

NGHIÊN CỨU TẠO PHÔI *IN VITRO* TỪ TRỨNG LỢN ĐÔNG LẠNH BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỦY TINH HÓA

Đỗ Thị Kim Lành, Nguyễn Huệ Linh*, Nguyễn Thị Ngọc Anh

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: 631052@sv.vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 17.04.2023

Ngày chấp nhận đăng: 29.08.2023

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá tỉ lệ thành thực và khả năng phát triển của trứng lợn được đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa. Sau khi giải đông, tế bào trứng lợn được nuôi thành thực trong môi trường Porcine Oocyte Maturation (POM), tiếp tục thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng rã đông và cuối cùng được nuôi trong môi trường nuôi phôi Porcine Zygote Medium (PZM3); nhóm tế bào trứng lợn không đông lạnh được nuôi trong môi trường tương tự để làm đối chứng. Kết quả cho thấy tỉ lệ thành thực ($64,97 \pm 3,42\%$), tỉ lệ thụ tinh ($74,37 \pm 2,08\%$) và tỉ lệ hình thành phôi nang của trứng lợn sau giải đông ($9,61 \pm 1,81\%$). Chúng tôi ghi nhận lần đầu tiên tại Việt Nam, tế bào trứng lợn chưa thành thực được đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa có khả năng phát triển đến giai đoạn phôi nang sau giải đông. Mặc dù các kết quả này thấp hơn so với nhóm trứng không qua bảo quản lạnh (với tỉ lệ thành thực và tạo phôi lần lượt là $84,30 \pm 1,90\%$; $46,68 \pm 5,86\%$ và $22,96 \pm 3,53\%$), nghiên cứu này cho thấy phương pháp thủy tinh hóa có tiềm năng to lớn trong ứng dụng bảo quản tế bào trứng lợn chưa thành thực.

Từ khóa: Thành thực, thủy tinh hóa, trứng lợn.

Production of *in vitro* Embryo from Frozen Porcine Oocytes by Vitrification Method

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the maturation rate and development of frozen porcine oocytes by vitrification method. After thawing, porcine oocytes were matured in Porcine Oocyte Maturation medium (POM), then fertilized with frozen-thawed semen and cultured in Porcine Zygote Medium (PZM3); non-frozen porcine oocytes were cultured in the same procedure as control. The results showed the maturation rate ($64.97 \pm 3.42\%$), fertilization rate ($74.37 \pm 2.08\%$) and blastocyst formation rate ($9.61 \pm 1.81\%$) of frozen-thawed porcine oocytes. This appeared that for the first time in Vietnam immature pig oocytes were frozen by vitrification and developed to blastocyst stage after thawing, although these results were lower than those of the group of eggs without cryopreservation with maturation and embryogenesis rates of $84.30 \pm 1.90\%$ and $46.68 \pm 5.86\%$ and $22.96 \pm 3.53\%$, respectively. This study shows that vitrification had great potential in the application of immature pig oocytes.

Keywords: Maturation, vitrification method, porcine oocytes.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thuật ngữ “bảo quản lạnh” dùng để chỉ quá trình làm lạnh tế bào, mô và bảo quản chúng ở nhiệt độ âm sâu nhằm ngăn chặn, làm chậm hoặc dừng mọi hoạt động sinh học, sinh lý và bảo tồn tế bào để sử dụng trong tương lai. Bảo quản lạnh giao tử và phôi là quy trình phụ trợ quan trọng trong các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm (TTON). Tuy nhiên, trái ngược với đông

lạnh tinh trùng và phôi, bảo quản lạnh tế bào trứng phần lớn đã bị bỏ qua cho đến gần đây; trên thực tế, so với tế bào tinh trùng, tế bào trứng nhạy cảm hơn với những tác động vật lý và hóa học dẫn đến tỉ lệ sống sót, thụ tinh và mang thai rất thấp (Dinnyés & cs., 2000; Smith & cs., 2011). Hiện nay, thủy tinh hóa hay trữ lạnh cực nhanh là một trong những kỹ thuật đông lạnh được áp dụng phổ biến ở tất cả các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm do có một số ưu điểm vượt

trội so với phương pháp đông lạnh chậm truyền thống như: đơn giản, dễ thực hiện, chi phí thấp, không cần các thiết bị đông lạnh đắt tiền, nâng cao hiệu quả bảo quản lạnh vì hạn chế tổn thương lạnh và ngăn ngừa được sự hình thành tinh thể đá nội bào (Chian & cs., 2014).

