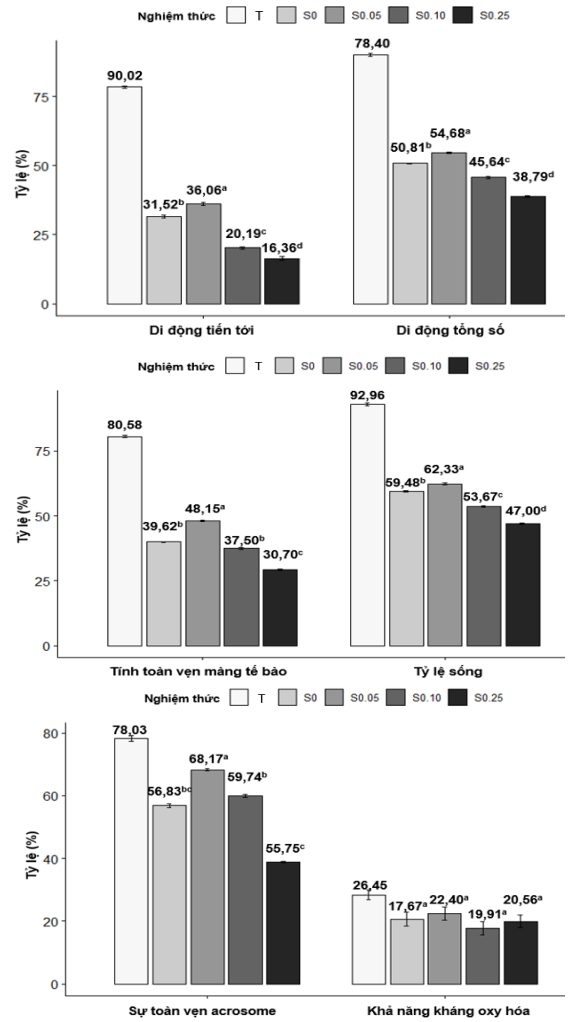
**Hình 1. Kết quả kiểm tra chất lượng tinh trùng**

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

**3.2. Kết quả thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nồng độ sucrose đến chất lượng tinh trùng thỏ đen sau quá trình bảo quản lạnh**

Kết quả thí nghiệm 1 được trình bày trong Hình 2. Kết quả cho thấy chất lượng tinh trùng thỏ đen giảm đáng kể sau quá trình bảo quản lạnh. Cụ thể, nồng độ sucrose 0,05 M cho kết quả chất lượng tinh trùng cao nhất về tỷ lệ di động tổng số (54,68%), di động tiến tới (36,06%), tỷ lệ sống (62,33%), tỷ lệ

toàn vẹn màng tế bào (48,15%), tỷ lệ toàn vẹn acrosome (68,17%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ). Trong khi đó, nồng độ sucrose 0,25 M cho thấy chất lượng tinh trùng thỏ đen sau đông lạnh đạt thấp nhất về tỷ lệ di động tổng số (38,79%), tỷ lệ di động tiến tới (16,36%), tỷ lệ sống (47,00%), tỷ lệ toàn vẹn màng tế bào (30,70%), tỷ lệ toàn vẹn acrosome (55,75%). Riêng khả năng kháng oxy hóa của tinh trùng giữa các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Nồng độ sucrose 0,05 M được sử dụng cho thí nghiệm 2.



