DOI: 10.31276/VJST.64(12).54-59

# Ảnh hưởng của phương pháp thủy tinh hóa và giai đoạn phát triển của phôi đến hiệu quả bảo quản lạnh phôi bò sản xuất *in vitro* tại Việt Nam

**Nguyễn Khánh Vân[1*], Vũ Thị Thu Hương[1], Phạm Thị Kim Yến[1], Hoàng Thị Âu[1], Phạm Doãn Lân[2], Lưu Quang Minh[3]**

[1]*Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Động vật, Viện Chăn nuôi, 9 đường Tân Phong, phường Thụy Phương, quận BắcTừ Liêm, thành phố Hà Nội, Việt Nam*
[2]*Viện Chăn nuôi, 9 đường Tân Phong, phường Thụy Phương, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam*
[3]*Bộ Khoa học và Công nghệ, 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

Ngày nhận bài 22/8/2022; ngày chuyển phản biện 25/8/2022; ngày nhận phản biện 26/9/2022; ngày chấp nhận đăng 30/9/2022

***Tóm tắt:***

**Mục đích của nghiên cứu này nhằm so sánh một số phương pháp thủy tinh hóa và giai đoạn phát triển của phôi bò sản xuất *in vitro* đến hiệu quả bảo quản lạnh phôi bò *in vitro* tại Việt Nam. Phôi được đông lạnh theo 2 phương pháp: (1) Thủy tinh hóa bằng cryotop và (2) Thủy tinh hóa bằng microdrop. Tỷ lệ phôi bò thu được sau giải đông của phương pháp (1) cao hơn so với (2) (100 so với 81,01%, p<0,05). Tuy nhiên không có sự khác biệt về tỷ lệ phôi sống, phôi phát triển và giãn nở trở lại, phôi thoát màng sau giải đông giữa phương pháp (1) và (2) (tương ứng 88,43 so với 91,89%; 83,1 so với 84,43% và 20,34 so với 17,79%, p>0,05). Trong nghiên cứu này, tỷ lệ hợp tử sống, phân chia, tạo phôi nang và phôi nang thoát màng sau giải đông tương ứng đạt 86,83, 63,83, 21,39 và 3,91%. Nghiên cứu không nhận thấy sự khác biệt về tỷ lệ phôi sống, phôi thoát màng sau giải đông giữa nhóm phôi dâu/dâu chặt và phôi nang (tương ứng 82,67 so với 88,43%; 16,54 so với 20,34%, p>0,05). Kết quả cho thấy, phôi bò *in vitro* được đông lạnh thành công ở giai đoạn hợp tử, phôi dâu/dâu chặt hoặc phôi nang bằng phương pháp thủy tinh hóa.**

***Từ khóa:*** **cryotop, microdrop, phôi bò sản xuất *in vitro*, thủy tinh hóa.**

***Chỉ số phân loại:*** **4.2**

## 1. Đặt vấn đề

Quy trình sản xuất phôi bò *in vitro*; bảo quản lạnh phôi bò *in vitro*; cấy chuyển phôi bò *in vitro* đã và đang được sử dụng rộng rãi trong nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới. Cùng với sự phát triển của kỹ thuật siêu âm thu tế bào trứng, kỹ thuật bảo quản lạnh phôi bò ngày càng phát triển và được ứng dụng mang tính thương mại. Bảo quản lạnh phôi bò *in vitro* có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ nguồn vật liệu di truyền trong hệ thống chăn nuôi gia súc truyền thống [1]. Khoảng 9,5% trong tổng số 385.000 phôi bò *in vitro* được sử dụng cho cấy chuyển phôi trên thế giới có nguồn gốc từ phôi đông lạnh và khoảng 250.000 phôi bò *in vivo* đông lạnh được sử dụng cho cấy chuyển phôi [2]. Tuy nhiên, tỷ lệ có chửa sau cấy chuyển phôi bò *in vitro* đông lạnh - giải đông vẫn thấp hơn so với phôi bò không đông lạnh hoặc phôi bò *in vivo* đông lạnh - giải đông. Thành công của quá trình bảo quản lạnh phôi bò *in vitro* phụ thuộc vào một số yếu tố, trong đó chất lượng phôi trước khi đông lạnh và phương pháp đông lạnh có vai trò quan trọng, ảnh hưởng đến khả năng sống và phát triển tiếp theo của phôi sau đông lạnh - giải đông.

