Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ
Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học
ISSN 1859-2333 | e-ISSN 2815-5599

DOI:10.22144/ctujos.2026.224

ẢNH HƯỞNG CỦA HEPES ĐẾN CHẤT LƯỢNG TINH TRÙNG HEO PHA LOÃNG BẰNG DUNG DỊCH BELTSVILLE THAWING SOLUTION (BTS)

Hồ Thiệu Khôi*, Võ Công Thi, Ngô Anh Thư, Nguyễn Thị Ánh Hậu và Hồ Quảng Đồ
Khoa Chăn nuôi, Trường Nông nghiệp, Đại học Cần Thơ, Việt Nam
**Tác giả liên hệ (Corresponding author): htkhoi@ctu.edu.vn*

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 22/01/2026
Sửa bài (Revised): 09/03/2026
Duyệt đăng (Accepted): 27/09/2026

Title: *Effects of HEPES on the quality of boar sperm diluted in Beltsville Thawing Solution (BTS)*

Author(s): *Ho Thieu Khoi*, Vo Cong Thi, Ngo Anh Thu, Nguyen Thi Anh Hau and Ho Quang Do*

Affiliation(s): *Department of Animal Sciences, College of Agriculture, Can Tho University, Viet Nam*

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm so sánh hiệu quả của hai môi trường bảo quản tinh trùng heo gồm BTS (Beltsville Thawing Solution) và BTS được thay thế hệ đệm bicarbonate bằng HEPES (BTSH) trong quá trình bảo quản ở 17°C trong 96 giờ. Các chỉ tiêu được đánh giá gồm pH, áp suất thẩm thấu, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn màng (HOST) và các chỉ số vận động tinh trùng được phân tích bằng hệ thống CASA. Kết quả cho thấy môi trường BTSH duy trì pH và áp suất thẩm thấu ổn định hơn, đồng thời cải thiện rõ rệt hoạt lực và tỷ lệ sống của tinh trùng so với BTS ($p < 0,05$), qua đó giúp hạn chế các biến động bất lợi của môi trường pha loãng trong suốt quá trình bảo quản. Sau 96 giờ bảo quản, BTSH đạt tỷ lệ sống 73,67 ± 0,88% và hoạt lực 76,01 ± 1,79%, vượt trội hơn so với BTS. Việc tổng hợp kết quả cho thấy BTSH là môi trường phù hợp nhất cho bảo quản tinh trùng heo ở 17°C đến 96 giờ, giúp duy trì chất lượng tổng thể, khả năng vận động và tính ổn định của màng tinh trùng trong suốt quá trình bảo quản.

Từ khóa: *BTS, HEPES, môi trường bảo quản, tinh trùng heo*

ABSTRACT

This study compared the effectiveness of two semen extenders: Beltsville Thawing Solution (BTS) and a modified BTS in which sodium bicarbonate was replaced with HEPES buffer (BTSH) during storage at 17°C for 96 h. The evaluated parameters included pH, osmotic pressure, sperm viability, membrane integrity assessed by the HOST, and sperm motility characteristics analyzed using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system. The results demonstrated that BTSH maintained more stable pH and osmotic pressure, while significantly improving sperm motility and viability compared with BTS ($p < 0.05$), thereby reducing unfavorable fluctuations in the semen extenders throughout the storage period. After 96 hours of storage, BTSH achieved a viability of 73.67 ± 0.88% and total motility of 76.01 ± 1.79%, which were markedly higher than those obtained with BTS. Overall, the findings indicate that BTSH is the most suitable extender for boar semen storage at 17°C for up to 96 hours, effectively preserving overall sperm quality, motility, and plasma membrane stability throughout the storage duration.

Keywords: *BTS, boar semen, extenders, HEPES*

1. GIỚI THIỆU

Gieo tinh nhân tạo được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi heo ở Việt Nam (Dang-Nguyen et al., 2010). Với mục đích làm tăng năng suất sinh sản của heo đực, kiểm soát và cải tiến di truyền giống, chất lượng và tính đồng đều của đàn heo thương phẩm. Bên cạnh đó, thụ tinh nhân tạo (TTNT) trên heo là một phương pháp tốn rất ít chi phí và đỡ tốn công di chuyển, tránh sự mất sức của heo đực và từ đó kéo dài thời gian khai thác (Dang-Nguyen et al., 2010). Việc sử dụng tinh trùng bảo quản pha loãng để thụ tinh nhân tạo không chỉ giúp khai thác tối đa tiềm năng di truyền của heo đực giống mà còn giảm nguy cơ lây truyền mầm bệnh từ heo đực sang nái, đồng thời tăng cường an toàn sinh học trong trang trại hoặc hộ chăn nuôi (Keeratikunakorn et al., 2024). Tuy nhiên, hiệu quả của kỹ thuật TTNT phụ thuộc chủ yếu vào chất lượng tinh trùng trong quá trình bảo quản, mà yếu tố quyết định hàng đầu là môi trường pha loãng. Trong thực tế, môi trường Beltsville thawing solution (BTS) là một trong những dung dịch pha loãng tinh trùng được sử dụng phổ biến tại các trung tâm thụ tinh nhân tạo nhờ công thức đơn giản, dễ pha chế và chi phí thấp (Johnson et al., 2000). Kết quả nghiên cứu gần đây của Ho et al. (2023) cho thấy trong quá trình bảo quản tinh trùng heo ở 17°C, môi trường BTS có xu hướng giảm dần khả năng duy trì chất lượng tinh trùng, dẫn đến giảm hoạt lực và tỷ lệ tinh trùng sống rõ rệt sau 72 giờ so với các môi trường khác như Modena (Khôi và ctv., 2023). Bên cạnh đó, Sodium bicarbonate là hệ đệm truyền thống trong môi trường pha loãng tinh trùng heo BTS, nhưng khả năng ổn định pH của nó phụ thuộc mạnh vào nhiệt độ và hàm lượng CO_2 hòa tan, trong điều kiện bảo quản ở 17°C thì sự dao động CO_2 dễ khiến pH môi trường thay đổi, làm ảnh hưởng đến quá trình điều hòa ion và khả năng duy trì hoạt động trao đổi chất của tinh trùng. Ngoài ra, bicarbonate còn tham gia kích hoạt sớm quá trình capacitation bằng cách gây thay đổi nhanh và có thể đảo ngược trong cấu trúc lipid của màng plasma tinh trùng (Harrison et al., 1996). Vì vậy, để đảm bảo tỷ lệ thụ thai cao, tinh trùng cần được pha loãng trong môi trường có khả năng duy trì cân bằng nội bào, ổn định pH và cung cấp đủ năng lượng cho hoạt động của tinh trùng trong suốt quá trình bảo quản (Dziekońska et al., 2017; Henning et al., 2022). Để khắc phục hạn chế này, Good et al. (1966) đã sử dụng HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazineethanesulfonic acid) là một chất đệm sinh học có khả năng duy trì pH ổn định trong điều kiện không có CO_2 vào môi trường BTS. HEPES hoạt động trong khoảng pH 6,8 đến 8,2 giúp ổn định hệ đệm bicarbonate, hạn chế stress oxy hóa và tổn thương màng tế bào tinh trùng (Kwon et al., 2017).

