

BỔ SUNG GnRH VÀO QUI TRÌNH GÂY SIÊU BÀI NOÃN Ở BÒ CÁI SINH SẢN NHẪM NÂNG CAO HIỆU QUẢ TẠO PHÔI

Lê Văn Ty^{1*}, Huỳnh Xuân Phú², Hà Thanh Tùng², Lê Thị Châu²

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *levanty2004@yahoo.com

²Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

TÓM TẮT: GnRH được biết như một hoocmon và được sử dụng phổ biến để gây động dục đồng loạt trên bò, cho phép ấn định thời điểm dẫn tinh mà không cần theo dõi phát hiện bò động dục. Kết hợp qui trình gây siêu bài noãn với qui trình gây động dục với GnRH một mặt tạo ra các sóng phát triển các nang nhỏ vào thời điểm bắt đầu gây rụng trứng, mặt khác nâng mức đồng pha giữa bò cho phôi và bò nhận phôi cũng như mức động dục đồng pha giữa các bò cho phôi với nhau. Thí nghiệm gây siêu bài noãn được thử nghiệm trên hai lô bò cái sinh sản HF cao sản: lô đối chứng (10 bò) được xử lý theo qui trình gây siêu bài noãn kinh điển. Trong khi đó, đối với các bò thí nghiệm (10 bò), mũi tiêm GnRH, khởi đầu sóng nang mới, được áp dụng vào ngày thứ 7 kể từ mũi tiêm PGF2 α và đặt viên cấy âm đạo CIDR (tính là ngày 0). Chiều ngày thứ 8, bò được bắt đầu xử lý với FSH (2 lần/ ngày) liên tục đến sáng ngày thứ 12. Mũi PGF2 α thứ nhất được tiêm vào chiều ngày thứ 11 (lần tiêm FSH thứ 7), mũi PG thứ 2 được tiêm sáng ngày thứ 12 đồng thời tháo bỏ viên đặt, một mũi GnRH bổ sung được tiêm 48 giờ sau mũi PGF2 α thứ nhất. Bò được thu phôi bằng phương pháp không mổ 7 ngày sau khi dẫn tinh lần thứ nhất. Kết quả cho thấy bổ sung GnRH làm gia tăng rụng trứng tổng số (140 so với 107) và số rụng trứng trung bình (14,0 \pm 4,6 so với 10,7 \pm 3,2, P<0,05), kéo theo số phôi nang (5,1 \pm 1,0 so với 3,1 \pm 0,4), số phôi có thể cấy truyền được (6,8 \pm 1,8 so với 4,3 \pm 2,0, P<0,01) gia tăng có ý nghĩa. Ngoài ra các bò có bổ sung GnRH đều động dục trong khoảng 58-64 giờ sau mũi tiêm PGF2 α (10/10) trong khi qui trình không bổ sung GnRH chỉ có 6/10 bò cái động dục trong khoảng thời gian 50-98 giờ. Vì vậy, bổ sung GnRH một mặt nâng cao hiệu quả gây siêu bài noãn, mặt khác nâng cao mức đồng pha giữa các bò cho phôi.

Từ khóa: GnRH, gây siêu bài noãn, gây động dục đồng pha, bò sữa HF.

MỞ ĐẦU

Mặc dù gây siêu bài noãn để tạo phôi bò là phương pháp kém hiệu quả so với các phương pháp tiêm năng như thụ tinh ống nghiệm, nhân bản từ tế bào phôi hoặc nhân bản từ tế bào soma, công nghệ này vẫn được áp dụng phổ biến trong thực tế để nâng cao năng suất chất lượng đàn bò sữa trên thế giới. Điều này được chứng minh là đã có tới hàng ngàn ca cấy phôi dùng phôi bò thụ tinh *in vitro* và tốc độ gia tăng cấy phôi kiểu này rất cao mỗi năm, tuy nhiên, cấy phôi thụ tinh *in vitro* vẫn chỉ chiếm một tỷ lệ khá khiêm tốn. Cấy phôi bò từ phôi sản xuất *in vivo* có một loạt các ưu thế: thứ nhất tạo phôi *in vivo* không yêu cầu đầu tư lớn, chỉ cần mua hoocmon, một bộ thu, cấy phôi, và kính hiển vi lập thể, điều có thể làm được đối với các doanh nghiệp vừa và nhỏ; thứ hai, phôi tạo *in vivo* có sức sống cao, nếu cấy phôi tươi cho bò đồng pha, kết quả có thể đạt tương đương hoặc cao hơn so với thụ tinh nhân tạo [2]; phôi *in vivo* có tỷ lệ sống cao và ổn định sau quá trình đông lạnh và giải đông,

vì vậy vẫn là loại phôi đứng đầu trong danh sách thương mại và trao đổi con giống giữa các địa phương và quốc tế; cuối cùng tạo phôi *in vivo* có thể thực hiện xen kẽ giữa các lứa đẻ của bò cao sản tạo ra thời gian nghỉ hữu ích cho các bò này.

