

ĐÔNG LẠNH TRỨNG LỢN NON BẰNG CRYOTOP**Nguyễn Văn Hạnh***, Nguyễn Việt Linh, Bùi Xuân Nguyên

Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *nvhanh@ibt.ac.vn

TÓM TẮT: Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đông lạnh trứng lợn ở giai đoạn bóng mầm bằng phương pháp sử dụng cryotop, sau đó nuôi thành thực *in vitro* (IVM). Tổ hợp trứng-tế bào cận noãn (COC) được thu từ các nang trứng kích thước 4-6 mm. Một số trứng được cố định để đánh giá trạng thái phát triển trước khi đông lạnh hoặc nuôi thành thực *in vitro* (nhóm 1). Các trứng còn lại được xử lý trong 4 điều kiện khác nhau: nuôi thành thực bình thường (nhóm 2); đánh giá độc tính môi trường đông lạnh (nhóm 3); đông lạnh bằng cryotop (nhóm 4); ly tâm trước khi đông lạnh (nhóm 5). Kết quả nhuộm trứng cho thấy, tất cả trứng trước khi xử lý đều ở giai đoạn bóng mầm. Tỷ lệ TBCN bông toi, tỷ lệ trứng có hình thái bình thường và tỷ lệ đạt đến giai đoạn gian kỳ 2 ở nhóm 2 và nhóm 3 là như nhau (lần lượt là 100%, 100%, 84% và 100%, 100%, 82%). Trong khi đó, các tỷ lệ này ở nhóm 4 thấp hơn nhóm 2 và nhóm 3 (lần lượt là 79%, 68% và 56%), nhưng lại cao hơn nhóm 5 (lần lượt là 13%, 23%, và 7%). Đánh giá trạng thái trứng sống bằng phương pháp nhuộm với fluorescein diacetate (FDA) và propidium iodide (PI) cũng cho kết quả tương tự. Từ những kết quả thu được, có thể nhận định rằng cryotop có thể được sử dụng để đông lạnh trứng bảo tồn lợn non trước khi nuôi thành thực trứng và không cần ly tâm trước khi đông lạnh.

Từ khóa: cryotop, đông lạnh, IVM, thành thực, trứng lợn.

MỞ ĐẦU

Tính nhạy cảm trong quá trình đông lạnh của trứng phụ thuộc vào loài [3]. Trứng lợn được đánh giá là có độ chống chịu với nhiệt độ thấp hơn trứng các loài động vật có vú khác. Cụm trứng có tế bào cận noãn ở giai đoạn bóng mầm (germinal vesicle-GV) không thể phục hồi sau khi hạ nhiệt độ xuống 15°C hoặc thấp hơn [4], trong khi đối với trứng bò, ngưỡng nhiệt độ dẫn đến hiện tượng không thể phục hồi đối với trứng xuống đến 4°C [2]. Nagashima et al. (1994) [16], lần đầu tiên thông báo kết quả nghiên cứu về tương quan giữa lipid nội bào với độ nhạy của quá trình giảm nhiệt độ trong quy trình đông lạnh phôi lợn. Các nghiên cứu này đã chỉ ra rằng, lipid nội bào là yếu tố quan trọng cần thiết cho quá trình phát triển ở giai đoạn phôi sớm, đặc biệt quan trọng đối với các phôi đông lạnh. Những tổn thương thường xảy ra trong quá trình đông lạnh là sự phá vỡ cấu trúc màng tế bào sinh chất [22], cấu trúc bộ khung tế bào [21], tiếp đến là các cơ quan bên trong của trứng (ty thể, mạng lưới nội chất), cấu trúc giúp tổng hợp protein và nhiễm sắc thể [1]. Ngoài ra, quá trình giảm nhiệt độ có thể đã làm gãy các vi ống và giảm khả năng sống của trứng [6].