**Hình 2. Biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá tinh trùng sau bảo quản lạnh ở thí nghiệm 1**

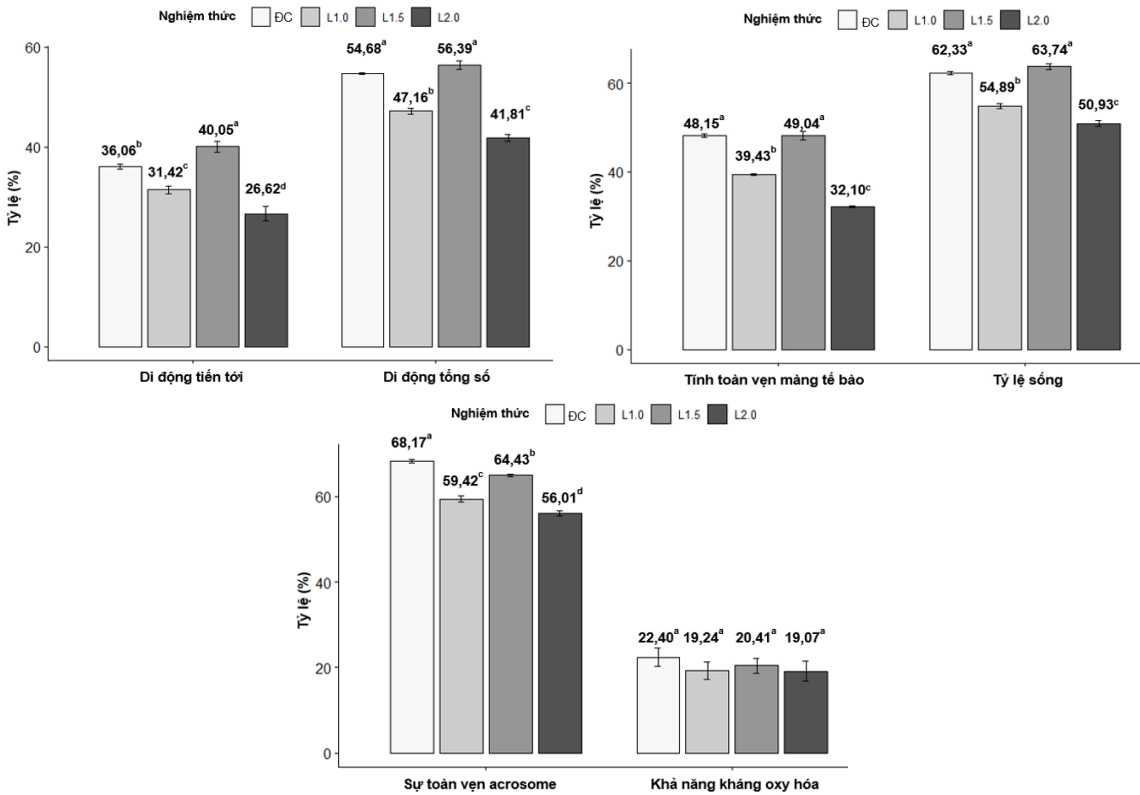
Ở mỗi chỉ tiêu đánh giá, các giá trị trung bình có chữ cái in thường (a, b, c, d) theo sau khác nhau là khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). T: Trước khi bảo quản lạnh, S0: Môi trường có chứa 0M sucrose, S0.05: Môi trường có chứa 0,05M sucrose, S0.10: Môi trường có chứa 0,1M sucrose, S0.25: Môi trường có chứa 0,25M sucrose

**3.3. Kết quả thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nồng độ lecithin đến chất lượng tinh trùng thỏ đen sau quá trình bảo quản lạnh**

Kết quả thí nghiệm 2 được trình bày trong Hình 3.

Kết quả cho thấy, môi trường bổ sung 1,5% lecithin cho kết quả tỷ lệ di động tiến tới cao nhất là 40,05%, khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ). Ở nghiệm thức sử dụng 1,5% lecithin, kết quả tỷ lệ di động tổng số, tỷ lệ sống và tỷ lệ toàn vẹn màng tế bào cao nhất lần lượt là: 56,39%; 63,74% và 49,04%, khác biệt không có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn

lại ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ toàn vẹn acrosome đạt cao nhất ở nghiệm thức đối chứng và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ di động tổng số và tỷ lệ toàn vẹn acrosome giữa nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức 1,5% lecithin khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Chất lượng tinh trùng đạt thấp nhất ở nghiệm thức Lecithin 2% ở tất cả các chỉ tiêu về di động tổng số (41,81%), di động tiến tới (26,62%), tỷ lệ sống (50,93%), tỷ lệ toàn vẹn màng tế bào (32,1%) và tỷ lệ toàn vẹn acrosome (56,01%). Sự khác biệt giữa các nghiệm thức về khả năng kháng oxy hóa là không có ý nghĩa thống kê.