Gây siêu bài noãn trên bò cái sinh sản (bò sữa, bò thịt) đạt đến mức độ hoàn thiện nhờ các tiến bộ mới trong công nghệ sản xuất hoocmon cũng như sự ra đời các loại viên cấy tại, viên đặt âm đạo, viên trộn với thức ăn. Tuy nhiên kết quả gây siêu bài noãn phụ thuộc tỷ lệ thuận vào số nang trứng có thể huy động được tại thời điểm xử lý hoocmon. Đây là lý do tại sao phải làm gia tăng, làm phát triển đồng pha các nang, huy động vào thời điểm kích thích gây siêu bài noãn và gây rụng trứng hiệu quả các nang này.

GnRH được cho là tác nhân kích thích sự khởi nguồn một sóng nang mới [3], một trong những yếu tố kích thích phát triển nang trứng giai đoạn nang chưa nhậy cảm với các

gonadotropin. GnRH là một loại peptid ngắn gồm 8 axit amin, được hình thành trong tuyến dưới đồi thị (*hypothalamus*) kích thích tổng hợp và bài tiết đồng thời hai loại hormone liên quan trực tiếp đến phát triển nang trứng và rụng trứng. Do được hóa tổng hợp, loại hợp chất này hiện nay được cải biên để nâng cao hoạt tính sinh học và bền trong điều kiện bảo quản, được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi đặc biệt dùng kết hợp hoặc thay thế PGF2 α trong gây động dục đồng loạt cho bò. Sử dụng qui trình kết hợp hai mũi tiêm GnRH và một mũi tiêm PGF2 α , có thể xác định chính xác thời điểm thụ tinh mà không cần theo dõi phát hiện động dục ở bò, người ta đặt tên cho qui trình này là FTAI (*fix time artificial insemination*) vẫn cho hiệu quả đậu thai tương đương với thụ tinh cố theo dõi phát hiện bò động dục. Hệ quả của FTAI chính là FTET (*fix time embryo transplantation*) tức là qui trình sản xuất và cấy phôi được chủ động thời điểm thu và cấy phôi theo một lịch trình đặt sẵn.

Từ các trình bày ở trên, một lịch trình gây siêu bài noãn ở bò cái sinh sản được thiết kế, lồng ghép với qui trình gây động dục có thời điểm động dục và rụng trứng xác định với GnRH nhằm nâng cao số rụng trứng và độ đồng pha giữa bò cho và bò nhận được thực hiện.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Động vật

Bò được lựa chọn cho thí nghiệm là những bò cao sản, đủ đáp ứng về điều kiện thú y phòng dịch, có năng suất cho sữa từ 6.000 kg/chu kỳ trở lên, đã đẻ 1-2 lứa, có hệ sinh dục và buồng trứng bình thường khi khám qua trực tràng. Điểm chú ý là các bò này có cổ tử cung và sừng tử cung thích ứng với bộ thu phôi 0,8 cm của IMV. Lựa chọn này quan trọng vì có những bò cho phôi dù đạt các tiêu chí về năng suất nhưng không thích ứng với bộ thu phôi thì dù có rụng trứng tốt, nhưng không thu được phôi.

Bò thí nghiệm được nuôi theo tiêu chuẩn bò cao sản tại Công ty sữa Đà Lạt (Lâm Đồng). Bò đảm bảo được cung cấp đầy đủ thức ăn, nước

uống, các khoáng chất và chăm sóc nuôi dưỡng tốt nhất.

Hóa chất

PGF2 α : dùng thuốc có tên thương mại là Prosolvin, liều dùng 2ml (15 mg of Luprostiol/lần/bò).

GnRH: dùng thuốc có tên thương mại là Buserelin, liều dùng 200 μ g/lần/bò.

pFSH: dùng loại FSH của Nhật Bản (hộp 5 ống: 50AU) áp dụng cho 1 bò một liệu trình (ngày thứ nhất: 1 ống, 1 ống, ngày thứ 2: 0,8 ống, 0,8 ống, ngày thứ 3: 0,5 ống, 0,5 ống, ngày thứ 4: 0,1 ống, 0,1 ống tương đương: 10, 10, 8, 8, 5, 5, 1, 1 AU).

CIDR: viên đặt âm đạo chứa progesterone (P4), được đặt từ ngày 0 đến ngày 12.