Trên thế giới, quy trình thủy tinh hóa đã được nghiên cứu, ứng dụng trên người và nhiều loài động vật khác nhau. Phương pháp thủy tinh hóa được Kuleshova & cs. (1999) ứng dụng đầu tiên trên trứng người, nhờ đó em bé đầu tiên trên thế giới từ trứng trữ lạnh bằng kỹ thuật thủy tinh hóa ra đời. Trên chuột, tỉ lệ trứng sống sau quy trình đông lạnh và rã đông bằng phương pháp thủy tinh hóa là 88% (Nakagata, 1989); 80% (Shaw & cs., 1991); 99% (Lane & Gardner, 2001). Trên bò, tỉ lệ trứng sống sau đông lạnh và rã đông là 85% (Otoi & cs., 1998); 87% (Asada & cs., 2002); 88% (Men & cs., 2002); đặc biệt Chian & cs. (2004) thu được tỉ lệ trứng bò sống sau rã đông đạt 92% khi dùng chất bảo quản đông lạnh là 15% ethylene glycol (EG) kết hợp với 15% dimethyl sulphoxide (DMSO) và đạt 98% khi dùng 15% ethylene glycol (EG) kết hợp với 15% propylene glycol (PG)... Fujihira & cs. (2005) đã thực hiện quy trình đông lạnh và rã đông trứng heo bằng phương pháp thủy tinh hóa sử dụng Cryotop, với nồng độ EG trong dung dịch thủy tinh hóa là 30%, thu được tỉ lệ sống sau rã đông là 54-56%.

Ở Việt Nam, nghiên cứu đông lạnh phôi bò đã bắt đầu được tiến hành vào năm 1984 (Nguyễn & cs., 1984). Nguyễn Thị Thương Huyền (2008) đã bảo quản thành công trứng bò bằng phương pháp thủy tinh hóa trong cọng rạ với tỉ lệ trứng sống so với tổng số trứng đem đông lạnh sau giải đông 58,83%. Đến năm 2013, nhóm tác giả này tiếp tục nghiên cứu bảo quản lạnh tế bào trứng bò giai đoạn túi mầm bằng phương pháp thủy tinh hóa trong cọng rạ và vi giọt cho kết quả từ nguồn cọng rạ cho thấy tỉ lệ sống theo hình thái đạt $68,52 \pm 1,19\%$, tỉ lệ sống theo phương pháp nhuộm AO/PI đạt $52,69 \pm 3,66\%$, tỉ lệ chín đạt $20,79 \pm 1,38\%$, tỉ lệ thụ tinh (phôi hai tế bào) đạt $15,64 \pm 2,72\%$ ($P < 0,05$) so với nguồn vi giọt và chỉ có 2/28 phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang (từ cọng rạ, Nguyễn Thị Thương Huyền & cs., 2013). Trên

heo, số lượng nghiên cứu trong nước về đông lạnh tế bào trứng bằng phương pháp thủy tinh hóa chưa được báo cáo nhiều. Gần đây, Lại Đình Biên & cs. (2019) đã tiến hành nghiên cứu đề tài bảo quản tế bào trứng heo giai đoạn trưởng thành bằng phương pháp thủy tinh hóa trong cryotech. Kết quả cho thấy việc sử dụng 10,0% (v/v) ethylene glycol (EG) + 5,0% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO) và trehalose trong môi trường thủy tinh hóa có thể cải thiện tỉ lệ sống và phát triển phôi của trứng. Tuy nhiên, nghiên cứu này được thực hiện trên tế bào trứng heo đã thành thực nên cần đòi hỏi các quy trình nuôi trứng trong phòng thí nghiệm, hơn nữa kết quả đánh giá khả năng phát triển của phôi chỉ đạt ở mức độ 4 tế bào. Trong khi, bảo quản tế bào trứng chưa thành thực bằng phương pháp thủy tinh hóa có thể được thực hiện đơn giản hơn do có thể dễ dàng thực hiện, không đòi hỏi các quy trình nuôi trứng hay phôi trong phòng thí nghiệm. Do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng tạo phôi TTON từ tế bào trứng lợn chưa thành thực được đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Đối tượng nghiên cứu là tế bào trứng lợn được thu từ buồng trứng tại Công ty Cổ phần Thịnh An - cơ sở giết mổ gia súc, gia cầm huyện Thanh Trì để đảm bảo thời gian thu mẫu không lâu quá 3 giờ sau giết mổ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu mẫu buồng trứng (BT), đánh giá chất lượng buồng trứng, phương pháp thu tế bào trứng

Tế bào trứng được thu bằng phương pháp cắt buồng trứng bằng dao mổ. Tế bào trứng được phân loại theo chất lượng dựa vào hình thái và số lớp tế bào cận noãn theo phương pháp của Karja (2008). Cụ thể, các tế bào trứng được phân loại theo 4 loại A, B, C và D:

- Loại A: Trứng có trên 4 lớp tế bào nang bao xung quanh tế bào trứng, liên kết chặt chẽ, không giãn nở, nguyên sinh chất đồng nhất.