Mục đích của bảo quản lạnh phôi là duy trì, lưu giữ phôi ở trạng thái hiện có của chúng và cho phép chúng phát triển sau khi được giải đông. Khi được bảo quản ở nhiệt độ thấp, các hoạt động của emym nội bào, hô hấp tế bào, trao đổi chất, sự phân chia của phôi được tạm dừng. Do đó, phôi có thể được bảo quản mà không gây ra bất kỳ tổn thương di truyền nào [3]. Phôi bò thường được đông lạnh bằng phương pháp đông lạnh chậm hoặc thủy tinh hóa [4]. Đông lạnh chậm gây nhiều tổn thương cho phôi của động vật có vú do sự hình thành tinh thể đá nội bào và độc tố của chất bảo vệ lạnh. Thủy tinh hóa là một quy trình vật lý mà theo đó dung dịch chuyển sang dạng ổn định như thủy tinh bằng cách làm lạnh nhanh chóng nhưng không có sự hình thành tinh thể đá [5]. Quá trình thủy tinh hóa được thực hiện trong dung dịch thủy tinh hóa có chứa nồng độ cao chất bảo vệ lạnh với một tốc độ đông lạnh nhanh nhằm ngăn chặn sự hình thành tinh thể đá. Phương pháp đông lạnh thủy tinh hóa là cách tiếp cận tối ưu vì có thể tránh được tổn thương lạnh và sự hình thành tinh thể đá. Thời gian từ lúc khử nước nội bào đến lúc kết thúc quá trình đông lạnh xảy ra rất nhanh.

Thủy tinh hóa 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 ngăn ngừa được sự hình thành tinh thể đá nội bào. Phương pháp đông lạnh chậm truyền thống thường sử dụng đơn lẻ chất bảo vệ lạnh như glycerol, ethylene glycol hay dimethyl sulfoxide. Trong khi đó, phương pháp thủy tinh hóa thường sử dụng kết hợp các

*Tác giả liên hệ: Email: cotihin@gmail.com

# Influence of the method of vitrification and developmental stages of embryos on cryopreservation efficiency of *in vitro* bovine embryos produced in Vietnam

**Khanh Van Nguyen[1*], Thi Thu Huong Vu[1], Thi Kim Yen Pham[1], Thi Au Hoang[1], Doan Lan Pham[2], Quang Minh Luu[3]**

[1]*Key Laboratory of Animal Cell Technology, Institute of Animal Husbandry, 9 Tan Phong Street, Thuy Phuong Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi City, Vietnam.*
[2]*Institute of Animal Husbandry, 9 Tan Phong Street, Thuy Phuong Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi City, Vietnam.*
[3]*Ministry of Science and Technology, 113 Tran Duy Hung, Trung Hoa Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam*

Received 22 August 2022; revised 26 September 2022; accepted 30 September 2022

***Abstract:***

**The study aimed to evaluate the influence of different vitrification methods and developmental stages of bovine embryos produced *in vitro* during cryopreservation in Vietnam. *In vitro* bovine embryos were frozen by two methods: (1) Vitrification by cryotop and (2) Vitrification by microdrop. The percentage of embryos obtained after thawing of method (1) was higher than that of (2) (100 vs 81.01%, p<0.05). However, there was no difference in survival, re-expansion and hatching blastocyst rates after thawing between the two methods (1) and (2) (88.43 vs 91.89%; 83.1 vs 84.43%; and 20.34 vs 17.79%, p>0.05; respectively). In this study, the survival, cleavage, blastocyst and hatching blastocyst rates of *in vitro* bovine zygotes after thawing were 86.83, 63.83, 21.39, and 3.91%, respectively. The authors did not observe any difference in survival and hatching blastocyst rates after thawing while vitrification at morula/compact morula and blastocyst stages (82.67 vs 88.43%, 16.54 vs 20.34%, p>0.05; respectively). The results showed that *in vitro* bovine embryos were successfully frozen at the zygotes, the morula/compact morula and blastocyst stage by vitrification.**

***Keywords:*** **bovine embryos produced *in vitro*, cryotop, microdrop, vitrification.**

***Classification number:*** **4.2**

chất bảo vệ lạnh như glycerol + ethylene glycol; glycerol + dimethyl sulfoxide… [6]. Việc sử dụng kết hợp các chất bảo vệ lạnh sẽ nâng cao khả năng sống của phôi sau đông lạnh - giải đông. Thủy tinh hóa phôi bằng cryotop đã được ứng dụng thành công ở bò với tỷ lệ phôi sống sau đông lạnh - giải đông đạt >70% [2, 7].

Việc lựa chọn giai đoạn phát triển của phôi phù hợp với quá trình thủy tinh hóa vẫn còn nhiều tranh cãi [8]. Bảo quản lạnh phôi ở giai đoạn phôi nang cho phép cấy chuyển phôi ngay sau khi giải đông mà không cần phải nuôi phôi *in vitro* sau đông lạnh - giải đông [9]. Một số nhà nghiên cứu nhận thấy, bảo quản lạnh phôi nang ở giai đoạn sớm sẽ tốt hơn giai đoạn phôi nang giãn nở [10]; và phôi bò đông lạnh ở giai đoạn 4-8 tế bào chỉ tiếp tục phát triển đến giai đoạn phôi dâu sau đông lạnh - giải đông [8]. Tuy nhiên, nếu phôi được đông lạnh - giải đông ở giai đoạn sớm và tiếp tục phát triển đến giai đoạn phôi nang sau nuôi *in vitro* thì việc sử dụng các phôi nang này cho cấy chuyển sẽ giống như sử dụng phôi không đông lạnh [11].