Nghiên cứu đông lạnh trứng lợn thành thực

bằng kỹ thuật đông lạnh nhanh sử dụng cọng ra đã được thực hiện [20]. Các trứng lợn đông lạnh ở giai đoạn MII sau khi được thụ tinh cũng đã có thể phát triển đến giai đoạn phôi nang với tỷ lệ cao tới 43% [18]. Kỹ thuật đông lạnh sử dụng cryotop ra đời gần đây đã được chứng minh có nhiều ưu thế hơn so với phương pháp đông lạnh trước [18; 5]. Liu et al. (2008) [14] đã so sánh hiệu quả đông lạnh trứng lợn thành thực của phương pháp sử dụng cryotop với phương pháp sử dụng cọng ra thông thường. Tác giả này đã chứng minh, đông lạnh bằng cryotop đạt tỷ lệ chia sau thụ tinh cao hơn so với đông lạnh bằng cọng ra thông thường [14]. Đối với trứng người, đông lạnh bằng cryotop cũng giúp nâng cao tỷ lệ trứng có hình thái bình thường sau giải đông (91% so với 78% khi dùng cọng ra) [13]. Những nghiên cứu so sánh trên các đối tượng trứng bò [11] và trứng chuột [7] đều cho kết quả tương tự. Hiệu quả của phương pháp đông lạnh bằng cryotop đã khẳng định trên nhiều đối tượng, tuy nhiên, chưa có công bố nào về đông lạnh bằng cryotop trên lợn, một đối tượng được đánh giá là nhạy cảm với các kỹ thuật đông lạnh. Vì lý do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sử dụng cryotop trong đông lạnh trứng lợn nhằm bổ sung những thông tin còn thiếu về đối tượng này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu mẫu buồng trứng và trứng lợn

Mẫu buồng trứng thu ngay sau khi gia súc bị giết tại lò mổ, rửa sạch bằng nước muối sinh lý và ngâm vào dung dịch bảo quản mẫu đã chuẩn bị sẵn. Toàn bộ mẫu thu được đặt trong bình ổn nhiệt 37°C, vận chuyển mẫu về phòng thí nghiệm trong vòng 1-2 giờ. Chúng tôi tiến hành thu các nang có kích thước 4-6 mm bằng cách rạch buồng trứng. Sau đó, bóc sạch các lớp ngoài của các nang trứng, chuyển vào môi trường TCM-199 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) có bổ sung 2,5 mg/mL HEPES (H-7523, Sigma), 2,47 mg/mL Na-HEPES (H-8651, Sigma), 0,35 mg/mL NaHCO₃ và 0,05 mg/mL kanamycin sulfate, để bọc lọ nang trứng và thu trứng.

Môi trường đông lạnh trứng

Dung dịch nền cho các loại dung dịch xử lý trong đông lạnh trứng là TCM-199 có chứa 2,5 mg/mL HEPES (H-7523, Sigma), 2,47 mg/mL Na-HEPES (H-8651, Sigma), 0,35 mg/mL NaHCO₃ và 0,05 mg/mL kanamycin sulfate. Dung dịch cân bằng gồm M-199 bổ sung 2% (v:v) ethylene glycol (EG, Sigma), 2% (v:v) dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) và 20% huyết thanh bê (FCS, Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Nhật Bản). Dung dịch vitrification bao gồm 15% (v:v) EG, 15% (v:v) DMSO và 20% FCS trong dung dịch M-199. Dung dịch rã đông bao gồm 20% FCS trong M-199 và chứa 0; 0,5 hoặc 1 M sucrose. Dung dịch khử độc sau đông lạnh gồm 20% FCS trong M-199 có chứa 0; 0,25 hoặc 0,5 M sucrose.

Thiết kế thí nghiệm

Một số trứng sau khi thu được tiến hành tách TBCN và cố định để đánh giá trạng thái phát triển của trứng trước khi đông lạnh (nhóm 1). Sau đó, trứng được chia thành bốn nhóm: nhóm 2 (nhóm đối chứng) gồm trứng sau khi thu được tiến hành nuôi thành thực in vitro không qua đông lạnh (IVM); nhóm 3 (thử nghiệm độ độc môi trường đông lạnh): trứng được xử lý trứng qua các dung dịch đông lạnh và rã đông nhưng không đặt vào nitơ lỏng; nhóm 4: nhóm đông lạnh bằng cryotop và nhóm 5: trứng được li tâm ở 5.000 vòng/phút trong 5 phút trước khi tiến hành các bước như nhóm 4.

Đông lạnh trứng (vitrification) và rã đông

Từng nhóm 5 trứng ở giai đoạn bóng mầm được cho vào môi trường cân bằng trong vòng 15 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó chuyển trứng sang môi trường vitrification trong vòng 1 phút. Trứng được đặt lên tấm nhựa mỏng của cryotop (Kitazato Biopharma, Shizuoka, Nhật Bản) sao cho thể tích dung dịch ít nhất và nhúng trực tiếp vào nitơ lỏng (-196°C).