- Loại B: Trứng có từ 2 lớp tế bào nang trở lên bao xung quanh tế bào trứng, liên kết chặt chẽ, không giãn nở, nguyên sinh chất đồng nhất.

- Loại C: Trứng bị mất một phần lớp tế bào nang bao xung quanh tế bào trứng, nguyên sinh chất co lại không đồng đều.

- Loại D: Trứng hoàn toàn không có lớp tế bào nang bao xung quanh và nguyên sinh chất không đồng đều.

Chỉ tế bào trứng loại A, B được sử dụng cho nuôi thành thực *in vitro*.

2.2.2. Phương pháp thủy tinh hóa, giải đông tế bào trứng

Phương pháp thủy tinh hóa: Các tế bào trứng thu được sẽ được đông lạnh nhanh theo phương pháp của Somfai & cs. (2013) với những sửa đổi nhỏ. Cụ thể, tế bào trứng được xử lý trong môi trường cơ bản (Basic Medium) bao gồm NCSU-37 (Petters & Wells, 1993) không chứa glucose, nhưng được bổ sung 20mm HEPES; 50 μ m β -mercaptoethanol; 0,17mm natri pyruvate; 2,73mm natri lactat. Các tế bào trứng sau đó được xử lý trong môi trường cân bằng, là môi trường cơ bản được bổ sung với 2% (v/v), ethylene glycol, 2% (v/v) propylene glycol và 4 mg/ml BSA. Các tế bào trứng được ủ trong môi trường cân bằng trong 13-15 phút ở 38,5°C, rửa ba lần trong các giọt 20 μ l dung dịch thủy tinh hóa ở 38,5°C, sau đó dùng pipet thủy tinh có ống hút mao dẫn để hút theo nhóm 10 tế bào để đặt tế bào trứng trên cọng cryotop và hút bớt dung dịch thủy tinh hóa còn 2-3 μ l rồi thả cryotop vào bể nitơ lỏng (LN) trước khi đưa vào vỏ bọc. Dung dịch thủy tinh hóa là môi trường cơ bản được bổ sung với 50 mg/ml; polyvinylpyrrolidone (P-0930); 0,3M sucrose; 17,5% (v/v) EG; 17,5% (v/v) PG và 4 mg/ml BSA. Thời gian rửa trứng trong môi trường thủy tinh hóa và đặt các giọt dung dịch chứa tế bào trứng lên bề mặt cryotop tổng cộng cả quá trình được thực hiện trong khoảng 30 giây.

Phương pháp giải đông tế bào trứng: Trước khi bắt đầu quy trình giải đông tế bào trứng cần chuẩn bị môi trường làm ấm (được giữ kín khí trong ống ly tâm 15ml) được làm ấm đến 38°C trong 30 phút trong tủ ấm, sau đó giữ ở 42°C trong khối giữ nhiệt khô. Các giọt thủy tinh hóa

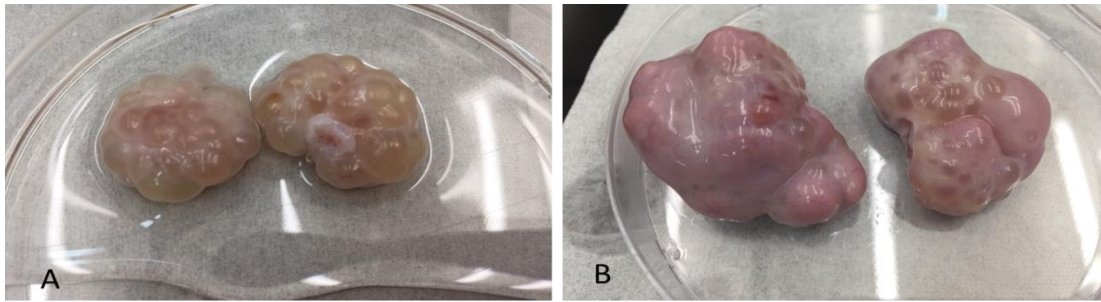
được làm ấm bằng cách chuyển vào 2,5ml môi trường làm sạch (0,4M glucose trong môi trường cơ bản bổ sung 4 mg/ml BSA) trong một đĩa cấy 35mm giữ trên bàn ấm được giữ ở 42°C. Một đến hai phút sau, các tế bào trứng được tái hydrat hóa bằng cách chuyển liên tục trong khoảng thời gian khoảng 1 phút (4 giếng) mỗi giếng chứa 500 μ l môi trường làm sạch được bổ sung lần lượt với 0,2; 0,1 hoặc 0,05M Sucrose ở 38°C. Sau đó, chúng được rửa trong giếng thứ 4 chứa 1ml dung dịch làm sạch là môi trường cơ bản có bổ sung 4 mg/ml BSA có ở 38°C và đưa vào nuôi thành thực. Trong quá trình làm ấm, nhiệt độ thực tế bên trong của khối gia nhiệt kim loại và nhiệt độ bề mặt của bàn ấm được xác minh bằng cả nhiệt kế tích hợp của bàn ấm và một nhiệt kế tương tự.