Tại Việt Nam, có rất ít báo cáo về đông lạnh phôi bò sản xuất *in vitro* bằng phương pháp thủy tinh hóa. Xuất phát từ nhu cầu thực tế đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của phương pháp đông lạnh và giai đoạn phát triển của phôi bò sản xuất *in vitro* đến hiệu quả bảo quản lạnh phôi bò *in vitro*.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### *2.1. Vật liệu*

Tất cả các hóa chất sử dụng cho thí nghiệm trong nghiên cứu này được mua của Hãng Sigma-Aldrich Chemical, St.Louis, MO, Mỹ. Sử dụng cryotop của Hãng Kitazato, Nhật Bản; pipette tạo microdrop mua của Hãng Hirschman, Đức cho quá trình thủy tinh hóa trong nghiên cứu này.

Nghiên cứu được thực hiện trên phôi bò thịt lai Sind thụ tinh *in vitro*.

### *2.2. Phương pháp nghiên cứu*

*Thủy tinh hóa phôi bò in vitro bằng cryotop:*

- Chuẩn bị môi trường:

+ Môi trường lưu phôi bò: M199-Hepes có bổ sung 10% huyết thanh thai bê và kháng sinh (100 iu Penicillin/ml + 0,1 mg Streptomycin/ml).

+ Môi trường cân bằng: M199-Hepes có bổ sung 10% (v/v) huyết thanh thai bê, 10% (v/v) ethylene glycol, 10% (v/v) dymethylsulfoxide.

+ Môi trường thủy tinh hóa: M199-Hepes có bổ sung 10% huyết thanh thai bê, 20% ethylene glycol (v/v), 20% dymethylsulfoxide (v/v), 0,5 M sucrose.

- Thủy tinh hóa phôi bò bằng cryotop:

+ Phôi bò được rửa 3 lần trong môi trường lưu phôi trước khi chuyển vào môi trường cân bằng. Phôi bò được để trong môi trường cân bằng trong vòng 3 phút sau đó chuyển sang môi trường thủy tinh hóa và được nạp vào cryotop ở 22-24°C. Sau đó, cryotop được nhúng ngập trực tiếp vào trong dung dịch nitơ lỏng trong vòng 25 giây.

+ Phôi được bảo quản trong dung dịch nitơ lỏng cho tới khi giải đông.

*Thủy tinh hóa phôi bò bằng microdrop:*

- Chuẩn bị môi trường:

+ Môi trường lưu phôi bò: M199-Hepes có bổ sung 10% huyết thanh thai bê và kháng sinh (100 iu Penicillin/ml + 0,1 mg Streptomycin/ml).

+ Môi trường cân bằng: M199-Hepes có bổ sung 10% huyết thanh thai bê (v/v), 10% ethylene glycol (v/v), 10% dymethylsulfoxide (v/v).

+ Môi trường thủy tinh hóa: M199-Hepes có bổ sung 10% huyết thanh thai bê, 20% ethylene glycol (v/v), 20% dymethylsulfoxide (v/v) và 0,5 M sucrose.

- Thủy tinh hóa phôi bò bằng microdrop:

+ Phôi bò được rửa 3 lần trong môi trường lưu phôi trước khi chuyển vào môi trường cân bằng. Phôi bò được để trong môi trường cân bằng trong vòng 3 phút sau đó chuyển sang môi trường thủy tinh hóa và được hút vào một pipette, rồi thả thẳng trực tiếp lên bề mặt giấy bạc đã được làm lạnh 5-10 phút trước đó trên dung dịch nitơ lỏng để ngay lập tức tạo thành các giọt thủy tinh hóa có chứa phôi với lượng thể tích 1-2 µl. Thời gian từ lúc chuyển phôi sang môi trường thủy tinh hóa cho đến khi tạo giọt thủy tinh hóa trên bề mặt giấy bạc là 25 giây.

+ Các giọt thủy tinh hóa có chứa phôi sẽ được chuyển sang các ống Cryotube và bảo quản trong dung dịch nitơ lỏng.

*Giải đông phôi bò sau thủy tinh hóa bằng cryotop:*

- Chuẩn bị môi trường giải đông:

+ Môi trường T1: M199-Hepes có bổ sung 20% huyết thanh thai bê và kháng sinh (100 iu Penicillin/ml + 0,1 mg Streptomycin/ml).

+ Môi trường T2: M199-Hepes có bổ sung 0,5 M sucrose, 20% huyết thanh thai bê và kháng sinh (100 iu Penicillin/ml + 0,1 mg Streptomycin/ml).

- Giải đông phôi bò sau thủy tinh hóa bằng cryotop:

+ Cryotop chứa phôi bò được lấy ra khỏi dung dịch nitơ lỏng và chuyển ngay lập tức vào môi trường T2 ở 38,5°C trong vòng 5 phút.

+ Sau 5 phút phôi được chuyển sang môi trường T1 trong vòng 5 phút để loại bỏ hết các chất bảo vệ lạnh.

*Giải đông phôi bò sau thủy tinh hóa bằng microdrop:*

- Chuẩn bị môi trường giải đông:

+ Môi trường T1: M199-Hepes có bổ sung 20% huyết thanh thai bê và kháng sinh (100 iu Penicillin/ml + 0,1 mg Streptomycin/ml).