Để rã đông trứng, các cryotop được nhúng trực tiếp vào dung dịch đã làm ấm lên 38,5°C, chuyển trứng sang dung dịch khử độc sau 30 giây. Rửa 3 lần qua các đĩa dung dịch rửa được đặt ở nhiệt độ phòng, và giữ trứng 5 phút ở mỗi nồng độ dung dịch rửa.

Nuôi thành thực trứng in vitro

Việc nuôi thành thực trứng được thực hiện dựa theo Kikuchi et al. (2002) [12]. Từng nhóm 40-50 COC được nuôi thành thực trong 500 µl môi trường nuôi thành thực NCSU-37 có chứa 10% dịch nang trứng lợn, 0,6 mM cysteine, 50 µM β-mercaptoethanol, 1 mM dibutyl cAMP (dbcAMP), 10 IU/ml eCG và 10 IU/ml hCG trong các đĩa nuôi tế bào 4 giếng trong 24 giờ. Sau đó, các COC được chuyển vào một đĩa mới chứa môi trường nuôi hoàn toàn tương tự, chỉ khác là không có chứa dbcAMP và các hormone trong vòng 22 giờ. Việc nuôi thành thực này được thực hiện trong tủ nuôi với thành phần khí là 5% O₂, ở nhiệt độ 39°C với độ ẩm bão hòa.

Nhuộm trứng

Trứng sau khi được nuôi thành thực được loại bỏ tế bào cận noãn để cố định nhằm đánh giá mức độ thành thực nhân hay nhuộm bằng FDA và PI để đánh giá tỷ lệ sống. Đối với trứng nhuộm eosine: trứng được gắn trứng trên lam kính và đặt vào cố định trong dung dịch cố định acid acetic:ethanol (1:1), sau hai ngày cố định, rửa lam kính và nhuộm bằng eosine 5% trong 15 phút. Quan sát đánh giá trứng thành thực dưới kính hiển vi Olympus (Nhật bản). Đối với trứng nhuộm bằng FDA và PI: sau khi tách sạch tế bào cận noãn, chuyển trứng vào môi trường nhuộm có FDA (3'6' fluorescein diacetate; Sigma, St Louis, MO, USA) nồng độ 5 mcg/mL và PI (Propidium iodide, Calbiochem, San Diego, CA) nồng độ 1 mcg/mL. Các tế bào

trứng được đặt trong giọt chứa thuốc nhuộm trong vòng 3 phút, rửa sạch hai lần bằng dung dịch PBS sau đó kiểm tra bằng kính hiển vi huỳnh quang (Nikon, eclipse 80i, Nhật Bản).

Phân tích thống kê

Kết quả về so sánh các giá trị trung bình của các phương pháp được xử lý bằng ANOVA, mỗi tương quan được xử lý bằng excel.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

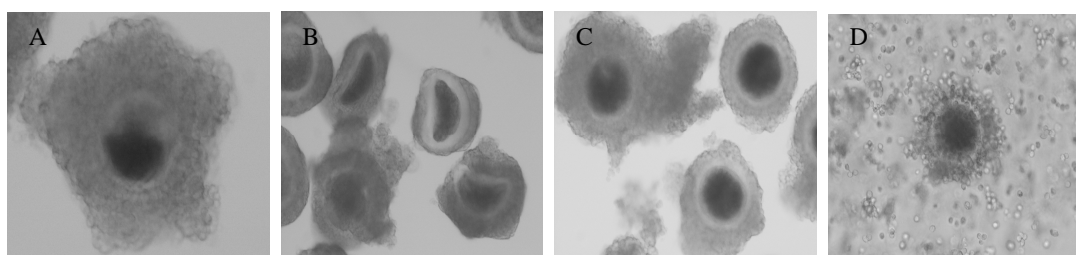
Kết quả hình thái trứng sau khi nuôi in vitro được trình bày trong bảng 1. Tỷ lệ trứng sống và phát triển ở nhóm 3 tương tự nhóm 2 cho thấy, sau các bước xử lý qua các loại môi trường của quy trình đông lạnh và giải đông không ảnh hưởng đến trứng trong quá trình nuôi in vitro. Mặc dù trứng bị biến dạng cấu trúc tế bào chất do tác động của li tâm (hình 1a), hay đổi hình dạng do tác động của hóa chất (hình 1b), nhưng sau khi đông lạnh và giải đông cấu trúc trứng lại trở về trạng thái bình thường