2.2.3. Đánh giá khả năng thành thực của trứng lợn sau đông lạnh và qua bảo quản trong nitơ lỏng

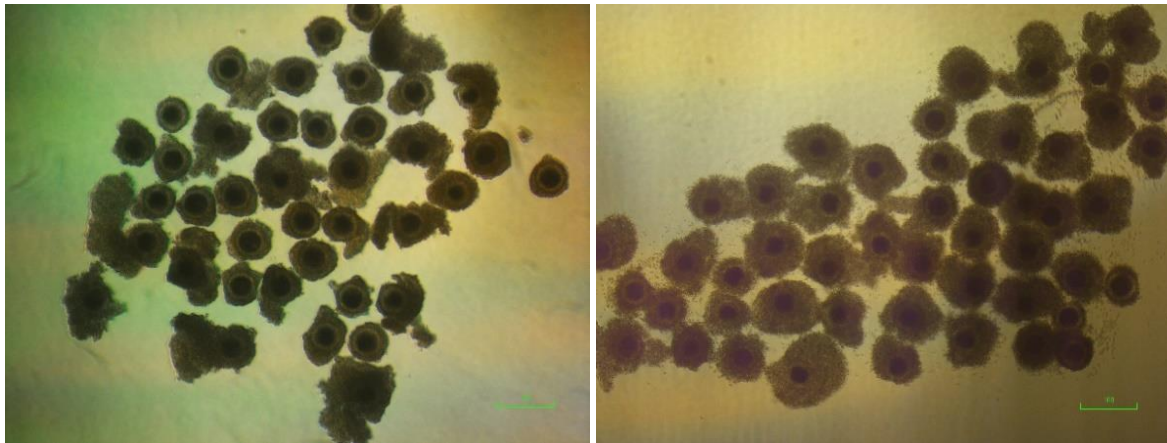
Tế bào trứng sau giải đông được nuôi thành thực môi trường POM (Đỗ Thị Kim Lành & cs., 2020) trong thời gian từ 44-46 giờ. Quá trình nuôi trưởng thành trứng sẽ được tiến hành trong tủ nuôi 5% CO₂ ở 38,5°C, độ ẩm không khí bão hòa. Sau thời gian nuôi cấy, một phần tế bào trứng của cả hai nhóm thí nghiệm được tách sạch tế bào cumulus và nhuộm bằng thuốc nhuộm Orcein. Sau đó kiểm tra dưới kính hiển vi soi ngược để xác định giai đoạn phát triển của nhân, qua đó đánh giá tỉ lệ thành thực của trứng sau đông lạnh.

2.2.4. Thụ tinh ống nghiệm và đánh giá khả năng thụ tinh của trứng lợn sau bảo quản đông lạnh

Tế bào trứng sau khi nuôi trưởng thành trong mỗi loại môi trường trong vòng 46-48 giờ, được thụ tinh trong ống nghiệm sử dụng tinh lợn Bản đông lạnh theo phương pháp của Do & cs. (2015). Tinh trùng được giải đông và pha loãng ở mức 1×10^6 tinh trùng/ml. Quá trình này được tiến hành trong tủ cấy 5% CO₂ ở 38,5°C. Sau 18-22 giờ tính từ thời điểm thụ tinh, hợp tử được tách sạch tế bào cumulus và được nhuộm bằng thuốc nhuộm Orcein và kiểm tra dưới kính hiển vi soi ngược để xác định giai đoạn tiền nhân đực và tiền nhân cái của hợp tử, qua đó đánh giá tỉ lệ thụ tinh.



Hình 1. Buồng trứng lợn đọt yêu cầu (A) và buồng trứng không đọt yêu cầu (B)



Hình 2. Tế bào trứng lợn tươi (trái) và tế bào trứng lợn sau giải đông (phải)

2.2.5. Đánh giá khả năng phát triển đến giai đoạn phôi nang của trứng lợn sau bảo quản đông lạnh

Sau khi tiến hành quá trình thụ tinh cho các tế bào trứng, các tế bào trứng được nuôi cấy trong tủ cấy 5% CO₂ ở 38,5°C. Các tế bào cumulus sau đó được tách ra khỏi tế bào trứng, hợp tử được chuyển sang môi trường nuôi cấy phôi PZM3 cho đến ngày thứ 7 (ngày thụ tinh là ngày 0) để đánh giá khả năng phát triển của phôi. Sau đó phôi được nhuộm bằng thuốc nhuộm Hoechst 33342, từ đó đánh giá tỉ lệ phôi nang.

Tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ phôi nang được sử dụng làm các chỉ tiêu đánh giá khả năng phát triển của trứng và chất lượng phôi.

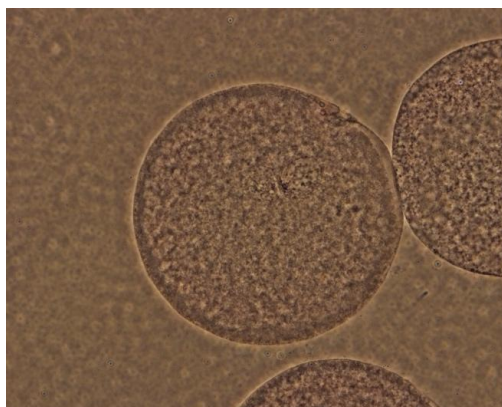
2.2.6. Phương pháp nhuộm Orcein

Để đánh giá tỉ lệ thành thực và tỉ lệ thụ tinh của tế bào trứng lợn, tế bào trứng thành thực sau IVM 44 giờ và hợp tử sau IVF 18 giờ được gắn trên phiến kính và cố định trong dung

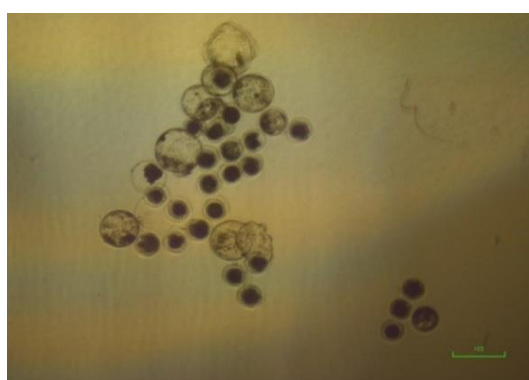
dịch axit acetic: cồn etanol (1:3 v/v) trong 48-72 giờ. Sau đó được nhuộm bằng dung dịch acetic orcein (1% orcein trong axit acetic 45%) và kiểm tra, đánh giá dưới kính hiển vi tương phản (Namula & cs., 2013).

2.2.7. Phương pháp nhuộm Hoechst 33342

Khi kết thúc nuôi cấy IVC, các phôi nang hình thành sẽ được thu, cố định và thấm trong 15 phút tại nhiệt độ phòng (RT) trong PBS có bổ sung 3,7% (v/v) Paraformaldehyd và 1% (v/v) Triton X-100. Sau đó được đặt trong PBS chứa 0,3% polyvinylpyrrolidone trong 15 phút tại RT. Các phôi nang đã được chuyển vào một giọt nhỏ bao gồm PBS bổ sung 90% (v/v) glycerol và Bisbenzimid 1,9mm trên một phiến kính. Sau đó, các phôi nang được cố định bằng một lamendược hỗ trợ bởi bốn giọt vaselin/parafin và được ủ qua đêm ở 4-8°C. Các tế bào trong phôi nang được kiểm tra bằng kính hiển vi huỳnh quang với bộ lọc có bước sóng 350nm (Do & cs., 2015).



Hình 3. Trứng được thụ tinh (có tiền nhân) nhuộm Orcein



Hình 4. Phôi nang 7 ngày tuổi sau đông lạnh

2.3. Xử lý số liệu

Các chỉ tiêu đánh giá bao gồm tỷ lệ tế bào trứng thành thực, tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ hình thành phôi nang. Các tỷ lệ phần trăm được chuyển đổi bằng hàm arcsin trước khi được phân tích bằng paired sample T-test của SAS dành cho Windows, phiên bản 9.1, (Hoa Kỳ). Các khác biệt với giá trị $P \leq 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng thành thực của trứng lợn sau đông lạnh và qua bảo quản trong nitơ

Kết quả bảng 1 cho thấy, tổng số tế bào trứng chưa qua đông lạnh được nuôi cấy là 1.690 tế bào, trong đó 1.403 tế bào thành thực, đạt $84,30 \pm 1,90\%$ cao hơn tỉ lệ này ở nhóm trứng sau bảo quản đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa với tổng số 1.476 tế bào trứng được nghiên

cứu có 962 trứng thành thực đạt $64,97 \pm 3,42\%$ ($P < 0,001$). Như vậy, quá trình đông lạnh ảnh hưởng sâu sắc đến khả năng thành thực của tế bào trứng lợn sau giải đông. Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của Casillas & cs. (2020) khẳng định khả năng sống sót và thành thực của trứng lợn sau giải đông giảm sau IVM. Điều này cũng được xác nhận trong báo cáo của Fernández & cs. (2012).