+ Môi trường T2: M199-Hepes có bổ sung 0,5 M sucrose, 20% huyết thanh thai bê và kháng sinh (100 iu Penicillin/ml + 0,1 mg Streptomycin/ml).

- Giải đông phôi bò sau thủy tinh hóa bằng microdrop:

+ Cryotube có chứa các giọt thủy tinh hóa có phôi bò đông lạnh sau khi lấy ra khỏi dung dịch nitơ lỏng ngay lập tức được đổ lại trên bề mặt giấy bạc đã được làm lạnh 5-10 phút trên dung dịch nitơ lỏng trước đó. Tiếp theo, các giọt thủy tinh hóa có chứa phôi đông lạnh được chuyển sang môi trường T2 ở 38,5°C trong vòng 5 phút.

+ Sau 5 phút, phôi được chuyển sang môi trường T1 trong vòng 5 phút để loại bỏ hết các chất bảo vệ lạnh.

*Nuôi in vitro phôi bò sau đông lạnh - giải đông:*

- Chuẩn bị môi trường nuôi phôi bò sau đông lạnh - giải đông: môi trường SOF có bổ sung 2,5% huyết thanh thai bê.

- Nuôi *in vitro* phôi bò sau đông lạnh - giải đông: phôi bò sau giải đông được rửa 3 lần trong môi trường nuôi SOF có bổ sung 2,5% huyết thanh thai bê. Tiếp theo, chuyển phôi bò sang nuôi 24-48 giờ trong môi trường nuôi SOF có bổ sung huyết thanh thai bê ở điều kiện 38,5°C, 5% $CO_2$, 5% $O_2$ và độ ẩm không khí bão hòa để đánh giá khả năng sống và phát triển trở lại của phôi bò sau đông lạnh - giải đông.

*Xử lý số liệu:* Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excell 2010 và Minitab, sự sai khác có ý nghĩa được kiểm tra bằng $\chi^2$ sử dụng hàm CHITEST, sự sai khác có ý nghĩa với $p<0,05$.

## 3. Kết quả và bàn luận

### *3.1. Ảnh hưởng của phương pháp đông lạnh đến hiệu quả bảo quản lạnh phôi bò in vitro*

Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng 2 phương pháp đông lạnh: (1) Thủy tinh hóa bằng cryotop và (2) Thủy tinh hóa bằng microdrop. Tất cả các phôi bò *in vitro* sử dụng cho thí nghiệm này đều ở giai đoạn phôi nang thu ở ngày thứ 7 sau thụ tinh *in vitro*. Hiệu quả của 2 phương pháp đông lạnh được đánh giá dựa trên các tiêu chí: số phôi thu được, số phôi sống, số phôi phát triển và giãn nở trở lại, số phôi thoát màng sau đông lạnh - giải đông. Kết quả thể hiện ở bảng 1 cho thấy, không có sự sai khác có ý nghĩa về tỷ lệ phôi sống, phôi giãn nở trở lại và phôi thoát màng sau đông lạnh - giải đông đối với cả 2 nhóm cryotop và nhóm microdrop (tương ứng 88,43 so với 91,89%; 83,1 so với 84,43% và 20,34 so với 17,79%, $p>0,05$).

**Bảng 1. Khả năng thu hồi và phát triển *in vitro* của phôi bò *in vitro* sau thủy tinh hóa bằng cryotop hoặc microdrop.**

| Phương pháp đông lạnh | Số phôi được đông lạnh | Số phôi thu được sau đông lạnh - giải đông % (Mean ±SE) | Số phôi sống sau đông lạnh - giải đông % (Mean ±SE) | Số phôi phát triển và giãn nở trở lại sau đông lạnh - giải đông % (Mean ±SE) | Số phôi thoát màng % (Mean±SE) |
|---|---|---|---|---|---|
| Cryotop | 62 | 62 (100)[a] | 54 (88,43±3,01)[a] | 50 (83,1±4,04)[a] | 12 (20,34±2,92)[a] |
| Microdrop | 62 | 51 (81,01±3,06)[b] | 46 (91,89±2,62)[a] | 42 (84,43±4,32)[a] | 9 (17,79±3,87)[a] |

Ghi chú: thí nghiệm được thực hiện với 8 lần lặp lại, các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($p<0,05$).

