

## NGHIÊN CỨU MÔI TRƯỜNG BẢO TỒN TINH DỊCH CỦA CỪU Ở NHIỆT ĐỘ 5°C

ĐỖ VĂN THU, LÊ THÀNH ĐÔ, NGUYỄN ANH

*Viện Công nghệ sinh học*

Nguyên nhân chính làm giảm tỷ lệ thụ tinh của tinh trùng sau bảo tồn là sự giảm hoạt lực của tinh trùng và tăng số tinh trùng bị phá hủy về cấu trúc. Để duy trì sức sống của tinh trùng trong thời gian bảo tồn, cần quan tâm đến môi trường pha loãng và nhiệt độ bảo tồn tinh dịch. Nếu bảo tồn tinh dịch ở nhiệt độ 15°C trong môi trường sữa đã loại bỏ chất béo, tinh trùng chỉ có khả năng thụ tinh tốt trong vòng 24 giờ sau lấy tinh [5]; còn nếu bảo tồn tinh dịch ở 5°C trong môi trường Tris-fructoza-lòng đỏ trứng gà, tinh trùng có khả năng duy trì sự vận động và khả năng thụ tinh trong khoảng thời gian dài hơn [4]. Tuy nhiên, tinh dịch của cừu được bảo tồn ở 5°C có những thay đổi về màng sinh chất của tinh trùng, gây ra bởi nhiệt độ lạnh [2]. Trong công trình này, chúng tôi nghiên cứu môi trường bảo tồn tinh dịch của cừu ở 5°C.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu

Thí nghiệm được thực hiện với 60 mẫu tinh dịch được lấy từ 4 con cừu đực giống Phan Rang có trọng lượng 30-50 kg, ở tuổi 2 đến 3 năm, khoẻ mạnh, giao phối thuận thực, được nuôi tại Trung tâm nghiên cứu dê và thỏ Sơn Tây.

#### 2. Phương pháp

Lấy tinh dịch bằng âm đạo giả (nhiệt độ ở âm đạo giả là 45°C). Kiểm tra chất lượng của tinh dịch sau khi lấy, chỉ sử dụng các mẫu tinh dịch có hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng  $\geq 70\%$ . Hoạt lực tiến thẳng (A) của tinh trùng được xác định theo phương pháp của Milovanov (1962). Tỷ lệ tinh trùng sống theo phương pháp của Morozov (1938). Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình theo phương pháp của Serdiuc (1970).

Môi trường pha loãng: môi trường Tris (TR): Tris-axit xitric-fructoza-lòng đỏ trứng gà-

chất kháng khuẩn; môi trường Tris-bổ sung 1% glyxêrol (TR-Gly1%); môi trường Tris-bổ sung 5% glyxêrol (TR-Gly5%); môi trường Tris-bổ sung 6% dimethylsulfoxit (TR-DMSO 6%). Pha môi trường vào tinh dịch theo tỷ lệ 1:6 (tinh dịch:môi trường), nhiệt độ của môi trường khi pha loãng vào tinh dịch là 34°C. Tinh dịch pha loãng được đựng trong lọ kín và cân bằng trong cốc nước ở 34°C, sau đó chuyển vào tủ bảo tồn ở 5°C. Trong thời gian bảo tồn, tinh dịch pha loãng được đảo nhẹ. Theo dõi sức sống của tinh trùng bảo tồn ở 5°C ở các thời điểm sau pha loãng: 0 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ và 120 giờ. Khi đánh giá phẩm chất của tinh dịch pha loãng, mẫu tinh dịch được ủ ở 38°C. Sử dụng kính hiển vi Olympus với độ phóng đại 100-1000 lần.