**Hình 3. Biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá tinh trùng sau bảo quản lạnh ở thí nghiệm 2**

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 ( $p < 0,05$ ). ĐC: Môi trường không bổ sung lecithin, L1.0: Môi trường bổ sung 1% lecithin, L1.5: Môi trường bổ sung 1,5% lecithin, L2.0: Môi trường bổ sung 2% lecithin

**3.4. Thảo luận**

Nghiên cứu đã đánh giá hiệu quả của việc kết hợp chất bảo quản lạnh sucrose và lecithin trong bảo quản lạnh tinh trùng. Trong thí nghiệm 1 của nghiên cứu này, tỷ lệ di động, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn màng tế bào, tính toàn vẹn acrosome và khả năng kháng oxy hóa của tinh trùng đều thấp hơn so với trước bảo

quản lạnh. Theo kết quả nghiên cứu, việc sử dụng 0,05 M sucrose là hiệu quả nhất để duy trì chất lượng tinh trùng trong quá trình bảo quản lạnh kéo dài. Kết quả tương tự với nghiên cứu của Iaffaldano et al. (2014) về bảo quản lạnh tinh dịch thỏ bằng chất bảo vệ lạnh không thấm thấu, với tỷ lệ di động sau khi đông lạnh cao nhất đạt khoảng 40% khi bổ sung

sucrose 0,1 M. Nghiên cứu của Diaz-Jimenez et al. (2018) kết hợp sucrose và BSA tương tự glycerol trong đông lạnh tinh trùng lừ. Kết quả cải thiện đáng kể chất lượng tinh trùng về độ di động tổng số đạt 66,4%. Theo nghiên cứu khác của El-Sisy et al. (2016) đã xác định tác động có lợi của glycerol và sucrose đến chức năng toàn vẹn màng tế bào tinh trùng. Trong thí nghiệm 2 của nghiên cứu này, bổ sung Lecithin đậu nành ở 3 mức độ (1%, 1,5% và 2%) thay vì 15% lòng đỏ trứng (nhóm đối chứng). Kết quả, các đặc tính của tinh trùng về tỷ lệ di động, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn màng ở nồng độ lecithin 1,5% đã cải thiện so với lòng đỏ trứng và các nồng độ lecithin khác. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây (Nishijima et al., 2015; Abdel et al., 2024) cho thấy lecithin có tác dụng tích cực và có khả năng thay thế lòng đỏ trứng. Một nghiên cứu khác của Younan et al. (2021) cho thấy lecithin 1,5% giúp cải thiện các thông số về độ di động (48,64%), tỷ lệ sống (49,91%), toàn vẹn acrosome (52,37%).

Chất lượng tinh trùng giảm sau quá trình bảo quản lạnh do những thay đổi về cấu trúc và phân tử trong tinh trùng (Ozmic et al., 2023). Ngoài ra, tế bào tinh trùng nhạy cảm với quá trình peroxide hóa lipid tăng lên do nhiều loại phản ứng khác nhau gây áp lực lên màng tế bào (Khuong et al., 2023a). Sucrose có khả năng bảo vệ tế bào tinh trùng thông qua việc bảo quản lạnh (Iaffaldano et al., 2014), sucrosenó vai trò là một chất bảo vệ không thấm thấu, tạo áp suất thẩm thấu, thúc đẩy quá trình khử nước khỏi tế bào trước khi đông lạnh, làm giảm mức độ tổn thương tế bào khi hình thành tinh thể băng nội bào. Sau một khoảng thời gian, chất bảo vệ và nước cân bằng để đạt được nồng độ nội bào và ngoại bào bằng nhau (Amann, 1999). Nồng độ chất bảo vệ cũng xác định phương thức hoạt động cụ thể của nó trên màng lipid. Bởi vì tinh trùng thỏ có tỷ lệ cholesterol:phospholipid cao và tỷ lệ acid béo không bão hòa đa và acid béo bão hòa trong phospholipid thấp, nên chúng có tính lưu động và tính thấm trung bình (Curry et al., 1995; Mocé & Vicente, 2009). Sucrose ở nồng độ thấp cho độ thẩm thấu cao hơn (Consuegra et al., 2018). Do đó, có thể thấy rằng sucrose ở nồng độ thấp thích hợp hơn sucrose ở nồng độ cao.