Do đó, thí nghiệm này được tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của HEPES đến tỷ lệ sống, hoạt lực, pH, áp suất thẩm thấu, tính toàn vẹn màng và các chỉ tiêu vận động tinh trùng bằng hệ thống CASA trong quá trình bảo quản ở 17°C trong khoảng thời gian 96 giờ.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm

Thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Kỹ thuật chăn nuôi gia súc độc vị, thuộc Khoa Chăn nuôi, Trường Nông nghiệp, Đại học Cần Thơ. Thời gian nghiên cứu từ tháng 8/2025 đến tháng 11/2025.

2.2. Đối tượng thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện với tinh nguyên từ ba con heo đực giống Duroc tại trại chăn nuôi heo Thành phố Cần Thơ. HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (BioBasic Canada) được sử dụng trong quá trình thí nghiệm để đảm bảo các điều kiện cần thiết cho nghiên cứu.

2.3. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên với hai nghiệm thức và ba lần lặp lại. Tinh trùng sau khi pha loãng được đánh giá theo các chỉ tiêu: hoạt lực, tỷ lệ sống, áp suất thẩm thấu, pH và tính toàn vẹn màng tinh trùng. Các đánh giá này được thực hiện tại các mốc thời gian 0 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ sau khi bảo quản.

Nghiệm thức 1: BTS truyền thống (có chất sodium bicarbonate).

Nghiệm thức 2: BTSH (thay thế sodium bicarbonate bằng HEPES).

Thành phần của dung dịch bảo quản BTS được thực hiện theo công thức của Gadea (2003) và có chất HEPES.

Bảng 1. Thành phần của dung dịch bảo quản

Thành phần g/L	BTS	BTSH
Nước cất (ml)	1000	1000
Glucose (g)	37	37
Sodium Citrate (g)	6	6
EDTA (g)	1,25	1,25
Sodium bicarbonate (g)	1,25	0
HEPES (g)	0	5,41
Potassium chloride (g)	0,75	0,75

2.4. Phương pháp pha loãng tinh trùng

Các mẫu tinh dịch được khai thác từ heo đực Duroc khỏe mạnh tại trại chăn nuôi, nơi các cá thể được nuôi dưỡng trong cùng điều kiện, được chăm sóc đầy đủ, có hệ thống máng ăn và máng uống riêng biệt và được tiêm phòng định kỳ. Ngay sau khi thu, tinh dịch được giữ ở 38°C để tránh hiện tượng sốc lạnh và nhanh chóng vận chuyển về phòng thí nghiệm bằng hộp cách nhiệt nhằm bảo đảm chất lượng mẫu.

Tinh trùng được pha loãng đến nồng độ 20×10^6 tinh trùng/mL. Nồng độ tinh trùng được xác định bằng Porcine Sperm Photometer III (Fujihika Industry, Tokyo, Japan). Chỉ những mẫu tinh dịch đạt các tiêu chuẩn chất lượng theo TCVN 9111:2011 (hoạt lực > 80%, tỷ lệ kỳ hình < 15%, mật độ tinh trùng > 250 triệu tinh trùng/ml) mới được đưa vào nghiên cứu. Sau khi kiểm tra chất lượng, tinh trùng được pha loãng với dung dịch bảo quản. Mẫu tinh dịch sau khi pha loãng được bảo quản ở 17°C, nhưng trước đó được để ở nhiệt độ phòng (32°C) trong 30 phút, tiếp đó ở 25°C trong 30 phút để ổn định trước khi đặt vào tủ bảo quản 17°C (BioPlus ER500, Gram-biolin, Vojens, Denmark). Mẫu được bảo quản tránh tiếp xúc với ánh sáng và sau đó được kiểm tra các chỉ tiêu theo dõi. Trước khi tiến hành đo lường, mẫu tinh trùng được ủ ở nhiệt độ 38°C trong 30 phút nhằm đảm bảo điều kiện tương tự môi trường sinh lý của cơ thể.

2.5. Phân tích các thông số vận động tinh trùng (CASA)

Các thông số vận động của tinh trùng được phân tích bằng hệ thống CASA thông qua việc ghi nhận và theo dõi quỹ đạo di chuyển của từng tinh trùng. Từ các quỹ đạo này, hệ thống tính toán các chỉ tiêu động học đặc trưng của tinh trùng. Hình 1 minh họa các quỹ đạo di chuyển được ghi nhận trong quá trình phân tích.

Hệ thống được hiệu chuẩn 0,481 µm/pixel, kích thước tế bào phát hiện 1 – 5 µm². Tinh trùng tiến thẳng được xác định khi STR ≥ 15% và VAP ≥ 60 µm/s. Các thông số theo dõi chuyển động gồm tốc độ ghi hình 25 khung hình/giây, chiều dài quỹ đạo tối thiểu 10 khung hình, khoảng dịch chuyển tối đa giữa hai khung hình 25 µm và cửa sổ phân tích 4 khung hình.

Các chỉ tiêu về hoạt lực của tinh trùng như vận tốc đường cong (VCL), vận tốc đường thẳng (VSL) và vận tốc đường trung bình (VAP) được ghi nhận; từ đó, các tỷ lệ thẳng tiến (LIN = VSL/VCL, STR = VSL/VAP, WOB = VAP/VCL), biên độ dao động đầu (ALH), tần số giao cắt (BCF) và tỉ lệ tinh trùng di động tổng số (%) được xác định bằng Open CASA v2 Plugin trên ImageJ (https://imagej.net/ij/) (Alquézar-Baeta et al., 2019).