Tốc độ đông lạnh là một trong những yếu tố quan trọng đảm bảo cho sự thành công của quá trình đông lạnh. Tốc độ đông lạnh nhanh làm giảm thời gian tiếp xúc của phôi với nhiệt độ, giảm bớt độc tố của chất bảo vệ lạnh, qua đó giảm thiểu các tổn thương của phôi trong quá trình đông lạnh. Tốc độ đông lạnh tăng sẽ giúp phôi tránh được những tổn thương lạnh, làm giảm nồng độ chất bảo vệ lạnh giúp tế bào vượt qua vùng nhiệt độ giới hạn (-5 đến -15°C) một cách nhanh chóng, nước nội bào sẽ đi ra ngoài tế bào và đông lạnh ở bên ngoài. Điều này sẽ ngăn chặn tổn thương lạnh đối với các giọt lipid nội bào, lipid có trong màng tế bào và bộ khung xương tế bào. Tốc độ đông lạnh phụ thuộc vào vật chứa mẫu, độ dẫn điện và thành phần dung dịch [12]. Khi lượng thể tích dung dịch chứa mẫu được giảm thiểu sẽ làm tăng tốc độ đông lạnh - giải đông phôi [12]. Đối với cả 2 phương pháp thủy tinh hóa bằng cryotop và microdrop, lượng dung dịch thủy tinh hóa chứa mẫu đông lạnh chỉ dao động trong khoảng 1-3 µl. Việc sử dụng một lượng nhỏ thể tích dung dịch thủy tinh hóa sẽ làm tăng tốc độ đông lạnh, nhờ đó giảm thiểu hiện tượng bị nứt vỡ màng sáng, tổn thương màng sinh chất khi phôi được tiếp xúc trực tiếp với dung dịch nitơ lỏng, qua đó nâng cao tỷ lệ phôi sống sau đông lạnh - giải đông [13, 14].

Để nâng cao hiệu quả quá trình thủy tinh hóa phôi bò, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng hỗn hợp chất bảo vệ lạnh ethylene glycol và dimethyl sulfoxide. Đây là những chất bảo vệ lạnh thấm màng có khối lượng phân tử thấp. Các chất bảo vệ lạnh thấm màng có khả năng thấm màng, hoạt động trong nội bào như một chất bảo vệ thông qua việc hình thành liên kết hydrogen với phân tử nước và ngăn chặn sự hình thành tinh thể đá nội bào trong quá trình đông lạnh [15]. Ngoài ra, khi sử dụng kết hợp các chất bảo vệ lạnh với nhau trong quá trình thủy tinh hóa sẽ giảm bớt những ảnh hưởng bất lợi của chúng đối với tế bào trong quá trình thủy tinh hóa [16].

**Hình 1. Phôi nang bò *in vitro* giãn nở và phát triển trở lại sau đông lạnh - giải đông.**

Mặc dù không có sự sai khác có ý nghĩa về tỷ lệ phôi sống, phôi giãn nở trở lại và phôi thoát màng sau đông lạnh - giải đông, tuy nhiên số lượng phôi nang bò *in vitro* thu được sau đông lạnh - giải đông của nhóm cryotop cao hơn có ý nghĩa so với microdrop (tương ứng 100 so với 81,01%, $p<0,05$). Tỷ lệ thu được 100% phôi sau đông lạnh - giải đông đối với phương pháp đông lạnh bằng cryotop đã được một số tác giả báo cáo. Theo L.O. Leme và cs (2017) [17], A.D. Rosa và cs (2010) [18], tỷ lệ phôi bò *in vitro* thu được sau đông lạnh - giải đông bằng cryotop đạt 100%. V.K. Nguyen và cs (2018) [19] cũng nhận thấy việc mất một số lượng phôi sau đông lạnh - giải đông bằng phương pháp microdrop. Việc mất phôi sau đông lạnh - giải đông bằng phương pháp microdrop có thể là do phôi bị bám dính vào pipette thủy tinh trong quá trình thủy tinh hóa. Đó cũng chính là nhược điểm của phương pháp thủy tinh hóa bằng microdrop so với cryotop [19]. Chính vì vậy, theo quan điểm của chúng tôi nên sử dụng phương pháp thủy tinh hóa bằng cryotop cho quá trình bảo quản lạnh phôi của những động vật nuôi có giá trị.

### *3.2. Ảnh hưởng của giai đoạn phát triển của phôi bò đến hiệu quả bảo quản lạnh phôi bò*

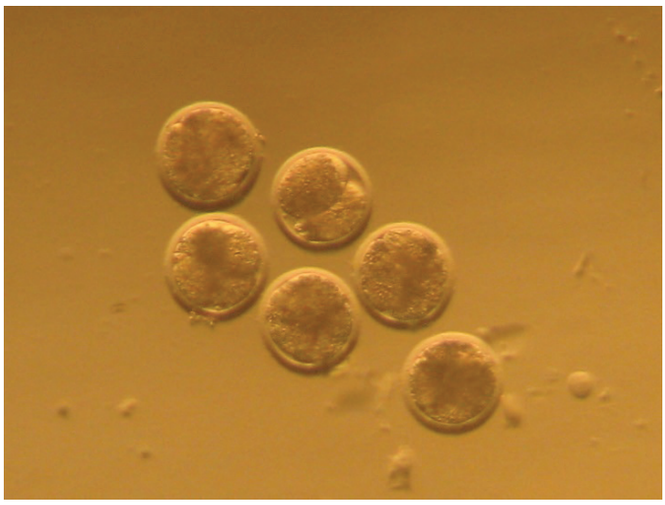
Để đánh giá ảnh hưởng của giai đoạn phát triển phôi bò đến hiệu quả bảo quản lạnh phôi bò, trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng phương pháp thủy tinh hóa bằng cryotop cho quá trình đông lạnh phôi bò ở 3 giai đoạn: (1) Hợp tử (10 giờ sau thụ tinh *in vitro*), (2) Phôi dâu/dâu chặt và (3) Phôi nang. Hiệu quả bảo quản lạnh phôi dê được đánh giá