(hình 1c) và có tế bào bông tơ như lô đối chứng (hình 1d). Trong khi đó, tỷ lệ trứng có tế bào cận noãn bông tơ và hình thái trứng bình thường và phát triển thấp hơn trong nhóm qua li tâm (46% và 38%). Đối với nhóm trứng có li tâm, chất lượng trứng sau nuôi cấy in vitro đạt tỷ lệ thấp nhất cả về hình thái trứng và tế bào cumulus bông tơ (23% và 13%). Kết quả này được giải thích rằng tác động của li tâm đã làm ảnh hưởng tới cấu trúc nhân của trứng trước khi chịu tác động của chất bảo quản lạnh đối với trứng lợn lợn [9]. Trong nghiên cứu này, kết quả tế bào cận noãn bông tơ sau xử lý và nuôi in vitro cũng tương tự với công bố của Huang et al. (2002) [10]. Kết quả tế bào cận noãn còn gắn kết trứng sau đông lạnh là chỉ số quan trọng, bởi vì các tế bào cận noãn đóng vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy sự trưởng thành của tế bào chất trong quá trình thành thực của trứng lợn [15]. Vai trò của tế bào cận noãn trong nuôi in vitro đã được khẳng định khi so sánh giữa các nhóm có và không có loại tế bào này [19].

Bảng 1. Kết quả nuôi trứng in vitro sau đông lạnh

Nhóm thí nghiệm	Số trứng thí nghiệm	Trứng có cumulus bông tơ: n (%)	Trứng có hình thái bình thường: n (%)	Tỷ lệ trứng sống (%)
2	300	300 (100) ^a	300 (100) ^a	100 ^a
3	290	290 (100) ^a	290 (100) ^a	100 ^a
4	290	165 (79) ^b	197 (68) ^b	62 ^b
5	320	41 (13) ^c	73 (23) ^c	18 ^c

Thí nghiệm được lặp lại 5 lần. Trong cùng 1 cột, các số liệu với chữ chú thích khác nhau là sai khác với nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).



Hình 1. Kết quả xử lý và nuôi thành thực trứng

A. Trứng sau khi li tâm; B. Trứng mất nước trong quá trình xử lý khử nước; C. Hình thái trứng phục hồi sau đông lạnh; D. Trứng sau khi nuôi in vitro với tế bào bông tơ.

Kết quả nuôi thành thực trứng in vitro được trình bày trong bảng 2 cho thấy, tỷ lệ trứng thành thực nhân (MII) không có sự sai khác trong nhóm 2 và nhóm 3. Kết quả này cho thấy,

việc xử lý với các môi trường đông lạnh đã không tác động đến chất lượng trứng. Tỷ lệ trứng thành thực thấp hơn trong nhóm 4 (nhóm có đông lạnh đầy đủ; 56%) và thấp nhất trong

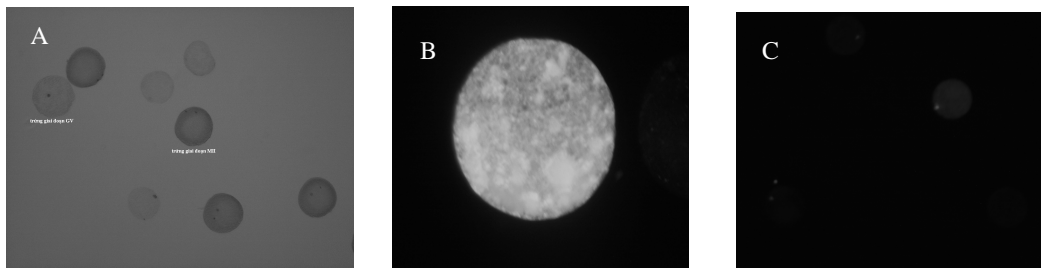
nhóm 5 (nhóm có li tâm và đông lạnh đầy đủ; 7%) ($p < 0,05$). Tỷ lệ thành thực (đạt tới trạng thái MII sau hai ngày nuôi thành thực) sau khi đông lạnh trong nghiên cứu này (nhóm 4; 56%) là khá khả quan, tương tự với kết quả của Gupta et al. (2007) [8] và Nakagawa et al. (2008) [17] (51% và 53%) và cao hơn so với các thông báo trước đây của Hara et al. (2005) [9] và Huang et al. (2002) [10] (7,0% và 20,6%). Tuy vậy, tỷ lệ

này vẫn thấp hơn so với tỷ lệ thành thực của trứng sau đông lạnh nhanh trên bề mặt cứng trong nghiên cứu của Somfai et al. (2010) [19] (77,6%). Kết quả nhuộm cho hình ảnh rõ nét về trạng thái của trứng sau nuôi in vitro, với các giai đoạn thành thực được thể hiện rõ trong hình 2a, những trứng sống bắt màu xanh (hình 2b) và trứng chết có bắt màu đỏ nhân sáng màu đỏ (hình 2c).