Hình 1. Quỹ đạo di chuyển (tracks) của tinh trùng

2.6. Phương pháp xác định tỷ lệ sống của tinh trùng bằng nhuộm Eosin – Nigrosin

Tỷ lệ sống - chết của tinh trùng được xác định bằng phương pháp nhuộm Eosin - Nigrosin, một kỹ thuật nhuộm phân biệt dựa trên tính toàn vẹn của màng sinh chất. Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của Kondracki et al. (2017) với một số điều chỉnh phù hợp cho tinh dịch heo bảo quản trong hai thí nghiệm. Mỗi mẫu tinh dịch được trộn với dung dịch nhuộm theo tỷ lệ 1:1 bằng cách nhỏ 10 µL tinh dịch vào 10 µL hỗn hợp Eosin 1% và Nigrosin 10%; sau đó hỗn hợp được trộn nhẹ bằng đầu pipette. Hỗn hợp được trải thành lớp mỏng trên lam kính, để khô tự nhiên trong không khí rồi quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 40×. Tinh trùng chết (màng bị tổn thương) bắt màu đỏ của Eosin, trong khi tinh trùng sống (màng còn nguyên vẹn) không bắt màu, chỉ được nhuộm nền tối bởi Nigrosin giúp tăng độ tương phản khi quan sát. Mỗi lam được đếm tối thiểu 200 tinh trùng và mỗi mẫu được lặp lại ba lần,; sau đó, giá trị trung bình được lấy để đảm bảo độ chính xác và độ lặp lại của phép đo. Tỷ lệ tinh trùng sống được biểu thị theo phần trăm dựa trên tổng số tinh trùng quan sát.

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \left(\frac{\textit{Số tinh trùng không bắt màu}}{\textit{Tổng số tinh trùng}}\right) \times 100$$

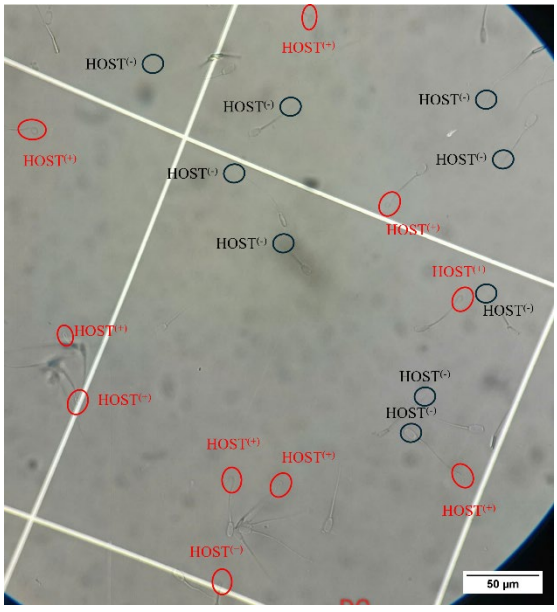
2.7. Độ pH của tinh trùng pha loãng

Tinh dịch heo đực có pH hơi kiềm yếu, dao động từ 7,2 đến 7,5. Sự thay đổi pH ngoài khoảng này, dù thấp hơn hay cao hơn, có thể làm chậm quá trình trao đổi chất và di chuyển của tinh trùng, ảnh hưởng bất lợi đến sức sống và khả năng thụ thai (Rigau et al., 1996). Trong thí nghiệm này, pH được đo bằng máy đo pH Hi98100 Checker Plus (Hi98100, Hanna

Instruments, Romania), sau khi chuẩn độ với các dung dịch chuẩn pH 4,00 và 7,00.

2.8. Đánh giá tính toàn vẹn màng sinh chất tinh trùng pha loãng

Tính toàn vẹn của màng tế bào được đánh giá bằng phương pháp trương phồng nhược thẩm thấu (HOST) theo mô tả của Osinowote et al. (1982). Thí nghiệm được thực hiện bằng cách trộn 100 µl tinh dịch với 100 µl dung dịch sưng giảm thẩm thấu có nồng độ 150 mOsm (bao gồm 7,35 g sodium citrate và 13,51 g fructose trong 1000 ml nước cất) theo Revell and Mrode (1994). Sau khi ủ ở 37°C trong 60 phút, sự sưng giảm của tinh trùng được kiểm tra bằng cách đặt 15µL hỗn hợp mẫu lên lam kính ấm (37°C) và quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 40× và ánh sáng tương phản. Tinh trùng được phân loại là bình thường hoặc bất thường dựa vào sự phồng hoặc cong của đuôi. Tỷ lệ tinh trùng có đuôi sưng phồng và cuộn tròn được ghi nhận, là tinh bình thường (nguyên vẹn màng).



Hình 2. Tinh trùng phồng đuôi

Tính toàn vẹn màng sinh chất

$$(\%) = \left(\frac{\textit{Tổng số con phình đuôi}}{\textit{Tổng số con đếm được}}\right) \times 100$$

2.9. Xử lý số liệu

Tất cả số liệu của thí nghiệm được nhập vào Microsoft Excel và phân tích thống kê bằng phép Paired t-test nhằm so sánh sự khác biệt giữa hai nghiệm thức tại cùng một thời điểm. Việc phân tích được thực hiện bằng phần mềm Minitab 16 theo mô hình so sánh cặp giá trị phụ thuộc. Sự khác biệt được xem là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