dựa trên các tiêu chí: số phôi sống và phát triển trở lại, số phôi thoát màng sau đông lạnh - giải đông. Kết quả thể hiện ở bảng 2 cho thấy, không có sự sai khác có ý nghĩa về tỷ lệ phôi sống sau giải đông ở cả 3 nhóm hợp tử, phôi dâu/dâu chặt và phôi nang (tương ứng 86,83, 82,67 và 88,43%, p>0,05), tuy nhiên nhóm phôi nang vẫn có tỷ lệ sống sau giải đông cao hơn so với nhóm hợp tử và nhóm phôi dâu/dâu chặt. Kết quả này của chúng tôi tương tự như báo cáo của J.C. Huang và cs (2006) [13], V.K. Nguyen và cs (2021) [20]. Các tác giả này cũng cho rằng việc đông lạnh phôi ở giai đoạn phôi nang cho tỷ lệ sống sau đông lạnh-giải đông cao hơn giai đoạn phôi dâu/dâu chặt.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của giai đoạn phát triển của phôi bò đến hiệu quả bảo quản lạnh phôi bò.**

| Loại phôi | Số phôi được đông lạnh | Số phôi sống sau giải đông % (Mean ±SE) | Số phôi phân chia sau giải đông % (Mean ±SE) | Số phôi nang được hình thành hoặc giãn nở trở lại sau giải đông % (Mean ±SE) | Số phôi nang thoát màng % (Mean±SE) |
|---|---|---|---|---|---|
| Hợp tử | 246 | 214 (86,83±1,79)[a] | 157 (63,83±1,66) | 54 (21,39±2,02) | 11 (3,91±1,07) |
| Dâu/dâu chặt | 69 | 58 (82,67±4,06)[a] | | 42 (60,25±4,4)[a] | 12 (16,54±2,4)[a] |
| Nang | 62 | 54 (88,43±3,01)[a] | | 50 (83,1±4,04)[b] | 12 (20,34±2,92)[a] |

Ghi chú: thí nghiệm được thực hiện với 10 lần lặp lại, các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa (p<0,05).



**Hình 2. Hợp tử bò *in vitro* phân chia sau giải đông.**

Sự khác biệt về cấu trúc giữa phôi nang và phôi dâu chính là phôi nang có khoang phôi. Nguyên nhân có thể là do sau khi hình thành khoang phôi, màng tế bào của phôi có khả năng chống lại các stress thẩm thấu và độc tố của chất bảo vệ lạnh trong dung dịch thủy tinh hóa tốt hơn, do đó phôi nang sẽ có khả năng chịu đựng tổn thương lạnh tốt hơn phôi dâu trong quá trình đông lạnh - giải đông [13]. Thêm vào đó, phôi ở giai đoạn phôi nang có sự đa dạng của các dạng tế bào, đặc biệt là trong quá trình hình thành phôi bào của lá nuôi phôi sẽ xảy ra sự gia tăng hoạt động Na/K ATPase, điều này có ảnh hưởng tích cực đến hoạt động của chất bảo vệ lạnh, giúp cho chất bảo vệ lạnh phát huy tối đa vai trò của mình trong quá trình đông lạnh - giải đông [21]. Một điểm khác biệt nữa trong cấu trúc của phôi dâu/dâu chặt với phôi nang chính là kích thước các phôi bào. Kích thước các tế bào của phôi dâu hoặc phôi dâu chặt lớn hơn so với kích thước các tế bào của phôi nang, đây cũng có thể là một trong những nguyên nhân khiến cho khả năng thẩm thấu cũng như loại bỏ các chất bảo vệ lạnh trong quá trình đông lạnh - giải đông của phôi dâu/dâu chặt kém hơn so với phôi nang [22].

Tỷ lệ hợp tử bò *in vitro* sống sau giải đông trong nghiên cứu này thấp hơn so với báo cáo của V.K. Nguyen và cs (2018) [19]. Theo nhóm tác giả này, tỷ lệ hợp tử lợn *in vitro* sống sau giải đông đạt 98,5%. Sự khác nhau này có thể là do chất lượng phôi, nguồn gốc phôi, chất bảo vệ lạnh sử dụng. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, phôi bò *in vitro* được bảo quản lạnh thành công ở giai đoạn hợp tử với tỷ lệ phân chia, tạo phôi nang và phôi nang thoát màng tương ứng đạt 63,83, 21,39 và 3,91%. Bảo quản lạnh thành công phôi ở giai đoạn hợp tử có vai trò quan trọng trong việc tạo động vật chuyển gen [23]. Một số nhà nghiên cứu đã đông lạnh và cấy truyền phôi ở giai đoạn phôi sớm nhằm cải thiện khả năng phát triển của phôi *in vitro* sau đông lạnh - giải đông [24]. Theo T. Somfai và cs (2009) [24], việc đông lạnh và cấy truyền phôi ở giai đoạn phôi sớm có thể loại trừ được nguyên nhân stress gây ra bởi các điều kiện nuôi phôi *in vitro*. Bảo quản lạnh phôi ở giai đoạn hợp tử đã được thực hiện thành công ở lợn [24], người [25], chuột [26] và thỏ [27].