Bảng 2. Kết quả trứng sau khi sau khi cố định và nhuộm nhân

Nhóm thí nghiệm	Số trứng	Trạng thái thành trứng			
		GV (%)	MI (%)	MIII (%)	Phân hủy (%)
1	180	180	0	0	0
2	156	0	25 (16) ^a	131 (84) ^a	0
3	162	0	29 (18) ^a	133 (82) ^a	0
4	162	0	18 (11) ^b	91 (56) ^b	53 (33)
5	156	22 (14)	22 (14) ^c	11 (7) ^c	101 (65)

Thí nghiệm được lặp lại 5 lần. Trong cùng 1 cột, các số liệu với chữ chú thích khác nhau là sai khác với nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).



Hình 2. Kết quả nhuộm trứng sau khi nuôi thành thực

A. Trứng cố định và nhuộm bằng eosine; B. Trứng nhuộm bằng FDA (trứng sáng xanh chỉ thị cho trứng còn sống); C. trứng nhuộm với FI (có nhân bắt màu đỏ chỉ thị cho trứng chết)

KẾT LUẬN

Trứng lợn sau khi đông lạnh nhanh bằng cryotop có tỷ lệ sống đạt 100% và đạt tỷ lệ thành thực (56%) sau nuôi in vitro. Các nghiên cứu thụ tinh ống nghiệm và phát triển phôi in vitro trên đối tượng này cần phải được thực hiện để khẳng định hiệu quả của phương pháp đông lạnh nhanh bằng cryotop. Nghiên cứu này là cơ sở cho việc phát triển và ứng dụng kỹ thuật lưu trữ trứng chưa thành thực bằng kỹ thuật đông lạnh nhanh trong các lĩnh vực bảo tồn đa dạng sinh học ex-situ cũng như y sinh học lâm sàng trong tương lai.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện với sự

hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp cơ sở, mã số CSK 12-03. Nhóm nghiên cứu cảm ơn Phòng thí nghiệm trọng điểm, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH& CN Việt Nam đã cho phép sử dụng kính hiển vi huỳnh quang phục vụ cho đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Al-Fageeh M. B., Marchant R. J., Carden M. J., Smales C. M., 2006. The cold-shock response in cultured mammalian cells: harnessing the response for the improvement of recombinant protein production. *Biotechnol. Bioeng.*, 93: 829-835.
2. Arav A., Zeron Y., Leslie S. B., Behboodi E., Anderson G. B., Crowe J. H., 1996.

- Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology*, 33: 589-599.
3. Bou G., Liu L. Q., Zheng Z., Tian J. T., Kong Q. R., Song J., Wang X. D., Liu Z. H., 2009. Effect of chilling on porcine germinal vesicle stage oocytes at the subcellular level. *Cryobiology*, 59(1): 54-58.
 4. Didion B. A., Pomp D., Martin M. J., Homanics G. E., Markert C. L., 1990. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J. Anim. Sci.*, 68(9): 2803-2810.
 5. Fernández-Reyez F., Ducolomb Y., Romo S., Casas E., Salazar Z., Betancourt M., 2012. Viability, maturation and embryo development in vitro of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices. *Cryobiology*, 64(3): 261-266.
 6. Galeati G., Spinaci M., Vallorani C., Bucci D., Porcu E., Tamanini C., 2011. Pig oocyte vitrification by cryotop method: Effects on viability, spindle and chromosome configuration and in vitro fertilization. *Anim. Reprod. Sci.*, 127(1-2): 43-49.
 7. Graves-Herring J. E., Boone W. R., 2009. Blastocyst rate and live births from vitrification and slow-cooled two-cell mouse embryos. *Fert. Ster.*, 91(3): 920-924.
 8. Gupta M. K., Uhm S. J., Lee H. T., 2007. Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology*, 67(2): 238-248.
 9. Hara K., Abe Y., Kumada N., Aono N., Kobayashi J., Matsumoto H., 2005. Extrusion and removal of lipid from the cytoplasm of porcine oocytes at the germinal vesicle stage: centrifugation under hypertonic conditions influences vitrification. *Cryobiology*, 50(2): 216-222.
 10. Huang W. T., Holtz W., 2002. Effects of Meiotic Stages, Cryoprotectants, Cooling and Vitrification on the Cryopreservation of Porcine Oocytes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 15(4): 485-493.
 11. Inaba Y., Aikawa Y., Hirai T., Hashiyada Y., Yamanouchi T., Misumi K., Ohtake M., Somfai T., Kobayashi S., Saito N., Matoba S., Konishi K., Imai K., 2011. In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop. *J. Reprod. Dev.*, 57(4): 437-443.
 12. Kikuchi K., Onishi A., Kashiwazaki N., Iwamoto M., Noguchi J., Kaneko H., Akita T., Nagai T., 2002. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system. *Biol. Reprod.*, 66(4): 1033-1041.
 13. Kuwayama M., 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *RBMOnline*, 11(3): 300-308.
 14. Liu Y., Du Y., Lin L., Li J., Kragh P. M., Kuwayama M., Bolund L., Yang H., Vajta G., 2008. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and Cryo-top vitrification for cryopreservation of in vitro matured pig oocytes. *Cryo Letters*, 29(4): 315-320.
 15. Maedomari N., Kikuchi K., Ozawa M., Noguchi J., Kaneko H., Ohnuma K., 2007. Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development in vitro. *Theriogenology*, 67(5): 983-993.
 16. Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R. J., Grupen C. G., Seamark R. F., Nottle M. B., 1994. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod.*, 51(4): 618-622.
 17. Nakagawa S., Yoneda A., Hayakawa K., Watanabe T., 2008. Improvement in the in vitro maturation rate of porcine oocytes vitrified at the germinal vesicle stage by treatment with a mitochondrial permeability transition inhibitor. *Cryobiology*, 57(3): 269-275.
 18. Ogawa B., Ueno S., Nakayama N., 2010. Developmental ability of porcine in vitro matured oocytes at the meiosis II stage after vitrification. *J. Reprod. Dev.*, 56(3): 356-361.

19. Somfai T., Noguchi J., Kaneko H., Nakai M., Ozawa M., Kashiwazaki N., Egerszegi I., Ratky J., Nagai T., Kikuchi K., 2010. Production of good-quality porcine blastocysts by in vitro fertilization of follicular oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*, 73(2): 147-156.
20. Wu H., Rui R., Dai J., Zhang C., Ju S., Xie B., Lu B., and Zheng X., 2006. Effects of Cryopreservation on the Developmental Competence, Ultrastructure and Cytoskeletal Structure of Porcine Oocytes. *Mol. Reprod. Develop.*, 73(11): 1454-1462.
21. Zenzes M. T., Bielecki R., Casper R. F., Leibo S. P., 2001. Effects of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil. Steril.*, 75(4): 769-777.
22. Zeron Y., Ocheretny A., Kedar O., Borochoy A., Sklan D., Arav A., 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*, 121(3): 447-445.

CRYOPRESERVATION OF IMMATURE PORCINE OOCYTES BY CRYOTOP

Nguyen Van Hanh, Nguyen Viet Linh, Bui Xuan Nguyen

Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

In our paper, porcine oocytes at GV stage were vitrified in cryotops, thawed, and subsequently in vitro matured. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected from follicles of 4-6 mm in diameter. Some of them were fixed right after collection to evaluate development status before vitrication and/or IVM (group 1). The others were subjected to: normal IVM (group 2); treatment with vitrification media-(group 3); vitrified by cryotops (group 4); centrifugation before vitrified by cryotops (group 5). The results showed that all oocytes in group 1 were at the GV stage. The percentages of cumulus expansion, oocytes showing normal morphology, and MII oocytes in groups 2 and 3 showed no significant difference (100, 100 and 84% vs. 100, 100 and 82%, respectively). Those of group 4 were lower (79%, 68% and 57%, respectively). Group 5 had lowest rates (13%, 23% and 7%, respectively). Similar results of were obtained when oocytes of groups were treated with fluorescein diacetate (FDA) và propidium iodide (PI) for live/dead cell evaluation. These results indicate that vitrification by cryotops can be an effective method for cryopreservation of immature oocytes in pigs before IVM and centrifugation is not needed for successful vitrification.

Keywords: cryotop, cryopresevation, IVM, maturation, porcine oocytes.

Ngày nhận bài: 11-12-2012