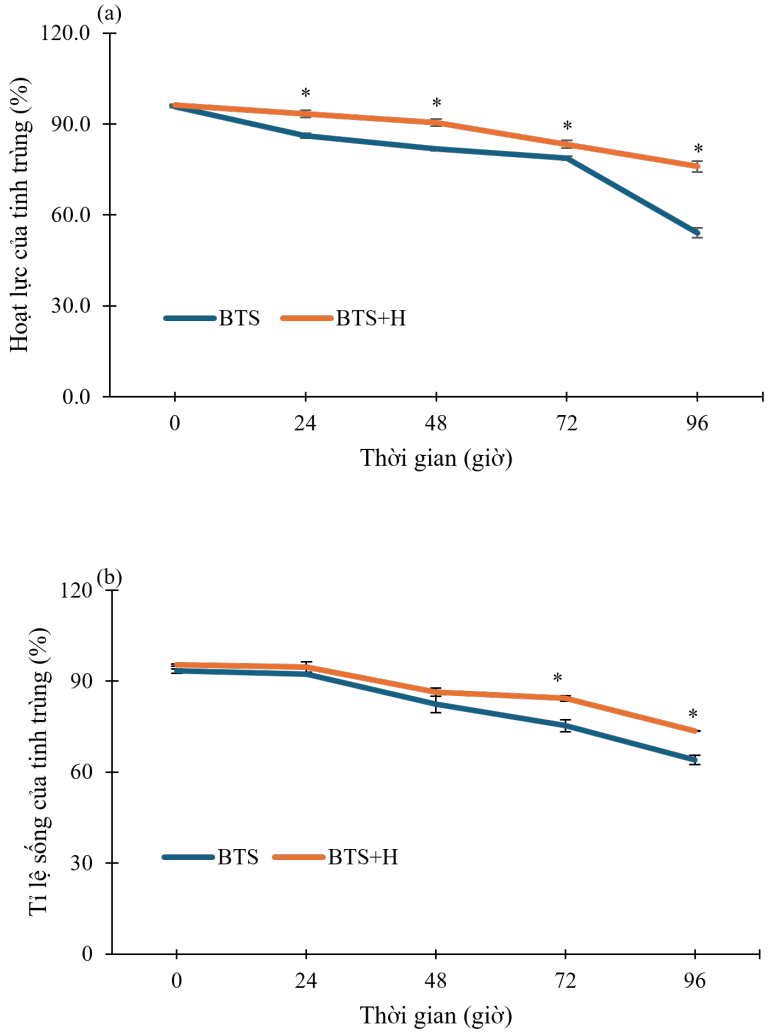
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của việc thay thế HEPES lên tỷ lệ sống và hoạt lực của tinh trùng pha loãng

Hoạt lực tinh trùng ở cả hai nghiệm thức đều giảm dần sau 96 giờ bảo quản (Hình 3a). Tại thời điểm 0 giờ, tinh trùng của BTS (95,8 ± 0,30%) và BTSH (96,3 ± 0,17%) không khác biệt đáng kể (P = 0,373). Tuy nhiên, từ 24 giờ trở đi, BTSH luôn duy trì hoạt lực tinh trùng cao hơn có ý nghĩa thống kê so với BTS ($p < 0,05$). Cụ thể, hoạt lực tinh trùng ở 24 giờ BTSH đạt 93,4 ± 1,25% so với 86,2 ± 0,85% của BTS, đến 48 giờ thì hoạt lực tinh trùng của hai nghiệm thức BTSH và BTS lần lượt là 90,5 ± 1,15% và 81,8 ± 0,52%. Sự khác biệt về hoạt lực tinh trùng của hai nghiệm thức tiếp tục duy trì tại 72 giờ, BTSH (83,3 ± 1,26%) so với BTS (78,8 ± 0,70%) ($p < 0,05$). Đặc biệt rõ rệt ở 96 giờ, khi hoạt lực tinh trùng BTSH vẫn còn 76,01 ± 1,79%, cao hơn đáng kể so với BTS (54,1 ± 1,58%, P = 0,010). Chỉ tiêu tỷ lệ sống được thể hiện ở Hình 3b cũng có xu hướng tương tự hoạt lực. Ở thời điểm ban đầu, tỷ lệ sống của tinh trùng ở nghiệm thức BTS (93,3 ± 0,67%) và BTSH (95,3 ± 0,33%) khác biệt không có ý nghĩa thống kê (P = 0,184). Từ 24 giờ đến 48 giờ, sự khác biệt về tỷ lệ sống của tinh trùng chưa rõ ràng giữa hai nghiệm thức ($p > 0,05$). Tuy nhiên, tại 72 giờ, BTSH duy trì tỷ lệ sống của tinh trùng cao hơn đáng kể (73,7 ± 1,33%) so với BTS (67,3 ± 2,03%, P = 0,012). Ở 96 giờ, nhóm nghiệm thức thay thế HEPES (73,8 ± 0,88%) tiếp tục duy trì tỷ lệ sống của tinh trùng cao hơn nhóm không thay thế BTS (64,0 ± 1,53%) ($p < 0,05$).

Kết quả cho thấy việc thay thế sodium bicarbonate bằng HEPES trong môi trường BTS đã tăng khả năng duy trì hoạt lực và tỷ lệ sống của tinh trùng heo bảo quản ở 17°C, phù hợp với ghi nhận của Murase et al. (2010). Đồng thời, xu hướng cải thiện này cũng phù hợp với kết quả trên tinh trùng gà, khi thay thế HEPES vào dung dịch IGGKPh giúp tăng hoạt lực rõ rệt so với đối chứng (Buathalad et al., 2025). Điều này cho thấy hiệu quả ổn định pH của HEPES có thể được ghi nhận trên nhiều loài có đặc điểm tinh trùng nhạy cảm với biến động môi trường. HEPES là một chất đệm sinh học có khả năng ổn định pH tốt hơn so với hệ đệm phosphate hoặc bicarbonate truyền thống, đặc biệt trong điều kiện bảo quản kéo dài. Khi môi trường bảo quản giữ pH ổn định, stress oxy hóa, tính toàn vẹn và chức năng của màng tinh trùng được cải thiện, từ đó làm

chậm quá trình giảm vận động và chết của tinh trùng theo thời gian (Will et al., 2011; Chanapiwat & Kaeoket, 2016). Điều này lý giải vì sao sự khác biệt giữa hai môi trường chưa xuất hiện tại thời điểm 0 đến 24 giờ mà trở nên rõ ràng hơn từ 48 giờ trở đi, khi những tác động tích lũy của sự mất cân bằng pH ở môi trường BTS biểu hiện rõ rệt hơn. Ngoài ra, khả năng HEPES hỗ trợ ổn định cấu trúc màng và tăng sự ổn định của áp suất thẩm thấu theo thời gian cũng góp phần kéo dài tuổi thọ của tinh trùng trong điều kiện bảo quản lỏng.



Hình 3. Ảnh hưởng của HEPES lên hoạt lực (a) và tỷ lệ sống (b) của tinh trùng pha loãng được bảo quản từ 0 đến 96 giờ

*Ghi chú: *: $p < 0,05$.*

Tóm lại, BTSH cho thấy hiệu quả vượt trội so với BTS thông thường trong việc bảo quản tinh trùng heo ở 17°C. BTSH giúp duy trì hoạt lực và tỷ lệ sống của tinh trùng cao hơn một cách ổn định, đặc biệt từ 48 giờ trở đi và rõ rệt nhất ở 96 giờ. Qua đó, HEPES góp phần nâng cao chất lượng liều tinh khi bảo quản kéo dài trong sản xuất tinh đông lạnh hoặc tinh dịch thương mại. Từ sự khác biệt đáng kể về hoạt lực, việc đánh giá thêm các chỉ tiêu khác cần tiếp tục được thực hiện như HOST, pH, áp suất thẩm thấu và các chỉ tiêu vận động (CASA) tại các mốc thời gian đã chọn. Cách làm này giúp xác định xem ưu điểm của BTSH có thật sự ổn định và thể hiện

đồng đều trên nhiều khía cạnh chất lượng tinh trùng hay không.

