

NGUYỄN THÀNH TÂM

LỚP NCS 2012-2016

CHUYÊN ĐỀ MÔN: NỘI TIẾT TỔ ĐỘNG VẬT THỦY SẢN

GIẢNG VIÊN: PGS. TS. NGUYỄN TƯỜNG ANH

**CƠ CHẾ TIẾT HORMON KÍCH DỤC TỔ TRONG CÁ DA TRƠN (*Clarias Sp.*)
THÔNG QUA SỰ TÁC ĐỘNG CỦA TIA LASER ĐẾN HUYỆT SINH SẢN**

Tóm tắt

Hiệu quả của việc chiếu tia laser để kích thích sự chín của tuyến sinh dục và sự sinh sản đã được biết đến, nhưng cơ chế của việc phóng thích kích dục tố thì cho đến nay vẫn chưa được biết đến. Mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi là đánh giá sự phóng thích hormon kích dục tố thông trong cá da trơn (*Clarias sp.*) sau khi cá được chiếu tia laser lên huyết sinh sản. Cá thí nghiệm gồm có 54 con cá đực và 54 con cá cái khoảng 8 – 9 tháng tuổi, tất cả chúng đều là thế hệ lai F1 giữa cá cái ở Sangkuriang với cá đực ở Paiton. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên ở 6 nghiệm thức với 9 lần lặp lại.

Chúng tôi đã kiểm tra nồng độ hormon kích dục tố (GtH-I và GtH-II) ở các giai đoạn: trước khi sinh sản, trong quá trình sinh sản và sau khi sinh sản của nhóm cá được chiếu tia laser. Sau đó, chúng được so sánh đánh giá với nhóm cá không được chiếu tia laser (nhóm đối chứng). Các mẫu máu đã được thu sau khi chiếu tia laser 6 giờ. Nồng độ hormon được kiểm tra bằng Test Kit Elisa. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc chiếu tia laser để làm tăng hormon kích dục tố trước khi sinh sản, trong khi sinh sản và sau khi sinh sản đều có ý nghĩa thống kê. Thông qua kết quả này cho thấy việc chiếu tia laser lên huyết sinh sản có thể kích thích sự phóng thích hormon kích dục tố, điều này ảnh hưởng hưởng đến sự thúc đẩy quá trình chín của tuyến sinh dục và sự sinh sản.

Từ khóa: Sự chiếu tia laser, cá da trơn (*Clarias sp.*), huyết sinh sản, hormon kích dục tố.

I. GIỚI THIỆU

Những yếu tố môi trường như chu kỳ sáng, nhiệt độ nước là những nhân tố khởi xướng trong quá trình phát triển của noãn bào. Trong sự phản ứng lại thì vùng dưới đồi thị giác phóng thích hormon kích dục tố (GnRH), điều khiển tuyến yên phóng thích hormon kích dục tố (GtH-I và GtH-II). Trong suốt mùa sinh sản, hormon kích dục tố

GtH-II tăng đột ngột trong huyết thanh [1,2]. GtH-I tham gia vào quá trình hình thành noãn hoàn và GtH-II giữ vai trò trong quá trình chín và rụng trứng [3-5]. Sự phát triển của tuyến sinh dục và sự sinh sản thì được điều khiển thông qua sự điều khiển của tuyến sinh dục, tuyến yên, vùng dưới đồi thị giác và gan [6, 7].

Những hormon ngoại sinh khác nhau được sử dụng để kích thích sự sinh sản như tiêm Ovaprim®. Đã có nhiều nỗ lực để nâng cao nồng độ hormon kích dục tố như kích thích sự phát triển của trứng và sự sinh sản [8]. Kỹ thuật kích thích bằng tia laser là một phương pháp kích thích sinh sản sinh học, đây là một phương pháp tiếp cận mới và được sử dụng trong kích thích sự chín của tuyến sinh dục và sự sinh sản trên cá rô phi [9].

Tia laser là những sóng điện từ, chúng có thể gây ra sự ức chế và sự kích thích sinh học trong các mô sinh học [10]. Việc xử lý ở mức độ tia laser thấp có thể gây ra sự kích thích sinh học như sự thay đổi thành phần màng tế bào và sự thẩm thấu qua màng của ion Na, K, Ca. Từ đó, hoạt động của màng tế bào tăng lên như: hoạt động của enzym, sự phục hồi thần kinh, thần kinh ngoại biên hay thần kinh trung ương và có thể kích thích những hormon sinh sản [11-13]. Ảnh hưởng của sự chiếu tia laser là một sự kích thích sinh học điện từ. Nếu chiếu tia laser vào mô nó sẽ kích thích tế bào và các sản phẩm có tín hiệu điện. Khi chiếu tia laser (He-Ne) từ 4-5 mV lên vùng da và xuyên qua lớp biểu bì, hạ bì và đi sâu vào để gây ra sự kích thích [14].