Trong quá trình bảo quản lạnh, lòng đỏ trứng thường được đưa vào như một chất phụ gia bảo vệ bổ sung trong môi trường bảo quản tinh trùng của thỏ (Mocé & Vicente, 2009). Tuy nhiên, việc sử dụng lòng đỏ trứng có thể gây ra nhiều tác hại. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để tìm cách thay thế lòng đỏ trứng do khả năng xuất hiện vi sinh vật gây

bệnh, sản xuất các chất chuyển hóa và độc tố có hại, thiếu tiêu chuẩn hóa và sự hiện diện của hormone steroid và các chất ức chế trao đổi chất hoặc làm giảm khả năng vận động của tinh trùng, tất cả đều làm giảm chất lượng tinh trùng sau quá trình bảo quản lạnh (El-Sisy et al., 2016). Theo Abdel et al. (2024), việc không có sự khác biệt đáng kể giữa lòng đỏ trứng và lecithin đậu nành trong tất cả các thông số tinh trùng thử nghiệm sau pha loãng, cân bằng và rã đông có thể là do thành phần của cả hai môi trường bảo quản đều có chất lượng tốt, có nguồn năng lượng chứa glucose, khả năng đệm, chất bảo vệ chống sốc lạnh, chất bảo vệ lạnh (glycerol) và kháng sinh đều được bổ sung ở môi trường dùng lecithin và môi trường dùng lòng đỏ trứng. Hàm lượng lecithin trong đậu nành và lipoprotein trong lòng đỏ trứng góp phần bảo tồn vỏ lipoprotein của tế bào tinh trùng (Kumar et al., 1992). Do đó, trong nghiên cứu này, việc không có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ di động tổng số và tỷ lệ toàn vẹn acrosome giữa nghiệm thức bổ sung 1,5% lecithin và lòng đỏ trứng được cho là hợp lý. Đã có nhiều nghiên cứu đã khẳng định rằng lecithin có tác dụng tích cực đến chất lượng tinh trùng sau giải đông và có thể thay thế lòng đỏ trứng trên các loài động vật chẵn hạn như dê (Chelucci et al., 2015), bò (El-sisy et al., 2016), cừu (Masoudi et al., 2016), chó (Dalmazzo et al., 2018) và thỏ (Nishijima et al., 2015; Younan, et al., 2021; Abdel et al., 2024).

Kết quả của nghiên cứu đã chứng minh vai trò của sucrose và lecithin trong môi trường bảo quản lạnh tinh trùng thỏ đen, tiềm năng ứng dụng phương pháp bảo quản lạnh có sự kết hợp chất bảo vệ thẩm thấu và không thẩm thấu trong môi trường đông lạnh tinh trùng, cũng như việc thay thế chất bảo vệ ngoại bào để loại bỏ tác hại của lòng đỏ trứng. Tuy nhiên, hạn chế của nghiên cứu là cần có thêm những chỉ tiêu đánh giá khác như sự phân mảnh DNA hay tiềm năng hoạt động của ty thể nhằm cung cấp cái nhìn chi tiết hơn về những tác động của sucrose và lecithin. Bên cạnh đó, cần tiến hành gieo tinh nhân tạo trên thỏ cái để đánh giá *in vivo* chất lượng tinh trùng sau quá trình bảo quản lạnh.

#### 4. KẾT LUẬN

Môi trường bảo quản TCG bổ sung kết hợp 0,05M sucrose và 1,5% lecithin giúp bảo quản tinh trùng thỏ đen Việt Nam tốt nhất sau 72 giờ. Việc bổ sung chất bảo quản lạnh đã giúp cải thiện đáng kể chất lượng tinh trùng về các chỉ tiêu: độ di động, tỷ lệ sống, tỷ lệ toàn vẹn màng tế bào, tỷ lệ toàn vẹn acrosome và khả năng kháng oxy hóa.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ một phần bởi trường Đại học Cần Thơ. Mã số: T2022-133. Chúng tôi