3.2. Ảnh hưởng của việc thay thế HEPES lên các chỉ tiêu vận động của tinh trùng pha loãng

Các chỉ tiêu vận động CASA gồm VSL, VCL, VAP, LIN, WOB, STR, ALH và BCF giữa hai nghiệm thức BTS và BTSH ở các thời điểm 0, 48 và 96 giờ được trình bày ở Bảng 2. Tại thời điểm 0 giờ, hầu hết các chỉ tiêu vận động CASA gồm VSL, VCL, VAP, LIN, WOB, STR, ALH và BCF giữa hai nghiệm thức BTS và BTSH khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Các chỉ tiêu vận động CASA tại thời điểm ban đầu giữa hai nghiệm thức gần như tương đương nhau, cho thấy chất lượng tinh trùng đầu vào đồng nhất và thí nghiệm không xuất hiện sai lệch ban đầu trong phân bố mẫu. Cụ thể, VSL đạt 43,4 ± 1,72 µm/s ở nghiệm thức BTS và 44,0 ± 1,39 µm/s ở nghiệm thức BTSH ($P = 0,850$), VCL lần lượt là 155 ± 1,03 µm/s (BTS) và 156 ± 0,94 µm/s (BTSH) ($P = 0,360$). Đến 48 giờ, VCL cao hơn ở BTSH (149 ± 0,69 µm/s) so với BTS (128 ± 6,09 µm/s), dù mức chênh lệch không có ý nghĩa thống kê ($P = 0,067$). Đặc biệt, VSL tại 48 giờ của nghiệm thức BTSH tăng lên 33,5 ± 0,87 µm/s và cao hơn so với nghiệm thức BTS 25,5 ± 0,34 µm/s ($P = 0,021$), ALH ở BTSH cũng cao hơn đáng kể đạt 3,88 ± 0,03 µm/s so với 3,22 ± 0,05 µm/s ở BTS ($P = 0,004$), BCF cũng cao hơn có ý nghĩa thống kê ở BTSH (17,0 ± 0,30 Hz) so với BTS (14,5 ± 0,37 Hz; $P = 0,006$). Đến thời điểm 96 giờ, hầu hết giá trị vận động ở BTSH có xu hướng cao hơn so với BTS, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Chẳng hạn, VSL của nghiệm thức BTSH đạt 20,5 ± 0,71 µm/s so với 15,4 ± 2,22 µm/s ở nghiệm thức BTS; VAP cũng cao hơn 29,9 ± 2,78 µm/s (BTSH) so với 28,5 ± 4,59 µm/s (BTS). Các chỉ tiêu định hướng chuyển động như LIN và STR ở BTSH vẫn được duy trì ở mức ổn định hơn. Đáng chú ý, ALH và BCF giảm ở cả hai nghiệm thức ở thời điểm 96 giờ khi so với 0 giờ. Đặc biệt, WOB ở nghiệm thức BTSH đạt 42,7 ± 0,99%, cao hơn so với 30,8 ± 0,45% ở nghiệm thức BTS và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P = 0,003$). Tương tự, VCL ở nghiệm thức BTSH cũng cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức BTS (126 ± 1,69 µm/s so với 108 ± 2,68 µm/s; $P = 0,046$).

Các chỉ tiêu vận động giữa hai nghiệm thức tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm trong nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu được ghi nhận bởi Hackerova et al. (2025). Điều này cho thấy hệ thống CASA và kỹ thuật tiến hành thí nghiệm được thực hiện tốt và đạt các tiêu chuẩn về nghiên cứu tinh trùng trong phòng thí nghiệm. Nhưng đến 96 giờ thì hầu hết giá trị vận động ở BTSH đều duy trì tốt hơn, đặc biệt là VCL và WOB có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. pH nội bào của tinh trùng thay đổi theo pH của môi trường bảo quản, quá trình đường phân làm nội bào bị acid hóa, từ đó đồng thời làm giảm chuyển hóa năng lượng, giảm khả năng vận động và suy giảm chức năng sống của tinh trùng (Hackerova et al., 2025). Kết quả này phù hợp với các báo cáo trước đây, khi việc thay thế HEPES được chứng minh là góp phần cải thiện chất lượng vận động và tính toàn vẹn của màng tinh trùng trong quá trình bảo quản (Guthrie & Welch, 2012). Như vậy, việc thay thế HEPES vào môi trường BTS giúp tinh trùng duy trì vận động ổn định hơn trong bảo quản dài ngày, thể hiện hiệu quả rõ rệt từ sau 48 đến 96 giờ.

Tóm lại, dữ liệu CASA cho thấy HEPES cải thiện khả năng duy trì các thông số vận động so với đối chứng khi bảo quản đến 96 giờ, qua đó có thể thấy rằng HEPES có thể là thành phần hữu ích trong việc duy trì pH đối với dung dịch bảo quản môi trường tinh trùng heo. Những kết quả này cũng đặt ra gợi ý cần xem xét sâu hơn các tác động sinh lý mà HEPES có thể gây ra lên tinh trùng heo pha loãng, bao gồm các chỉ tiêu như pH và HOST.