Lý giải cho sự chênh lệch tỉ lệ thành thực ở hai nhóm thí nghiệm do trong quá trình nuôi cấy trong ống nghiệm, mức độ của O_2 (Kang & cs., 2012) và các phản ứng oxy hóa tăng lên (Khazaei & Aghaz., 2017) trong quá trình nuôi cấy trong ống nghiệm ảnh hưởng đến khả năng tồn tại và phát triển của tế bào. Hơn nữa, tế bào trứng cũng rất dễ bị tổn thương khi tiếp xúc với nhiệt độ thấp (Lại Đình Biên & cs., 2019) ảnh hưởng đến thành phần của tế bào chất, lớp màng cumulus... nên tỉ lệ thành thực của trứng sau bảo quản đông lạnh thấp hơn so với trứng không qua bảo quản.

Bảng 1. Kết quả đánh giá khả năng thành thực của tế bào trứng lợn sau đông lạnh và qua bảo quản trong nitơ lỏng

Nhóm trứng	Tổng số tế bào trứng nghiên cứu	Số tế bào trứng thành thực	Tỷ lệ trứng thành thực (%)
Không qua đông lạnh	1690	1403	84,30 ^a ± 1,90
Bảo quản đông lạnh	1476	962	64,97 ^b ± 3,42 ^b

Ghi chú: Số liệu được biểu diễn dưới dạng: giá trị trung bình (Mean) ± sai số chuẩn (SE); Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau ^{a, b} thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $P < 0,001$; Số lần nhắc lại thí nghiệm $n = 10$.

Bảng 2. Khả năng thụ tinh của trứng lợn sau bảo quản lạnh

Nhóm trứng	Tổng số tế bào trứng nghiên cứu	Số tế bào trứng được thụ tinh	Tỷ lệ trứng được thụ tinh (%)
Không qua đông lạnh	1403	1242	74,37 ^a ± 2,08
Bảo quản đông lạnh	962	593	46,68 ^b ± 5,86

Ghi chú: Số liệu được biểu diễn dưới dạng: giá trị trung bình (Mean) ± sai số chuẩn (SE); Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau ^{a, b} thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $P < 0,001$; Số lần nhắc lại thí nghiệm $n = 10$.

Bảng 3. Khả năng phát triển của trứng lợn sau bảo quản lạnh

Nhóm trứng	Tổng số phôi nghiên cứu	Số phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang	Tỷ lệ phôi nang (%)
Không qua đông lạnh	1242	315	22,96 ^a ± 3,53
Bảo quản đông lạnh	593	67	9,61 ^b ± 1,81

Ghi chú: Số liệu được biểu diễn dưới dạng: giá trị trung bình (Mean) ± sai số chuẩn (SE); Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau ^{a, b} thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $P < 0,001$; Số lần nhắc lại thí nghiệm $n = 10$.

3.2. Khả năng thụ tinh của trứng lợn sau bảo quản đông lạnh tế bào trứng

Kết quả được thể hiện ở bảng 2 cho thấy trong môi trường thụ tinh Pig-FM, tỉ lệ thụ tinh giữa hai nhóm thí nghiệm có sự chênh lệch đáng kể. Với các tế bào trứng không qua bảo quản đông lạnh, sau khi nuôi thành thực và thụ tinh trong ống nghiệm, tỉ lệ thụ tinh đạt 74,37 ± 2,08% với 1.242/1.403 tế bào trứng được thụ tinh. Tỉ lệ này giảm đi ở nhóm tế bào trứng sau bảo quản đông lạnh với 593/962 trứng được thụ tinh và đạt 46,68 ± 5,86% ($P < 0,001$). Kết quả thụ tinh không chỉ phụ thuộc vào sự thành thực của nhân mà còn chịu ảnh hưởng của sự thành thực của tế bào chất (Watson, 2007). Những tác động của quá trình đông lạnh và giải đông ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động của màng tế bào và sự sắp xếp của các thành phần trong tế bào, từ đó gây ảnh hưởng đến khả năng

thành thực và phát triển của tế bào trứng (Prentice & cs., 2011). Bảo quản lạnh cũng đã được chứng minh là gây ra sự đùn sớm của các hạt vỏ trong màng nguyên sinh chất dẫn đến sự cứng lại đột ngột của màng zona và làm giảm khả năng thâm nhập của tinh trùng như được quan sát thấy ở chuột (Carroll & cs., 1990), ở cừu (Tian & cs., 2007) và bò.

3.3. Khả năng phát triển đến giai đoạn phôi nang của trứng lợn sau bảo quản đông lạnh

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, tỉ lệ phôi nang ở nhóm trứng nuôi trưởng thành sau bảo quản đông lạnh là 9,61 ± 1,81% với 67 phôi nang trên tổng số 593 phôi nghiên cứu thấp hơn so với tỉ lệ này ở nhóm trứng nuôi không qua bảo quản đông lạnh với 315 phôi nang trên tổng số 1242 phôi nghiên cứu đạt 22,96 ± 3,53% ($P < 0,001$).