cũng xin cảm ơn sự hỗ trợ của Th.S Trần Gia Huy – Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử tiên tiến, Viện Công nghệ Sinh học và Thực Phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdel, K. K., Gabr, S., E. Younan, G., M. Shehab El-Din, Ahmad., & Ghodaia, A. E. B. (2024). Variables of cryopreserved rabbit spermatozoa as affected by nano-curcumin supplementation into Tris-extender containing egg yolk or soybean lecithin extender. *Journal of Sustainable Agricultural and Environmental Sciences*, 3(1), 10–17. <https://doi.org/10.21608/jsaes.2024.254166.1068>
- Agha, R. A., Khalili M., Nabi A., & Ashourzadeh S. (2014). Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding. *BioMedicine Online*, 28, 352–58. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.11.015>
- Amann R.P. (1999). Cryopreservation of sperm. In: Knobil E, Neill JD (eds) Encyclopedia of reproduction. *Academic Press*, Burlington, MA, pp. 773–783.
- Arando, A., Gonzalez, A., Delgado, J. V., Arrebola, F. A., & Perez-Marín, C. C. (2017). Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Animal Reproduction Science*, 181, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.04.008>
- Bousseau, S., Brillard, J. P., Marquant-Le Guienne, B., Guérin, B., Camus, A., & Lechat, M. (1998). Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 50(5), 699–706. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00175-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00175-7)
- Chelucci S., Pasciu V., Succu S., Addis D., Leoni G.G., Manca M.E., Naitana S., & Berlinguer F. (2015). Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity và fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*, 83(6), 1064–74.
- Consuegra, C., Crespo, F., Bottrel, M., Ortiz, I., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., & Hidalgo, M. (2018). Stallion sperm freezing with sucrose extenders: A strategy to avoid permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, 191, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.013>
- Curry M.R., Redding B.J., & Watson P.F. 1995. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiology*, 32, 175–181
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., Rudolph, A. S., Wistrom, C. A., Spargo, B. J., & Anchordoguy, T. J. (1988). Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 947(2), 367–384. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(88\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0304-4157(88)90015-9)
- Dalmazzo, A., Losano, J. D. A., Rocha, C. C., Tsunoda, R. H., Angrimani, D. de S. R., Mendes, C. M., Assumpção, M. E. O. D., Nichi, M., & Barnabe, V. H. (2018). Effects of Soy Lecithin Extender on Dog Sperm Cryopreservation. *Animal Biotechnology*, 29(3), 174–182. <https://doi.org/10.1080/10495398.2017.1334662>
- Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Ortiz, I., Consuegra, C., Pereira, B., Gonzalez-De Cara, C. A., Aguilera, R., Mari, G., Mislei, B., Love, C. C., & Hidalgo, M. (2018). Cryopreservation of donkey sperm using non-permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, 189, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.013>
- El-Sisy, G. A., Shahba, M. I., & El-Sheshtawy, R. I. (2016). Freezability of buffalo semen with TRIS extender enriched with disaccharides (trehalose or sucrose) and different glycerol concentrations. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(5), 416–418.
- Fumuso F.G., Giulianob S.M., Chavesa M.G., Neilda D.M., Miragayaa M.H., Gambarottac M.C., Carreteroa, M.I. (2018). Seminal plasma affects the survival rate and motility pattern of raw llama spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 192, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.019>
- Iaffaldano, N., Di Iorio, M., Rosato, M. P., & Manchisi, A. (2014). Cryopreservation of rabbit semen using non-permeable cryoprotectants: Effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk versus egg yolk or sucrose. *Animal Reproduction Science*, 151(3–4), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.020>
- 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.  
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>
- Khuong, T. T. T., Duy, N. L. K., Hang, N. T., Ngoc, P. K., & Tuyen, D. N. D. (2023a). Improving indigenous Vietnamese Black Rabbit frozen sperm quality: the role of glycine and sperm selection methods. *World Rabbit Science*, 31(4), 229–236.  
<https://doi.org/10.4995/wrs.2023.19690>
- Khuong T. T. T., Nga T. T., Duy N. L. K. & Trung T. T. (2023b). Improving rabbit sperm quality during cold storage preservation through cyteine supplementation. *Journal of Animal Husbandry Sciences and Technics*, 29(1), 11-18