Bảng 2. Ảnh hưởng HEPES lên các chỉ tiêu vận động của tinh trùng pha loãng được xác định bằng hệ thống CASA

Chỉ tiêu	Nghiệm thức		P
	BTS	BTSH	
	0 giờ		
VSL (µm/s)	43,4 ± 1,72	44,03 ± 1,39	0,850
VCL (µm/s)	155 ± 1,03	156 ± 0,94	0,360
VAP (µm/s)	82,9 ± 1,63	85,0 ± 1,60	0,323
LIN (%)	24,1 ± 1,40	26,4 ± 1,40	0,457
WOB (%)	49,1 ± 0,91	50,8 ± 1,04	0,054
STR (%)	43,5 ± 0,58	43,6 ± 0,74	0,900
ALH (µm/s)	4,24 ± 0,25	4,45 ± 0,30	0,309

Chỉ tiêu	Nghiệm thức		P
	BTS	BTSH	
BCF (Hz)	17,4 ± 0,17	17,9 ± 0,58	0,417
24 giờ			
VSL (µm/s)	37,2 ± 0,85	36,3 ± 1,08	0,683
VCL (µm/s)	149 ± 0,55	151 ± 0,82	0,018
VAP (µm/s)	75,1 ± 0,08	75,4 ± 2,54	0,907
LIN (%)	21,5 ± 1,05	24,6 ± 1,07	0,280
WOB (%)	43,0 ± 0,10	45,1 ± 2,09	0,444
STR (%)	32,7 ± 0,04	41,1 ± 0,32	0.002
ALH (µm/s)	3,92 ± 0,03	4,22 ± 0,36	0,486
BCF (Hz)	15,6 ± 0,36	17,3 ± 0,24	0,032
48 giờ			
VSL (µm/s)	25,5 ± 0,34	33,5 ± 0,87	0,021
VCL (µm/s)	128 ± 6,09	149 ± 0,69	0,067
VAP (µm/s)	66,3 ± 1,39	72,3 ± 2,76	0,225
LIN (%)	14,7 ± 1,12	19,2 ± 0,51	0,105
WOB (%)	34,5 ± 2,77	43,2 ± 2,59	0,077
STR (%)	30,3 ± 0,33	35,8 ± 2,46	0,128
ALH (µm/s)	3,22 ± 0,05	3,88 ± 0,03	0,004
BCF (Hz)	14,5 ± 0,37	17,0 ± 0,30	0,006
72 giờ			
VSL (µm/s)	21,7± 0,23	28,3 ± 1,36	0,032
VCL (µm/s)	111 ± 4,87	136 ± 1,46	0,044
VAP (µm/s)	61,8 ± 1,15	68,4 ± 3,1	0,140
LIN (%)	13,6 ± 0,62	17,3 ± 0,90	0,132
WOB (%)	32,2 ± 1,70	45,4 ± 1,24	0,041
STR (%)	29,4 ± 0,32	28,0 ± 1,95	0,526
ALH (µm/s)	3,09 ± 0,05	3,81 ± 0,02	0,006
BCF (Hz)	13,1 ± 0,93	17,0 ± 0,77	0,107
96 giờ			
VSL (µm/s)	15,4 ± 2,22	20,5 ± 0,71	0,192
VCL (µm/s)	108 ± 2,68	126 ± 1,69	0,046
VAP (µm/s)	58,0 ± 0,54	59,9 ± 2,78	0,610
LIN (%)	12,2 ± 1,73	14,8 ± 0,85	0,128
WOB (%)	30,8 ± 0,45	42,7 ± 0,99	0,003
STR (%)	26,8 ± 1,16	27,5 ± 0,95	0,615
ALH (µm/s)	2,38 ± 0,50	3,47 ± 0,09	0,200
BCF (Hz)	12,4 ± 1,01	15,8 ± 0,50	0,076

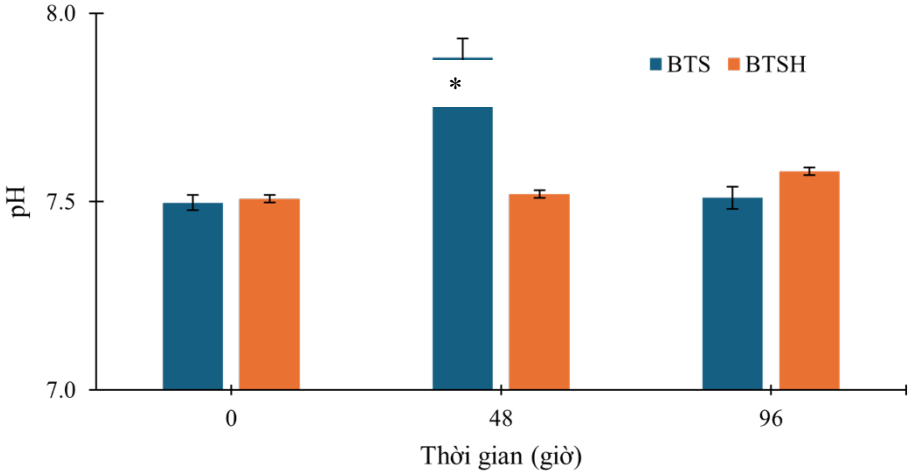
Ghi chú: So sánh giữa hai nghiệm thức tại cùng thời điểm được thực hiện bằng phép kiểm Paired t-test. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P < 0,05. VSL: vận tốc đường thẳng, VCL: vận tốc đường cong, VAP: vận tốc trung bình theo quỹ đạo, LIN: độ thẳng của quỹ đạo di chuyển, WOB: độ ổn định của quỹ đạo, STR: độ thẳng tiến, ALH: biên độ dao động đầu, BCF: tần số vung đuôi.

3.3. Ảnh hưởng của việc thay thế HEPES lên pH của tinh trùng heo pha loãng

Giá trị pH của hai nghiệm thức thí nghiệm sau 96 giờ bảo quản được thể hiện ở Hình 4. Giá trị pH của hai nghiệm thức ở 0 giờ có giá trị lần lượt là BTS (7,50 ± 0,02) và BTSH (7,51 ± 0,01), khác biệt không có ý nghĩa thống kê (P > 0,05) (Hình 3). Giá trị pH tại thời điểm 48 giờ ở nghiệm thức BTS tăng lên mức 7,88 ± 0,05 cao hơn đáng kể so với BTSH (7,52 ± 0,01) (P = 0,022). Điều này phản ánh hiện tượng kiềm hóa môi trường trong BTS truyền thống là một quá trình thường gặp khi tinh trùng chuyển hóa năng lượng, tạo ra sản phẩm phụ làm thay đổi cân bằng acid-base trong dung dịch bảo quản. Tuy nhiên, tại thời điểm 96 giờ, giá trị pH của BTS giảm xuống còn 7,51 ± 0,03, trong khi BTSH đạt 7,58 ± 0,01; sự khác biệt giữa hai nghiệm thức không khác biệt có ý nghĩa thống kê (P = 0,109).