Trong những nghiên cứu trước đó [9, 15], chúng tôi đã điều khiển để xác định vị trí của huyết sinh sản và chu kỳ sinh sản của cá rô phi dòng GIFT trong lần sinh sản đầu tiên của chúng. Cho cá tiếp xúc với tia laser trong 6 giây ở huyết sinh sản, vị trí tiếp xúc tối ưu là 2/6 cơ bụng để thúc đẩy sự chín của tuyến sinh dục, cụ thể là chuyển sang giai đoạn IV hay kích thích cá đến giai đoạn sẵn sàng sinh sản. Với kỹ thuật này thì cá rô phi có thể sinh sản 3 lần trong 30 ngày, trong điều kiện môi trường tự nhiên thì cá rô phi chỉ sinh sản 1 lần trong 30 ngày [16].

Trong nghiên cứu về cá da trơn (*Clarias* sp.), tuyến sinh dục của cá vẫn ở giai đoạn 1 trong 10 tuần ở nhóm đối chứng, với giai đoạn này thì cá không sẵn sàng tham gia sinh sản được, trong khi đó, nhóm cá được chiếu tia laser 15 phút ở vị trí 2/3 cơ bụng thì tất cả tuyến sinh dục đều chuyển sang giai đoạn IV sau 15 ngày xử lý [17]. Như vậy, việc xử lý tia laser trên cá rô phi hay cá da trơn đều mang lại hiệu quả tương tự trong sự chín của tuyến sinh dục. Việc tiếp xúc tia laser có thể cải thiện hiệu suất hormon và đây là một vấn đề quan trọng trong hệ thống sinh sản.

Tiếp theo đó, ảnh hưởng của việc tiếp xúc tia laser lên mô sẽ làm tăng GnRH phóng thích bởi vùng dưới đồi thị giác. GnRH sẽ kích thích thùy trước tuyến yên để tiết ra GtH-I và GtH-II. Những sản phẩm kích dục tố sẽ tác động lên những tế bào nội tiết trong tuyến sinh dục để sản sinh ra testosterone [18]. Testosterone sẽ đi vào các lớp tế

bào granulosa và được chuyển đổi thành 17- β -estradiol với sự xúc tác của enzym aromatase [19]. 17- β -estradiol giữ vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp protein tiền chất cho trứng xảy ra trong gan. Thêm vào đó, 17- β -estradiol trong máu, cung cấp thông tin phản hồi để vùng dưới đồi thị giác sản sinh ra GnRH, chúng kích thích tuyến yên phóng thích ra kích dục tố. Việc điều khiển hormon này tiếp tục diễn ra trong suốt quá trình sinh tổng hợp protein tiền chất cho trứng [18-20].

Cơ chế của việc phóng thích hormon GtH-I và GtH-II ở cá da trơn (*Clarias* sp.) sau khi xử lý với tia laser vẫn chưa được hiểu rõ, trong những kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy được việc sử dụng tia laser chiếu lên huyết sinh sản nhằm phóng thích GtH-I và GtH-II với sự kiểm soát quá trình chín của tuyến sinh dục và sự sinh sản trên cá da trơn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện từ tháng 1 đến tháng 3 năm 2012 tại đơn vị quản lý nuôi trồng thủy sản nước ngọt ở Kepanjen Malang. Những mẫu máu của cá da trơn được thu tại phòng thí nghiệm hóa hữu cơ của đại học Brawijaya để phân tích mức độ hormon bằng phương pháp Elisa.

Những vật liệu và cá thí nghiệm

Gồm có 54 con cá cái có trọng lượng 1.000 – 1.700g và 54 con cá đực cỡ 1.150 – 1.750g, chúng có cùng độ tuổi từ 8-9 tháng tuổi và chúng là thế hệ con lai F1 của đàn cá bố mẹ ở 2 nguồn khác nhau (cá cái ở Sangkuriang và đàn cá đực ở Pation).