Tổn thương do quá trình đông lạnh đến tế bào trứng có thể xảy ra ở tất cả các công đoạn như hạ nhiệt, làm mát, đông lạnh, rã đông và làm ấm. Trong quá trình làm lạnh, tổn thương tế bào do lạnh xảy ra ở 15 đến -5°C , sự hình thành tinh thể băng nội bào xảy ra ở -5 đến -80°C và tổn thương đứt gãy đối với màng zona pellucida (ZP) và tế bào chất xảy ra ở -15 đến -50°C (Vajta & Nagy, 2006). Trong giai đoạn rã đông và làm ấm, nhiễm độc các chống lạnh và tổn thương thẩm thấu thường xảy ra đối với tế bào trứng.

Tế bào trứng lợn nhạy cảm hơn với nhiệt độ thấp do hàm lượng lipid trong màng và nguyên sinh chất cao hơn. Nhiệt độ thấp có thể ngăn cản sự trưởng thành của nhân và tế bào chất của của trứng ở giai đoạn túi mầm (GV) (Liu & cs., 2003). Wu & cs. (2006) báo cáo rằng các tế bào trứng đông lạnh đến -196°C có các mức độ tổn thương lạnh khác nhau trong tế bào trứng ở giai đoạn túi mầm bao gồm sự phân tách tế bào cumulus khỏi phức hợp cumulus-oocyte, đứt gãy ZP tiếp giáp với tế bào cumulus, vỡ các điểm nối khoảng cách giữa các tế bào cumulus và sự gián đoạn của vi nhung mao. Các nghiên cứu này đã chứng minh cơ chế tác động của quá trình bảo quản lạnh đến khả năng phát triển của trứng lợn sau giải đông.

4. KẾT LUẬN

Đây là công bố đầu tiên tại Việt Nam thành công tạo ra phôi nang từ tế bào trứng lợn chưa thành thực được đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hoá. Kết quả tạo phôi từ tế bào trứng lợn sau giải đông có tỉ lệ thành thực đạt 64,97%, tỉ lệ thụ tinh đạt 46,68% và tỉ lệ hình thành phôi nang là 9,61%. Nghiên cứu này là cơ sở cho việc phát triển và tiềm năng ứng dụng kỹ thuật lưu trữ tế bào trứng lợn chưa thành thực bằng phương pháp thủy tinh hoá trong bảo tồn nguồn gen các giống lợn tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Asada M., Ishibashi S., Ikumi S. & Fukui Y. (2002). Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of *in vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology*. 58(6): 1199-1208.

Carroll J., Depyere H. & Matthews C.D. (1990). Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rate of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil*. 90: 547-553.

Casillas F., Ducolomb Y., López A. & Betancourt M. (2020). Effect of porcine immature oocyte vitrification on oocyte-cumulus cell gap junctional intercellular communication. *Porcine health management*. 6: 1-7.

Chian R.-C., Wang Y. & Li Y.-R. (2014). Oocyte vitrification: Advances, progress and future goals. *J. Assist. Reprod. Genet*. 31: 411-420. doi: 10.1007/s10815-014-0180-9.

Chian R.C., Kuwayama M., Tan L., Tan J. Kato O. & Nagai T. (2004). High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. *Journal of Reproduction and Development*. 50(6): 685-696.

Dinnyés A., Dai Y., Jiang S. & Yang X. (2000). High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod*. 63: 513-518. doi: 10.1095/biolreprod63.2.513.

Đỗ Thị Kim Lành, Hoàng Thị Kim Chi, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Nguyễn Thị Hồng Nhung, Kazuhiro Kikuchi, Takeshige Otoi, Nguyễn Thị Thu Trang & Sử Thanh Long (2020). Nghiên cứu ứng dụng môi trường nuôi thành thực trứng lợn *in vitro* phù hợp với điều kiện Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 7: 504-509.

Do L.T., Luu V.V., Morita Y., Taniguchi M., Nii M., Peter A.T. & Otoi T. (2015). Astaxanthin present in the maturation medium reduces negative effects of heat shock on the developmental competence of porcine oocytes. *Reproductive biology*. 15(2): 86-93.

Fernández-Reyes F., Ducolomb Y., Romo S., Casas E., Salazar Z. & Betancourt M. (2012). Viability, maturation and embryo development *in vitro* of vitrified immature and porcine oocytes. *Cryobiology*. 64: 261-6.

Fujihira T., Nagai H. & Fukui Y. (2005). Relationship between equilibration times and the presence of cumulus cells, and effect of taxol treatment for vitrification of *in vitro* matured porcine oocytes. *Cryobiology*. 51(3): 339-343.