Việc thay thế HEPES giúp giảm đáng kể sự dao động pH sau 48 giờ bảo quản, đồng thời duy trì xu hướng ổn định pH tốt hơn ở các thời điểm kéo dài. Hiệu quả này xuất phát từ đặc tính của HEPES là một zwitterionic buffer có pKa gần pH sinh lý và gần như không phụ thuộc vào CO_2, nhờ đó hạn chế sự thay đổi ion H^+ và giữ môi trường bảo quản ổn định hơn. Kết quả này phù hợp với các báo cáo trước, trong đó HEPES được chứng minh có khả năng duy trì pH ở một số dung dịch bảo quản dài hạn (Gadea, 2003). Thêm vào đó, kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy nghiệm thức có pH 7,8 làm giảm hoạt lực của tinh trùng heo so với nghiệm thức pH 7,4 (Rivas et al., 2022). Môi trường pha loãng tinh dịch điều hòa pH nội bào của tinh trùng heo và góp phần duy trì tinh trùng ở trạng thái vận động và chuyển hóa bị ức chế trong quá trình bảo quản, từ đó giúp bảo tồn sức sống và chức năng của tinh trùng theo thời gian (Park et al., 2021).

Như vậy, việc thay thế HEPES vào môi trường BTS là giải pháp hiệu quả để kiểm soát dao động pH trong suốt quá trình bảo quản tinh trùng và đặc biệt ở giai đoạn 48 giờ. Do đó, sự ổn định pH tốt hơn ở nghiệm thức BTSH cho thấy việc thay thế HEPES giúp hạn chế biến động sinh lý của môi trường, từ đó hỗ trợ cải thiện điều kiện bảo quản tinh trùng. Chính cơ chế ổn định này cũng gợi ý khả năng HEPES tiếp tục ảnh hưởng tích cực lên các yếu tố liên quan đến cân bằng nội bào, đặc biệt là HOST.



Hình 4. Ảnh hưởng của HEPES lên pH của tinh trùng pha loãng

*Ghi chú: *: P < 0,05).*

3.4. Ảnh hưởng của việc thay thế HEPES lên tính toàn vẹn màng sinh chất của tinh trùng heo pha loãng

Tại thời điểm 0 giờ, các chỉ tiêu HOST của tinh trùng ở hai nghiệm thức BTS và BTSH khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05) (Bảng 3 và Bảng 4). Tỷ lệ màng tinh trùng còn nguyên vẹn (HOST) cũng tương đối cao, lần lượt đạt 94,0 ± 1,15% ở BTS và 97,3 ± 0,33% ở BTSH (P = 0,149). Đến 48 giờ, HOST đạt 78,0 ± 1,00% ở BTSH, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với BTS (70,7 ± 0,88%; P = 0,015). Tuy nhiên, sau 96 giờ bảo quản thì HOST giảm đáng kể theo thời gian ở cả hai nghiệm thức, chỉ còn 60,0 ± 4,73% ở BTS và 74,0 ± 1,00% ở BTSH và khác biệt không có ý nghĩa thống kê (P = 0,094).

Bảng 3. Ảnh hưởng của HEPES lên tính toàn vẹn màng sinh chất của tinh trùng (%)

Thời gian (giờ)	Nghiệm thức		P
	BTS	BTSH	
0	94,0 ± 1,15	97,3 ± 0,33	0,149
24	85,0 ± 3,21	90,67 ± 0,88	0,092
48	70,7 ± 0,88	78,0 ± 1,00	0,015
72	67,67 ± 2,03	78,33 ± 1,86	0,024
96	60,0 ± 4,73	74,0 ± 1,00	0,094

Ghi chú: So sánh giữa hai nghiệm thức tại cùng thời điểm được thực hiện bằng phép kiểm Paired t-test. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức p < 0,05.

Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy tính toàn vẹn màng của tinh trùng ở cả hai nghiệm thức giảm rõ rệt sau 96 giờ bảo quản và HEPES tăng tính toàn vẹn của màng tinh trùng. HEPES là một chất đệm hữu cơ lưỡng cực, đã được chứng minh giúp giảm dao động tổn thương màng trong môi trường pha loãng tinh trùng từ đó góp phần duy trì chất lượng và hoạt lực tinh trùng trong thời gian bảo quản kéo dài (Trentin et al., 2018). HEPES bảo vệ màng tinh trùng thông qua việc ổn định pH ngoại bào, hạn chế acid hóa nội bào, giảm sự hình thành peroxid hóa lipid, đồng thời duy trì hoạt động của các protein màng (Trentin et al., 2018). Nhờ đó, HEPES giúp duy trì tính toàn vẹn màng, khả năng vận động và sức sống của tinh trùng trong quá trình bảo quản. Giá trị về tính toàn vẹn màng trong nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu sử dụng BTS làm dung dịch bảo quản trên heo với thời gian bảo quản hơn 96 giờ (Matabane et al, 2017). Qua đó có thể thấy rằng việc thay thế HEPES vào môi trường BTS giúp bảo vệ tính toàn vẹn màng trong suốt 96 giờ bảo quản bằng cách ổn định pH, hạn chế peroxid hoá lipid và duy trì hoạt động màng, qua đó cải thiện khả năng sống và chất lượng tinh trùng.

4. KẾT LUẬN

Việc bổ sung HEPES vào môi trường BTS giúp duy trì hoạt lực, tỷ lệ sống và tính toàn vẹn màng sinh chất của tinh trùng heo tốt hơn so với BTS truyền thống, đặc biệt từ 24 giờ và rõ rệt tại 72 – 96 giờ bảo quản. HEPES cũng cải thiện một số chỉ tiêu vận động (VSL, ALH, BCF, WOB, VCL) và góp phần ổn định pH môi trường. Nhìn chung, HEPES có tác dụng tích cực trong việc bảo vệ chất lượng tinh trùng heo khi bảo quản ở 17°C trong 96 giờ. Mặc dù BTSH cho thấy khả năng cải thiện chất lượng tinh trùng heo trong điều kiện bảo quản 17°C đến 96 giờ nhưng nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế. Thí nghiệm chủ yếu đánh giá các chỉ tiêu in vitro, nên hiệu quả sinh sản thực tế in vivo chưa được kiểm chứng. Ngoài ra, việc phân tích các chỉ dấu sinh hóa như stress oxy hóa hoặc tổn thương DNA tinh trùng chưa được thực hiện; do đó, cơ chế bảo vệ của HEPES chưa được làm rõ đầy đủ. Trong các nghiên cứu tiếp theo, quy mô thí nghiệm cần được mở rộng và các chỉ tiêu sinh sản thực tế cần được đánh giá thêm để khẳng định hiệu quả ứng dụng của BTSH.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alquézar-Baeta, C., Gimeno-Martos, S., Miguel-Jiménez, S., Santolaria, P., Yániz, J., Palacín, I., Casao, A., Cebrián-Pérez, J. Á., Muiño-Blanco, T., & Pérez-Pé, R. (2019). *OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis*. *PLOS Computational Biology*, *15*(1), e1006691. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006691