Sự chuẩn bị cá bố mẹ

Cá đực và cá cái được chọn đều có tuyến sinh dục chín mùi và chưa tham gia sinh sản lần nào, chúng được giữ riêng trong một cái hồ nhựa khoảng 14 ngày nhằm tránh sự tham gia sinh sản. Trong suốt thời gian nhất giữ cá đực cho ăn với thức ăn thương mại Pokphan 781-3 với 36% đạm được cung cấp bởi CP Prima và mỗi lần cho ăn 5% trọng lượng thân, mỗi ngày cho ăn 2 lần vào buổi sáng và buổi chiều. Cá bố mẹ của nhóm đối chứng và nhóm xử lý tia laser được giữ trong ao 2x2x1m³, mỗi ao 1 cặp.

Sự chiếu tia laser

Thí nghiệm được bố trí một cách hoàn toàn ngẫu nhiên với 6 nghiệm thức và 9 lần lặp lại. Những nghiệm thức đó bao gồm một nghiệm thức đối chứng và một nghiệm thức xử lý bằng tia laser (trước sinh sản, trong quá trình sinh sản và sau khi sinh sản). Tia laser Helium-Neon (He-Ne) 5 mV với bước sóng 632,8 nm. Tia laser được chiếu ở vị trí 2/3 cơ bụng trong 15 phút. Vị trí này được cho là vị trí tối ưu trong những nghiên cứu trước đó [17]. Khoảng 27 cặp cá ở nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức xử lý tia laser.

Những giá trị theo dõi

Hormon kích dục tố (GtH-I và GtH-II) trong huyết thanh của cá da trơn (*Clarias sp.*) sau khi xử lý tia laser ở thời điểm trước sinh sản, trong quá trình sinh sản và sau khi sinh sản. Xác định mức độ hormon bởi Test kit Elisa (Cusabio Biotech Co. Ltd.) với cat. no. CSB-E15790Fh (967) cho GtH-I và cat. no. CSB-E15791Fh cho GtH-II.

Phân tích dữ liệu

Số liệu được xử lý dựa trên phần mềm SPSS 15.0.

III- KẾT QUẢ

Sự miêu tả về kết quả GtH-I

Miêu tả giá trị trung bình của GtH-I của nhóm đối chứng và nhóm được xử lý tia laser được trình bày dựa trên các điều kiện trước khi sinh sản, sinh sản và sau khi sinh sản. Chúng tôi thấy GtH-I tăng dần từ giai đoạn trước khi sinh sản cho đến khi sinh sản, giá trị này tăng cao hơn ở nhóm xử lý tia laser so với nhóm đối chứng. Có một sự khác biệt về giá trị GtH-I của cá sau khi sinh sản, giá trị này giảm xuống ở cả 2 nhóm đối chứng và xử lý tia laser, nhưng ở nhóm đối chứng cao hơn so với nhóm xử lý tia laser (Bảng 1).

Giá trị GtH-I của nhóm cá được xử lý tia laser trong giai đoạn trước khi sinh sản, trong khi sinh sản đều cao hơn so với nhóm đối chứng, tuy nhiên, ở giai đoạn sau khi sinh sản thì giá trị GtH-I của nhóm đối chứng cao hơn nhóm được xử lý (Hình 1).

Sự miêu tả về kết quả GtH-II

GtH-II cũng được xác định ở các giai đoạn trước khi cá sinh sản, trong khi sinh sản và sau khi sinh sản. Giá trị GtH-II tăng dần từ giai đoạn trước khi sinh sản đến khi sinh sản, giá trị trung bình này ở nghiệm thức cá được xử lý tia laser thì cao hơn so với nhóm cá đối chứng. Nhưng sau khi sinh sản thì giá trị GtH-II ở cả hai nhóm đều giảm xuống, tuy nhiên ở nhóm đối chứng vẫn cao hơn so với nhóm được xử lý tia laser (Bảng 2).

Lượng GtH-II ở nhóm cá được xử lý trong giai đoạn trước khi sinh sản và trong khi sinh sản đều cao hơn so với nhóm cá đối chứng. Tuy nhiên, có một sự khác biệt ở giai đoạn sau khi sinh sản đó là giá trị GtH-II ở nhóm đối chứng cao hơn nhóm cá được xử lý tia laser (Hình 2).

IV. THẢO LUẬN

Lượng hormon kích dục tố ở của cá ở giai đoạn trước khi sinh sản và trong khi sinh sản của nhóm cá được xử lý tia laser cao hơn so với nhóm cá đối chứng. Trong khi đó, vào giai đoạn sau khi sinh sản thì lượng hormon này ở nhóm cá xử lý lại thấp hơn so

với nhóm cá đối chứng. Sự tăng hay giảm lượng hormon kích dục tố bị ảnh hưởng bởi GnRH trong vùng dưới đồi thị giác. GnRH chịu sự ảnh hưởng của các nhân tố môi trường thông qua hệ thống thần kinh trung ương. Điều này cho thấy, khi cá tiếp xúc với tia laser ở huyết sinh sản thì mang lại sự kích thích GnRH thông qua con đường thần kinh.