Số liệu xử lý theo chương trình phân mềm excel 5.0

### II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. So sánh sức sống của tinh trùng cừu được bảo tồn trong môi trường TR và môi trường TR-glyxêrol 1%

Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy: sau 96 giờ bảo tồn tinh dịch trong hai môi trường TR và TR-Gly1%, tinh trùng có hoạt lực tiến thẳng và tỷ lệ sống khác nhau không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ). Nhưng sau 120 giờ bảo tồn, tinh trùng bảo tồn trong môi trường TR-Gly1% có hoạt lực tiến thẳng cao hơn có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) so với môi trường TR. Sau 96 giờ bảo tồn tinh dịch trong môi trường TR, tỷ lệ sống của tinh trùng khác nhau không có ý nghĩa, so với bảo tồn tinh dịch trong môi trường TR-Gly1%. Kết quả nhận được cho thấy: nếu bảo tồn tinh dịch trong vòng 96 giờ thì không cần bổ sung glyxêrol vào môi trường.

Bảng 1

**Hoạt lực và tỷ lệ sống của tinh trùng trong hai môi trường TR và TR- Gly1%**

Số giờ	Hoạt lực tiến thẳng (%) của tinh trùng		Tỷ lệ sống (%) của tinh trùng	
	TR	TR-Gly 1%	TR	TR-Gly 1%
0	87,86±5,08	88,75±3,54	-	-
24	78,89±11,83	79,17±3,76	79,88±12,17	79,98±5,32
48	76,00±3,87	74,17±3,76	76,14±11,53	74,31±6,07
72	68,33±4,50	64,17±8,01	70,60±11,87	64,70±11,46
96	51,50±18,58	55,00±4,08	64,67±13,43	60,22±3,74
120	30,30±20,33	45,00±7,07	46,33±13,08	51,59±12,48

**2. So sánh sức sống của tinh trùng cừu được bảo tồn trong môi trường TR và môi trường TR-glyxêrol 5%**

Kết quả ở bảng 2 cho thấy: khi bổ sung 5% glyxêrol vào môi trường TR, khả năng duy trì sức sống của tinh trùng không được cải thiện, thậm chí hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng giảm có ý nghĩa ( $P < 0,05$ ) so với môi trường TR, sau 96 giờ bảo tồn. Điều này có nghĩa là

bảo tồn tinh trùng cừu ở nhiệt độ 5°C không cần thiết phải bổ sung glyxêrol với nồng độ 5%. Việc bổ sung glyxêrol với nồng độ 5% sẽ làm thay đổi các đặc điểm hóa lý của môi trường TR, đặc biệt là độ nhớt theo hướng không có lợi cho sự duy trì sức sống của tinh trùng. Tỷ lệ sống và tỷ lệ kỳ hình của tinh trùng khác nhau không có ý nghĩa khi tinh trùng được bảo tồn trong môi trường TR so với môi trường TR-Gly 5%.

Bảng 2

**Kết quả bảo tồn tinh dịch cừu trong hai môi trường TR và TR-Gly 5%**

Số giờ	Hoạt lực tiến thẳng (A%)		Tỷ lệ tinh trùng sống (%)		Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)	
	TR	TR-Gly5%	TR	TR-Gly5%	TR	TR-Gly5%
0	88,33 ± 4,08		91,14 ± 5,34		3,03 ± 1,12	
24	81,67±2,89	81,67±2,89	86,25±1,61	88,03±2,27	3,32±0,56	3,06±1,02
48	73,33±2,89	73,33±2,89	82,24±2,43	80,75±1,69	4,41±0,83	3,92±1,48
72	68,33±2,89	65,00±5,00	80,92±2,54	79,78±1,25	4,97±1,20	4,76±1,00
96	41,67±27,54	31,67±22,55	75,15±2,77	73,93±2,60	5,69±0,58	5,15±1,39
120	26,67±25,17	20,00±26,46	58,85±8,29	56,68±1,50	6,06±0,72	5,88±1,28

**3. So sánh sức sống của tinh trùng cừu được bảo tồn trong môi trường TR-Gly1% và môi trường TR-DMSO 6%**

Kết quả ở bảng 3 cho thấy: hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng bảo tồn trong môi trường TR-DMSO 6% cao hơn không có ý nghĩa ( $P > 0,05$ ) so với bảo tồn tinh dịch trong môi trường TR-Gly1%. Tinh dịch được bảo tồn trong môi

trường TR-DMSO 6% có tỷ lệ tinh trùng kỳ hình thấp hơn có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) so với tinh dịch được bảo tồn trong môi trường TR-Gly1%. Theo chúng tôi, việc bổ sung 6% dimethylsulfoxit vào môi trường TR có tác dụng duy trì sức sống của tinh trùng vì chúng có khả năng giúp cho tinh trùng chống được hiện tượng sốc lạnh, cho nên tinh trùng ít bị tổn thương cấu trúc trong quá trình đông lạnh và bảo tồn lạnh.