Dang-Nguyen, T. Q., Tich, N. K., Nguyen, B. X., Ozawa, M., Kikuchi, K., Manabe, N., Ratky, J., Kanai, Y., & Nagai, T. (2010). Introduction of various Vietnamese indigenous pig breeds and their conservation by using assisted reproductive techniques. *The Journal of Reproduction and Development, 56*(1), 31–35. https://doi.org/10.1262/jrd.09-165k

Buathalad, K., Koedkanmark, T., Boonkum, W., & Chankitisakul, V. (2025). Optimizing rooster semen preservation: Effect of oxygen exposure, sample rotation, and HEPES buffer supplementation. *Animals*, *15*(16), 2391. https://doi.org/10.3390/ani15162391

Chanapiwat, P., & Kaeoket, K. (2016). The effect of adding antioxidants on quality of chilled boar semen. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, *46*(1), 83–90.

Dziekońska, A., Kinder, M., Fraser, L., Strzeżek, J., & Kordan, W. (2017). Metabolic activity of boar semen stored in different extenders supplemented with ostrich egg yolk lipoproteins. *Journal of Veterinary Research*, *61*(1), 127–132. https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0016

Gadea, J. (2003). Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *1*(2), 17–27. https://doi.org/10.5424/sjar/2003012-17

Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., & Singh, R. M. (1966). Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, *5*(2), 467–477. https://doi.org/10.1021/bi00866a011

Guthrie, H. D., & Welch, G. R. (2012). Effects of storage solutions on boar sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function. *Theriogenology*, *78*(2), 240–251.

Hackerova, L., Pilsova, A., Pilsova, Z., Zelenkova, N., Tymich Hegrova, P., Klusackova, B., Chmelikova, E., Sedmikova, M., Simonik, O., & Postlerova, P. (2025). Boar sperm motility assessment using computer-assisted sperm analysis: Current practices, limitations, and methodological challenges. *Animals*, *15*(3), 305. https://doi.org/10.3390/ani15030305

Harrison, R. A., Ashworth, P. J., & Miller, N. G. (1996). Bicarbonate/CO_2, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Molecular Reproduction and*

Development, *45*(3), 378–391. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199611)45:3<378::AID-MRD16>3.0.CO;2-V

Henning, H., Nguyen, Q. T., Wallner, U., & Waberski, D. (2022). Temperature limits for storage of extended boar semen from the perspective of the sperm's energy status. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 953021. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.953021

Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 143–172. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3

Keeratikunakorn, K., Chanapiwat, P., Aunpad, R., Ngamwongsatit, N., & Kaeoket, K. (2024). Effect of antimicrobial peptide BiF2_5K7K on contaminated bacteria isolated from boar semen and semen qualities during preservation and subsequent fertility test on pig farm. *Antibiotics*, *13*(7), 579. https://doi.org/10.3390/antibiotics13070579

Kondracki, S., Wysokińska, A., Mańkowska, M., & Iwanina, M. (2017). The use of eosin–nigrosin staining for the evaluation of boar semen quality. *Annals of Warsaw University of Life Sciences – SGGW Animal Science*, *56*(1), 39–46.

Kwon, W. S., Rahman, M. S., Lee, J. S., Yoon, S. J., Park, Y. J., & Pang, M. G. (2017). Improvement of sperm functions by the addition of HEPES in boar semen extender. *Reproduction in Domestic Animals*, *52*(2), 213–220. https://doi.org/10.1111/rda.12902

Ho, T. K., Vo, C. T., Lam, T. N., Nguyen, T. K. K., & Nguyen, T. T. (2023). *Effect of different extender on extended boar semen quality in the long-term storage*. In *Proceedings of the International Food Animal Conference 2023* (pp. 28–29). Can Tho University.

Murase, T., Imaeda, N., Yamada, H., Takasu, M., Taguchi, K., & Katoh, T. (2010). Dilution of boar ejaculates with BTS containing HEPES in place of bicarbonate immediately after ejaculation can reduce the increased inducibility of the acrosome reaction. *Journal of Reproduction and Development*, *56*(3), 309–314. https://doi.org/10.1262/jrd.09-157N

Osinowote, A., Oguejiofor, C., & Olatunbosun, O. (1982). Hypo-osmotic swelling test for assessing boar sperm membrane integrity. *Journal of Reproductive Fertility*, *66*(2), 283–288.

Park, Y. J., Shin, D. H., Pang, W. K., Ryu, D. Y., Rahman, M. S., Adegoke, E. O., & Pang, M. G. (2021). Short-term storage of semen samples in acidic extender increases the proportion of females in pigs. *BMC Veterinary Research*, *17*(1), 362. https://doi.org/10.1186/s12917-021-03078-3

Revell, S. G., & Mrode, R. A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, *36*(1–2), 77–86. https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)90055-8

Rigau, T., Piedrafita, J., Reverter, A., Canal, M., & Rodríguez-Gil, J. E. (1996). The rate of L-lactate production: A feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Animal Reproduction Science*, *43*(2–3), 161–172. https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01496-0

Rivas, C. U., Ayala, M. E., & Aragón, A. (2022). Effect of various pH levels on the sperm kinematic parameters of boars. *South African Journal of Animal Science*, *52*(5), 693–704. https://doi.org/10.4314/sajas.v52i5.13

Trentin, J. M., Centeno, L. A. M., de Souza Balestrin, T., Minela, T., Zanatta, G. M., Pessoa, G. A., & Rubin, M. I. B. (2018). Sodium bicarbonate and HEPES as buffer components for cooling the semen of pony stallions. *Semina: Ciências Agrárias*, *39*(2), 631–642. https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n2p631

Will, M. A., Clark, N. A., & Swain, J. E. (2011). Biological pH buffers in IVF: Help or hindrance to success. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *28*(8), 711–724. https://doi.org/10.1007/s10815-011-9582-0

Matabane, M. B., Thomas, R., Netshirovha, T. R., Tsatsimpe, M., Ng'ambi, J. W., Nephawe, K. A., & Nedambale, T. L. (2017). Relationship between sperm plasma membrane integrity and morphology and fertility following artificial insemination. *South African Journal of Animal Science*, *47*(1), 102-106. https://doi.org/10.4314/sajas.v47i1.15