Theo J. Laurincik và cs (1994) [28], thời điểm tổng hợp ADN (pha S) của hợp tử bò *in vivo* được ước tính là 7-9 giờ sau rụng trứng. Quá trình đông lạnh làm thay đổi và có những ảnh hưởng bất lợi lên sự tổng hợp ADN ở các dạng tế bào khác nhau [29, 30]. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đông lạnh hợp tử bò tại thời điểm 10 giờ sau thụ tinh *in vitro*. Kết quả cho thấy, đã bảo quản lạnh thành công hợp tử bò với tỷ lệ phôi nang hình thành và tỷ lệ phôi nang thoát màng từ hợp tử sau giải đông tương ứng đạt 21,39 và 3,91% (bảng 2). Trong nghiên cứu của chúng tôi, mặc dù tỷ lệ hợp tử sống sau giải đông cao (86,83%, bảng 2) nhưng khả năng phát triển *in vitro* đến giai đoạn phôi nang vẫn bị giảm đáng kể. Cơ chế hóa học của việc giảm khả năng phát triển của hợp tử sau đông lạnh - giải đông có thể là do hợp tử sau giải đông nhạy cảm với stress ôxy hóa và mức tăng của các phản ứng ôxy hóa loài được tạo ra bởi quá trình đông lạnh [24].

## Kết luận

Nghiên cứu đã bảo quản lạnh thành công phôi bò sản xuất *in vitro* ở giai đoạn hợp tử, dâu/dâu chặt, nang bằng phương pháp thủy tinh hóa với tỷ lệ phôi sống sau đông lạnh - giải đông tương ứng đạt 86,83, 82,67 và 88,43%.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện thông qua đề tài: "Nghiên cứu phương pháp thủy tinh hóa phôi bò *in vitro*" từ nguồn kinh phí hỗ trợ hoạt động thường xuyên của Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A.N. Ha, H.S. Park, J.I. Jin, et al. (2014), "Posthaw survival of *in vitro*-produced bovine blastocysts loaded onto the inner surface of a plastic vitrification straw", *Theriogenology*, **81**, pp.467-473, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.10.024.

[2] Y. Inaba, Y. Aikawa, T. Hirai, et al. (2011), "Instraw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using cryotop", *Journal of Reprodcution and Development*, **57**, pp.437-443, DOI: 10.1262/jrd.10-154m.

[3] A. Massip (2001), "Cryopreservation of embryos of farm animals", *Reprod. Dom. Anim.*, **36**, pp.49-55, DOI: 10.1046/j.1439-0531.2001.00248.x.

[4] S.P. Leibo (2008), "Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis", *Theriogenology*, **69**, pp.37-47, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.10.006.

[5] G. Vajta, Z.P. Nagy, A. Cobo, et al. (2009), "Vitrification in assisted reproduction: Myths, mistakes, disbeliefs and confusion", *Reprod. Biomed. Online*, **19(3)**, pp.1-7, DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60278-7.

[6] J.R. Prentice, M. Anzar (2011), "Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics", *Vet. Med. Int.*, pp.1-11, DOI: 10.4061/2011/146405.

[7] A.K. Paul, Y.Y. Liang, T. Nagai, et al. (2014), "*In vitro* development potentiality of expanded bovine blastocyst subsequent to cryotop vitrification". *Thai J. Vet. Med.*, **44(4)**, pp.513-521, DOI:10.56808/2985-1130.2603.

[8] V. Asgari, S.M. Hosseini, M. Forouzanfar, et al. (2012), "Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: Effect of embryonic block and developmental kinetics", *Cryobiology*, **65(3)**, pp.278-283, DOI: 10.1016/j.cryobiol.2012.08.002.

[9] A. Aono, H. Nagatomo, T. Takuma, et al. (2013), "Dynamic of intracellular phospholipid membrance organization during oocytes maturation and successful vitrification of immature oocytes retrieved by ovum pick-up in cattle", *Theriogenology*, **79**, pp.1146-1152, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.02.009.

[10] A. Shirazi, H. Nazari, E. Ahmadi, et al. (2009), "Effect of culture system on survival rate of vitrified bovine embryos produced *in vitro*", *Cryobiology*, **59(3)**, pp.285-290, DOI: 10.1016/j.cryobiol.2009.08.003.

[11] V.H. Do, A.W.T. Robincon (2020), "Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos by vitrification: In pursuit of a simplified, standardized procedure that improves pregnancy rates to promote cattle industry use", *Biotechnology in Animal Husbandry*, **36(3)**, pp.251-270, DOI: 10.2298/BAH2003251H.