Sự tiếp xúc tia laser He-Ne trong 15 giây ở 5 mW/cm^2 với bước sóng thấp $632,8 \text{ nm}$ lên huyết sinh sản của cá đã phóng thích một năng lượng tương đương $0,375 \text{ J/cm}^2$. Năng lượng này có thể tác động đến sự phóng thích hormon kích dục tố từ vùng dưới đồi thị giác. Điều này có khả năng xảy ra bởi vì tia laser tác động đến sự phóng thích những tín hiệu đến thần kinh trung ương. Tia laser sẽ đi xuyên qua và bắn vào đoạn cuối của thần kinh ngoại biên nằm ở vị trí giữa biểu bì và hạ bì của mô da. Một hướng giải thích xa hơn nữa là, tia laser sẽ chuyển đổi những tín hiệu hóa học và chúng sẽ được tiếp nhận bởi những kênh ion khác nhau, như G-protein thụ thể cùng tiểu đơn vị alpha và VGCC (kênh volt-gate Ca^{2+}), hay thông qua các thụ thể Canxi như thụ thể Canxi cảm giác (CaSR) nằm trong màng tế bào thần kinh. Mối liên hệ của các phối tử đến các thụ thể sẽ gây ra sự phóng thích tín hiệu lần thứ hai, đây là nguyên nhân tạo ra một chuỗi phản ứng và đưa đến sự thay đổi bên trong tế bào.

Những ion Ca^{2+} trong nội bào tăng lên có thể là do ảnh hưởng của CaSR hoặc là sự tràn vào của các ion Ca^{2+} của ngoại bào thông qua VGCC. Những ion Ca^{2+} ngoại bào sẽ hoạt hóa các calcineurin trong mô da [21, 22]. Những tín hiệu điện gây ra bởi sự phân cực của màng tế bào thần kinh và nó truyền từ tế bào này đến tế bào khác trên sợi trục thần kinh, sau đó nó đi vào màng khớp thần kinh trước và khớp thần kinh sau và nó sẽ tác động lên sự phóng thích của những ohaan tử thần kinh tín hiệu trên khớp thần kinh. Bằng cơ chế tương tự thì các tín hiệu điện sẽ dẫn truyền đến não. Các ion Ca^{2+} nội bào và ngoại bào gián tiếp làm thay đổi điện thế của màng và có vai trò quan trọng trong tác động kích thích sự phóng thích GnRH từ vùng dưới đồi thị giác, đây là nơi điều khiển tuyến yên phóng thích GtH-I và GtH-II trong cá Chép, Trê Phi và cá rô Phi [23, 24].

Sự phóng thích của thần kinh tín hiệu như GABA (gamma aminobutyric acid) từ các GABAergic neuron phụ thuộc vào sự phân cực của màng tế bào thần kinh, hoạt động của điện thế, những ion Canxi, CCP, sự khử carbon của glutamate và GAD (glutamic acid decarboxylase). GAD hoạt hóa enzym thúc đẩy vùng dưới đồi thị giác và não tặn của cả hồi và đóng vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp GABA [25]. Việc tổng hợp GABA bắt đầu bởi phản ứng loại carboxyl của phân tử glutamate bởi sự xúc tác của GAD và điều này xảy ra ở đầu cuối của dây thần kinh [26-28]. Trên cá có 2 loại GAD là: GAD-65 và GAD-67, GAD-65 có nhiều tín hiệu dẫn truyền do đó nó điều khiển vòng tuần hoàn của steroid giới tính và nó dùng để hiệu chỉnh sự tổng hợp và kích thích thần kinh tín hiệu. Những nghiên cứu trước đây của chúng tôi cho thấy sau 6

giờ thì lượng GAD-65 sẽ được sản sinh ra nhiều hơn. Hoạt động của GAD-65 nhằm xác định sự tổng hợp GABA từ GABAergic neurons [28]. Sau đó sự phóng thích GABA sẽ được phát tín hiệu trực tiếp thông qua khớp thần kinh liên lạc giữa thần kinh GABAergic cuối và GnRH neurons, các GABAergic neuron trực tiếp được điều khiển bởi thụ thể trước tuyến yên [26-29], và thế nó có ảnh hưởng kích thích lên sự phóng thích GnRH [26,28,30, 31].