Bảng 3

**Kết quả bảo tồn tinh dịch cừu trong hai môi trường TR-Gly 1% và TR-DMSO 6%**

Giờ	Hoạt lực tinh trùng tiến thẳng (%)		Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)	
	TR-Gly1%	TR-DMSO 6%	TR-Gly1%	TR-DMSO 6%
0	88,75±2,50		2,36±1,24	
24	77,50±2,89	82,50±5,00	5,36±2,84	4,10±1,94
48	72,50±2,89	77,50±2,89	7,83±3,57	4,40±2,34
72	65,00±0,00	68,75±2,50	10,31±5,09	5,02±1,94
96	55,00±4,08	57,50±2,89	10,96±5,40	6,48±3,69
120	45,00±7,07	48,75±6,29	11,36±6,30	8,13±2,74

**4. So sánh hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng cừu được bảo tồn ở 5°C trong bốn môi trường**

Hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng cừu bảo tồn ở 5°C trong bốn môi trường TR, TR-Gly1%, TR-Gly 5% và TR-DMSO 6% được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4 cho thấy tinh dịch của cừu pha loãng với bốn môi trường và được bảo tồn ở 5°C có hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng giảm dần tỷ lệ thuận với thời gian bảo tồn. Sau 48

giờ bảo tồn tinh dịch trong các môi trường, hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng khác nhau không có ý nghĩa. Tuy nhiên, hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng cao trong trường hợp tinh dịch được pha với môi trường TR hoặc TR-DMSO 6%. Ở thời điểm 72 giờ sau bảo tồn, tinh dịch được pha với môi trường TR-Gly 5% có hoạt lực tiến thẳng thấp hơn có ý nghĩa so với các môi trường khác. Hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng giảm nhiều sau 96 giờ bảo tồn tinh dịch trong môi trường TR hoặc môi trường TR-Gly 5%.

Bảng 4

**Hoạt lực tiến thẳng (%) của tinh trùng cừu được bảo tồn ở 5°C trong bốn môi trường**

Giờ	Môi trường TR	Môi trường TR-Gly1%	Môi trường TR-Gly5%	Môi trường TR-DMSO 6%
0	87,45	88,75	88,54	88,75
24	81,02	78,47	81,88	82,50
48	75,61	73,06	74,06	77,50
72	68,47	64,31	58,44	68,75
96	44,59	55,00	27,38	57,50
120	28,49	45,00	20,00	48,75

Kết quả này cho thấy môi trường có thành phần cơ bản là tris có ảnh hưởng tốt, duy trì sức sống của tinh trùng trong bảo tồn. Thành phần và tỷ lệ khác nhau của các chất bảo vệ lạnh có ảnh hưởng khác nhau đối với khả năng duy trì sức sống và bảo vệ cấu trúc của tinh trùng. Tris trong môi trường có tác dụng đệm tốt và khuếch tán dễ dàng vào trong tế bào của tinh trùng, thoải mãn giống như các chất trong nội bào. Trong quá trình bảo tồn lạnh, màng tinh

trùng bị phá hủy là thay đổi chính xảy ra trong quá trình hạ nhiệt độ từ 37°C đến 5°C và trong quá trình ủ ở 5°C [9]. Bảo tồn tinh dịch cừu ở 15°C không duy trì khả năng thụ tinh của tinh trùng sau một số ngày. Bảo tồn tinh dịch cừu ở 5°C có khả năng duy trì sự vận động và khả năng thụ tinh của tinh trùng trong khoảng thời gian dài hơn. Tuy nhiên, tinh dịch cừu bảo tồn ở 5°C có những thay đổi về màng sinh chất gây ra bởi nhiệt độ lạnh [2]. Tinh dịch ủ ở 5°C, dù rằng