Jung-Taek Kang I, Mohammad Atikuzzaman, Dae-Kee Kwon, Sol-Ji Park, Su-Jin Kim, Joon-Ho Moon, Ok-Jae Koo, Goo Jang & Byeong-Chun Lee (2012). Developmental competence of porcine oocytes after *in vitro* maturation and *in vitro* culture under different oxygen concentrations. *Zygote*. 20(1): 1-8.

- Karja N.W.K. (2008). Nuclear maturation of porcine oocytes *in vitro*: effect of the cumulus-oocyte complexes quality. *Indo J Biotech.* 13: 1078-1084.
- Khazaei M. & Aghaz F. (2017). Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during *in vitro* maturation of oocytes. *International journal of fertility & sterility.* 11(2): 63.
- Kuleshova L., Gianaroli L., Magli C., Ferraretti A. & Trounson A. (1999). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod.* 14(12): 3077-9. doi: 10.1093/humrep/14.12.3077. PMID: 10601099.
- Lại Đình Biên, Lê Anh Thư & Phan Thị Mỹ Duyên (2019). Bảo quản lạnh tế bào trứng của heo ở giai đoạn trưởng thành bằng phương pháp thủy tinh hóa trong cryotech. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ.* 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học) (1): 222-228.
- Lane M. & Gardner D.K. (2001). Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Molecular Reproduction and Development.* 58(3): 342-347
- Liu R.H., Sun Q.Y., Li Y.H., Jiao L.H. & Wang W.H. (2003). Maturation of porcine oocytes after cooling at the germinal vesicle stage. *Zygote.* 11: 299-305.
- Men H., Monson R.L. & Rutledge J.J. (2002). Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. *Theriogenology.* 57(3): 1095-1103.
- Nakagata N. (1989). High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *Reproduction.* 87(2): 479-483.
- Namula Z., Sato Y., Kodama R., Morinaga K., Luu V.V., Taniguchi M., Nakai M., Tanihara F., Kikuchi K., Nagai T. & Otoi T. (2013). Motility and fertility of boar semen after liquid preservation at 5°C for more than 2 weeks. *Anim Sci J.* 84(8):600-6. doi: 10.1111/asj.12049. Epub 2013 Mar 24. PMID: 23607795.
- Nguyễn Thị Thương Huyền (2008). Thu nhận trứng bò, heo để cải thiện quy trình đông lạnh trứng trong điều kiện Việt Nam. Báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu khoa học cấp trường. Khoa Sinh học, Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Thị Thương Huyền, Lâm Sơn Bích Trâm, Nguyễn Quốc Đạt, Hoàng Nghĩa Sơn & Phan Kim Ngọc (2014). Bảo quản lạnh tế bào trứng bò giai đoạn túi mầm bằng phương pháp thủy tinh hóa trong cọng rạ và vi giọt. *Tạp chí Sinh học.* 36(1se): 195-202.
- Nguyen B.X., Heyman Y. & Garnier V. (1984). Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. *Theriogenology.* 22(4): 389-399.
- Otoi T., Yamamoto K., Koyama N., Tachikawa S. & Suzuki T. (1998). Cryopreservation of Mature Bovine Oocytes by Vitrification in Straws. *Cryobiology.* 37: 77-85.
- Petters R.M. & Wells K.D. (1993). Culture of pig embryos. *J Reprod Fert Suppl.* 48: 61-73.
- Prentice J.R. & Anzar M. (2011). Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. *Veterinary medicine international.*
- Shaw J.M., Diotallevi L. & Trounson A.O. (1991). A simple rapid 4.5 M dimethyl-sulfoxide freezing technique for the cryopreservation of one-cell to blastocyst stage preimplantation mouse embryos. *Reproduction, Fertility and Development.* 3(5): 621-626
- Smith G.D., Motta E.E. & Serafini P. (2011). Theoretical and experimental basis of oocyte vitrification. *Reprod. Biomed. Online.* 23: 298-306. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.05.003.
- Tamás Somfai 1, Michiko Nakai, Fuminori Tanihara, Junko Noguchi, Hiroyuki Kaneko, Naomi Kashiwazaki, István Egerszegi, Takashi Nagai & Kazuhiro Kikuchi (2013). Comparison of ethylene glycol and propylene glycol for the vitrification of immature porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development.* 59(4): 378-384.
- Tian S.J., Yan C.L., Yang H.X., Zhou G.B., Yang Z.Q. & Zhu S.E. (2007). Vitrification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of *in vitro* matured ovine oocytes and decrease sperm penetration. *Anim Reprod Sci.* 101: 365-371.
- Vajta G. & Nagy Z.P. (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive biomedicine online.* 12(6): 779-796.
- Watson A.J. (2007). Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of animal science.* 85(suppl_13): E1-E3.
- Wu C., Rui R., Dai J., Zhang C., Ju S., Xie B., Lu X. & Zheng X. (2006). Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 73:1454-1462.