[12] S. Yavin, A. Arav (2007), "Measurement of essential physical properties of vitrification solutions", *Theriogenology*, **67**, pp.81-89, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.029.

[13] J.C. Huang, H.H. Lin, J.S. Wu, et al. (2006), *Vitrification of Caprine Embryos in Microdrops*, Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture, pp.47-58.

[14] A. Dinneys, D. Sage, T. Somfai, et al. (2004), "Cryopreservation of *in vitro* porcine oocytes by solid surface vitrification (SSV)", *Reprodcution Fertility and Development*, **17(2)**, pp.191-192, DOI:10.1071/RDv17n2Ab83.

[15] K. Edashige, M. Kasai (2007), "The movement of water and cryoprotectants in mammalian oocytes and embryos and its relevance to cryopreservation", *J. Mamm. Ova. Res*, **24**, pp.18-22, DOI:10.1274/jmor.24.18.

[16] K.G.H.M. Mahmoud, T.H. Scholkamy, Y.F. Ahmed, et al. (2010), "Effect of different combinations of cryoprotectants on *in vitro* maturation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods", *Reprod. Dom. Anim.*, **45**, pp.565-571, DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01293.x.

[17] L.O. Leme, M.A.N. Dode (2017), "Effect of sex on survival of bovine

*in vitro* produced embryos vitrified by cryotop", *Anim. Reprod.*, **14**, p.885.

[18] A.D. Rosa, L. Attanasio, L. Boccia, et al. (2010), "Cryotop vitrification for *in vitro* produced bovine and buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos at different stages of development", *Ital.J. Anim. Sci.*, **6(2)**, pp.747-750, DOI:10.4081/ijas.2007.s2.747.

[19] V.K. Nguyen, T.T.H. Vu, T.H. Nguyen, et al. (2018), "Comparison of the microdrop and minimum volume cooling methods for vitrification of porcine *in vitro* produced zygites and blastocyst after equilibration in low concentrations of cryoprotectnt agents", *J. Reprod. Dev.*, **64(5)**, pp.457-462, DOI: 10.1262/jrd.2018-047.

[20] K.V. Nguyen, T.T.H. Vu, T.A. Hoang, et al. (2021), "Influence of cryopreservation and development stages of embryos on Saanen goat embryos during cold storage in Vietnam", *Journal of Animal Husbandry Sciences and Technics*, **268**, pp.35-39, DOI:10.31276/VJST.64(12).54-59.

[21] S. Naitana, P. Loi, S. Ledda, et al. (1996), "Effect of biopsy and vitrification on *in vitro* survival of ovine embryos at different stages of development", *Theriogenolpgy*, **46**, pp.813-824, DOI: 10.1016/s0093-691x(96)00239-7.

[22] S. Tachikawa, T. Otoi, S. Kondo, et al. (1993), "Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by *in vitro* maturation and fertilization", *Mol. Reprod. Dev.*, **34**, pp.266-271, DOI: 10.1002/mrd.1080340306.

[23] L. Keskintepe, Y. Agca, G.A. Pacholczyk, et al. (2001), "Use of cryopreserved pronuclear embryos for the pridcution of transgenic mice", *Biol. Reprod.*, **65**, pp.407-411, DOI: 10.1095/biolreprod65.2.407.

[24] T. Somfai, M. Ozawa, J. Noguchi, et al. (2009), "Live piglets derived from *in vitro* produced zygotes vitrified at the pronuclear stage", *Biology of Reproduction*, **80**, pp.42-49, OI: 10.1095/biolreprod.108.070235.

[25] S.A. Hasani, M. Ludwig, F. Gagsteiger, et al. (1996), "Comparison of cryopreservation of supernumerary pronuclear human oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and after conventional *in vitro* fertilization", *Hum. Reprod.*, **11**, pp.604-607, DOI: 10.1093/humrep/11.3.604.

[26] H. Bagis, H. Odaman, H. Sagirkaya, et al. (2002), "Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos", *Mol. Reprod. Dev.*, **61**, pp.173-179, DOI: 10.1002/mrd.1144.

[27] S. Hochi, T. Terao, M. Kamei, et al. (2004), "Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure", *Theriogenology*, **61**, pp.267-275, DOI: 10.1016/s0093-691x(03)00232-2.

[28] J. Laurincik, V. Kopecny, P. Hyttel (1994), "Pronucleus development and DNA synthesis in bovine zygotes *in vivo*", *Theriogenology*, **42(8)**, pp.1285-1293, DOI: 10.1016/0093-691X(94)90248-H.

[29] H. Balakier, M. Zenzes, P. Wang, et al. (1991), "The effect of crypreservation on the development of S- and G2-phase mouse embryos", *J. In vitro Fert. Embryo. Transf.*, **8**, pp.89-95, DOI: 10.1007/BF01138661.

[30] M. Takagi, I. Sakonju, T. Suzuki (1996), "Effects of crypreservation of DNA synthesis in the inner cell mass of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants", *J. Vet. Med. Sci.*, **58**, pp.1237-1238, DOI: 10.1292/jvms.58.12_1237.