Những kết quả đã chỉ ra rằng, khi tiếp xúc với tia laser ở thời điểm trước khi sinh sản 6 giờ thì hàm lượng hormon kích dục tố trong huyết thanh của cá tăng lên so với nhóm đối chứng. Bởi vì tia laser đã tác động lên huyết sinh sản của cá da trơn (*Clarias sp.*) và kích thích GABAergic neurons để tổng hợp GABA, nó sẽ truyền thông tin thông qua khớp thần kinh liên lạc giữa GABAergic của đoạn thần kinh cuối với neurons GnRH [32], GABA sẽ được phóng thích bởi GABAergic neurons và nó kích thích vùng dưới đồi thị giác để kích thích GnRH, GnRH sẽ kích thích neurons tuyến yên để phóng thích hormon kích dục tố, hormon kích dục tố sẽ được máu vận chuyển xuôi dòng đến tuyến sinh dục (buồng trứng) rồi sau đó nó tác động đến cả buồng trứng. GnRH sẽ kích thích sự phát triển của nang trứng thông qua sự bài tiết của 17β -estradiol trong buồng trứng và nó có vai trò quan trọng trong việc sinh tổng hợp tiền chất của protein trứng tại gan. Lượng 17β -estradiol tương ứng với sự phát triển của trứng [19,33]. Tương tự như vậy, GnRH đòi hỏi phải có trong noãn bào chín và kích thích sự rụng trứng và sự sinh sản [3,5]. Sự lặp lại quá trình này khi ở đó có sự khử cực của màng tế bào thần kinh [25]. Kết quả này cũng phù hợp với sự khám phá của Trudeau [28] rằng, sự kích thích GABA có thể ảnh hưởng đến vùng dưới đồi thị giác và làm giảm hoạt động tổng hợp Dopamin.

Đối với giai đoạn cá sau khi sinh sản thì hormon kích dục tố của cá ở nhóm đối chứng cao hơn nhóm được xử lý tia laser. Điều này do hormon kích dục tố ở một vài nhóm đối chứng chưa đầy đủ vì có một vài con chưa sinh sản. Trong khi ở nhóm đối chứng thì tất cả cá đã sinh sản và lượng hormon kích dục tố trong huyết thanh đã xuống thấp. Trong tự nhiên, nhiều nhân tố sinh lý ảnh hưởng đến sự phóng thích GnRH ở vùng dưới đồi thị giác như sự chiếu sáng, tình trạng giới tính, stress và sự chín của tuyến sinh dục. Bên cạnh đó còn có nhiều chất trung gian điều chỉnh sự tổng hợp và phóng thích GnRH như glutamate và GABA [34], Dopamin (DA) [35], serotonin [36, 37] và neuropeptide Y [38].

Nghiên cứu này đã cho thấy GABA được phóng thích từ GABAergic neurons, điều này có thể kích thích vùng dưới đồi thị giác phóng thích ra hormon kích dục tố, sau đó nó kích thích tuyến yên phóng thích GnRH-I và GnRH-II dưới sự tác động của tia laser. Điều này xảy ra bởi vì GABAergic neurons điều khiển sự vận chuyển trong não suốt 24 giờ [39], và cũng như vậy mà hormon kích dục tố của cá (giai đoạn sau khi sinh sản) ở nghiệm thức đối chứng cao hơn so với nghiệm thức xử lý tia laser. Nồng độ

hormon kích dục tố trong nhóm đối chứng và nhóm xử lý đều giảm, nhưng sự giảm diễn ra nhanh ở nhóm xử lý. Một lý do khác có thể là GABA phóng thích từ GABAergic neurons đã không đủ để kích thích vùng dưới đồi thị giác phóng thích ra hormon kích dục tố.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chỉ ra rằng, khi cá da trơn (*Clarias* sp.) tiếp xúc với tia laser thông qua sự chiếu tia laser lên huyết sinh sản trong mô da đã làm cho hàm lượng hormon kích dục tố tăng lên trong các giai đoạn trước sinh sản, trong khi sinh sản và sau khi sinh sản. Khi tiếp xúc với tia laser ở huyết sinh sản trong mô da có thể thúc đẩy nhanh sự chín của tuyến sinh dục để kích thích sự sinh sản.

Sự chiếu tia laser lên huyết sinh sản trong mô da của cá da trơn (*Clarias* sp.) có thể ứng dụng để đẩy nhanh tốc độ sản xuất của những trại giống, và có thể làm tài liệu tham khảo cho những nghiên cứu tiếp theo như tính di truyền không bình thường ở thế hệ con.

TÀI LIỆU THAM KHẢO