- Kubovicova, E., Makarevich, A. V., Balazi, A., Vasicek, J., & Chrenek, P. (2022). Factors affecting rabbit sperm cryopreservation: a mini-review. *Zygote*, 30(1), 1–8.  
<https://doi.org/10.1017/S0967199421000137>
- Kumar, S., Sahni, K.L., and Mohan, G. (1992). Effect of different levels of glycerol and yolk on freezing and storage of buffalo semen in milk, tris and sodium citrate buffers. *Buffalo J.*, 2, 151–156
- Mahiddine, F. Y., & Kim, M.-J. (2021). Overview on the Antioxidants, Egg Yolk Alternatives, and Mesenchymal Stem Cells and Derivatives Used in Canine Sperm Cryopreservation. *Animals*, 11(7), 1930. <https://doi.org/10.3390/ani11071930>
- Masoudi, R., Sharafi, M., Zareh Shahneh, A., Towhidi, A., Kohram, H., Esmacili, V., Shahverdi, A., & Davachi, N. D. (2016). Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin. *Cryobiology*, 73(1), 69–72.  
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.05.010>
- Mocé, E., & Vicente, J. S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Animal Reproduction Science*, 110(1–2), 1–24.
- Moura, T. C. M., Arruda, L. C. P., Araújo Silva, R. A. J., Silva, R. P. F., Oliveira, A. S., Tobal, L. F. M., Batista, A. M., Carneiro, G. F., & Guerra, M. M. P. (2022). Diluent Containing Dimethylformamide Added With Sucrose Improves In Vitro Quality After Freezing/Thawing Stallion Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 109, 103825.  
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103825>
- National Research Council. (1977). Nutrient Requirements of Rabbits, 2th ed. *National Academy of Sciences*. Washington DC, USA
- Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M. & Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS (\*+) assay. *J Agric Food Chem*, 52(15), 4669-74.
- Nishijima, K., Kitajima, S., Koshimoto, C., Morimoto, M., Watanabe, T., Fan, J., & Matsuda, Y. (2015). Motility and fertility of rabbit sperm cryopreserved using soybean lecithin as an alternative to egg yolk. *Theriogenology*, 84(7), 1172–1175.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.018>
- Ozmic S., Ban-Frangez H., & Stimpfel M. (2023). Sperm Cryopreservation Today: Approaches, Efficiency, and Pitfalls. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 45: 4716-4734.  
<https://doi.org/10.3390/cimb45060300>
- Ozkavukcu, S., Erdemli, E., Isik, A., Oztuna, D., & Karahuseyinoglu, S. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25(8), 403–411.  
<https://doi.org/10.1007/s10815-008-9232-3>
- Pickett, B. W. (1971). Factors affecting the utilization of frozen bovine semen for maximum reproductive efficiency. *A.I. Dig.* 19, 8.
- Prihantoko, K. D., Yuliatuti, F., Haniarti, H., Kusumawati, A., Widayati, D. T., & Budiyanto, 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*, 478(1), 012042.  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/478/1/012042>
- Ramu, S. & Jeyendran, R. S. (2013). The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. *Methods Mol. Biol.* 927, 21–25. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_3)
- Sánchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J., Isachenko, V., Kreinberg, R., & Isachenko, E. (2011). Canine sperm vitrification with sucrose: Effect on sperm function. *Andrologia*, 43(4), 233–241.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01054.x>
- Serrano A. M., Aquilina, M. C., Zak, L. J., Ellis, P. J., & Griffin, D. K. (2023). Successful recovery of motile and viable boar sperm after vitrification with different methods (pearls and mini straws) using sucrose as a cryoprotectant. *Cryobiology*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.104583>
- Sharafi, M., Borghei-Rad, S. M., Hezavehei, M., Shahverdi, A., & Benson, J. D. (2022). Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges, Applications, and Prospective Strategies. *Animals*, 12(23), 3271.  
<https://doi.org/10.3390/ani12233271>



- Silagadze, D. (2022). Major Challenges of Agriculture. *Georgian scientists*.  
<https://doi.org/10.52340/g.s.2022.04.02.11>
- Sun, L., Fan, W., Wu, C., Zhang, S., Dai, J., & Zhang, D. (2020). Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology*, 92, 146–150.  
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.12.004>

- Younan, G., Shehab El-Din, A., Abdel, K. A., El-Sherbieny, M., & Helmy, A. (2021). Soybean Lecithin as an Alternative to Egg Yolk in Tris-Based Extender of Cryopreserved Apri Rabbit Semen. *Journal of Animal and Poultry Production*, 12(1), 47–54.  
<https://doi.org/10.21608/jappmu.2021.149460>