những thay đổi sốc nhiệt có thể tạo ra những thay đổi trong tinh trùng, nhưng không đến mức phá hủy tinh trùng. Tinh trùng cần các cơ chất có thể trao đổi dễ dàng để duy trì năng lượng cho hoạt động của chúng; lòng đỏ trứng cung cấp các cơ chất cho sự trao đổi chất của tinh trùng; photpholipit của lòng đỏ trứng có thể bảo vệ màng tinh trùng chống lại sốc nhiệt [7]; lòng đỏ trứng có khả năng làm giảm tốc độ peroxy hóa ở tinh trùng cừu [3]. Việc thêm một số chất chống ôxy hóa vào môi trường tris có ảnh hưởng tốt duy trì sức sống và bảo vệ acrosom của tinh trùng trong bảo tồn lỏng ở 5°C [6]. Hoạt động bảo vệ của các nhân tố bảo vệ lạnh như glyxêrol là có khả năng đệm muối, vì vậy giảm được sự phá hủy điện giải khi loại nước [1]. Thêm glyxêrol vào môi trường có tác dụng nâng cao sức sống của tinh trùng trong bảo quản ở 4°C [8].

### III. KẾT LUẬN

1. Môi trường có thành phần cơ bản là tris có khả năng duy trì tốt sức sống của tinh trùng cừu bảo tồn ở nhiệt độ 5°C.

2. Bổ sung 1% glyxêrol hoặc 6% dimethylsulfoxit vào môi trường tris có ảnh hưởng tốt duy trì hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng cừu bảo tồn ở 5°C.

3. Bổ sung 5% glyxêrol vào môi trường tris có ảnh hưởng làm giảm khả năng duy trì sức sống của tinh trùng cừu sau 72 giờ bảo tồn.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Graham E. F.**, 1978: Fundamentals of the preservation of spermatozoa. The integrity of frozen spermatozoa: 4-44. Nat. Acad. Sci., Washington DC.
2. **Holt W. V. and North R. D.**, 1984: J. Exp. Zool., 230: 473-483.
3. **Jones R., Mann T.**, 1977: J. Reprod. Fertil., 50: 261-268.
4. **López A. et al.**, 1999: Acta. vet. Scand., 40: 1-9.
5. **López-Sáez A. et al.**, 2000: Archi. Andro., 44: 155-164.
6. **Maxwell W. M. C. and Stojanov T.**, 1996: Reprod. Fertil. Dev., 8: 1013-1020.
7. **Maxwell W. M. C., Salamon S.**, 1993: Reprod. Fertil. Dev., 5: 613-38.
8. **Shannon P.**, 1964: N. Z. J. Agric. Res., 7: 357-363.
9. **White I. G.**, 1993: Reprod. Fertil. Dev., 5: 639-58.

## RESEARCH ON THE DILUENTS FOR LIQUID STORAGE AT 5°C OF RAM SEMENS

DO VAN THU, LE THANH DO, NGUYEN ANH

### SUMMARY

This research was performed on 60 semen samples collected from four Phanrang breed rams at the Sontay goat and rabbit research Centre (Hatay province). After the collection, only the samples with good progressive motion (> 70%) were accepted and diluted into diluents. The finally dilute rate was 1:6 (semen:diluent). The temperature of diluents when they were diluted into the semens was 34°C and the stored temperature was 5°C. Research was performed on four diluents: TR diluent (Tris-citric acid-fructose-egg yolk-penicillin and streptomycin), TR diluent with 1% Glycerol, TR diluent with 5% glycerol and TR diluent with 6% DMSO. The progressive motion, the survival rate and the abnormal rate of spermatozoa were evaluated during the storage time. The results showed that the TR diluent had maintained a good viability of spermatozoa. Semens stored in the diluents, which had been added either with 1% glycerol or 6% DMSO, had good viability uper 96 hours. The addition of 5% glycerol into the TR diluent reduced its ability to maitain the viability of permatozoa after 72 hours of storage.

Ngày nhận bài: 28-6-2004