Thời điểm tiêm sáng/chiều phải như nhau đối với các mũi tiêm đặc biệt đối với FSH, viên cấy âm đạo lấy ra 36 h sau mũi tiêm PGF2 α (ngày thứ 11)

Phương pháp

20 bò đạt tiêu chuẩn làm bò cho phôi được phân ngẫu nhiên thành 2 nhóm: nhóm đối chứng được xử lý theo qui trình kinh điển của FAO (1991) [7]; nhóm thí nghiệm, mũi tiêm GnRH (200 μ g) được tiêm vào ngày thứ 7 và mũi GnRH thứ hai được tiêm 36 giờ sau khi tiêm mũi PGF2 α thứ nhất (bảng 1). Ngày thứ 4 sau khi dẫn tinh, đàn bò cho phôi được khám kiểm tra buồng trứng, đếm số thể vàng để đánh giá kết quả rụng trứng. Kết quả khám đếm thể vàng ở các bò có buồng trứng rụng >10 trứng được kiểm tra độc lập bởi 02 kỹ thuật viên có kinh nghiệm. Thu phôi bò được tiến hành vào 7 ngày sau khi dẫn tinh bằng bộ thu phôi ba dòng của IMV (Pháp), theo phương pháp đã mô tả [8]. Kết quả rụng trứng và thu phôi, phân loại phôi của hai lô bò thí nghiệm và đối chứng được so sánh.

Mặc dù có thể dẫn tinh không cần theo dõi phát hiện bò động dục đối với bò cho có bổ sung GnRH vào chiều ngày 13 và sáng ngày 14, tuy nhiên, để có kết quả so sánh, bố trí theo dõi phát hiện và ghi thời điểm động dục của mỗi bò lô thí nghiệm và lô đối chứng là cần thiết.

Bảng 1. Thời gian xử lý hoocmon đối với bò cho phôi, bò nhận phôi

Ngày xử lý	Gây siêu bài noãn (FAO, 1991)		Gây siêu bài noãn (có bổ sung GnRH)		Bò nhận
	Buổi sáng	Buổi chiều	Buổi sáng	Buổi chiều	Sáng, Chiều
0	Bò cho động dục		Đặt CIDR (P4) +PGF2 α		Kiểm tra chu kỳ
4					GnRH
7			GnRH		
8		FSH		FSH	
9	FSH	FSH	FSH	FSH	
10	FSH	FSH	FSH	FSH	PGF2 α (chiều)
11	FSH	FSH +PGF2 α	FSH	FSH +PGF2 α	
12	FSH+PGF2 α		FSH, PGF2 α -Lấy viên đặt ra		
13		Theo dõi động dục, dẫn tinh	GnRH	Dẫn tinh HF	Ghi nhận thời điểm động dục (GnRH)
14	Theo dõi động dục, dẫn tinh		Dẫn tinh HF		
20	Thu phôi		Thu phôi		Cấy phôi,
	Tiêm PGF2, phá thể vàng và tránh hiện tượng chửa đa thai				
27-34	Những bò nhận không đậu thai động dục lại				
75+	Khám thai bò nhận ghi nhận bò đậu thai				
105+	Khám thai lại để khẳng định kết quả đậu thai				

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nghiên cứu được tổng hợp ở bảng 2, rụng trứng tổng số, đánh giá trên cơ sở đếm thể vàng có trên bề mặt buồng trứng các bò sau khi thu phôi (140 so với 107), số rụng trứng trung bình (14,0 \pm 4,6 so với 10,7 \pm 3,2) đều cao hơn trường hợp bò nhận các liều GnRH bổ sung, giá trị $P < 0,05$ mặc dù mức dao động cá thể giữa các bò cho phôi rất lớn. Tương tự, số trứng/phôi thu được cũng khá dao động (8,1 \pm 2,2 so với 6,3 \pm 2,7), số phôi nang trong trường hợp có bổ sung GnRH cao hơn đáng kể ($P < 0,01$) so với qui trình truyền thống (5,1 \pm 1,0 so với 3,1 \pm 0,4), chính điều này làm số phôi có thể cấy truyền được tăng có ý nghĩa khi so sánh hai trường hợp (6,8 \pm 1,8 so với 4,3 \pm 2,0). Bổ sung GnRH làm cho bò cho phôi động dục tập trung hơn (từ 58-64 giờ so với 50-98 giờ sau khi tiêm PGF2 α), độ lệch pha tối thiểu này cùng với mức gia tăng số phôi nang có tuổi phát triển gần như nhau cho thấy các nang được kích thích có cùng độ chín và rụng trứng gần như đồng thời.

Ở bò nói chung, bò HF nói riêng các nang nhỏ có đường kính 3-6 mm xuất hiện vào thời điểm bò động dục và rụng trứng. Đây là những nang nhạy cảm với gonadotropin xuất hiện một cách đồng thời, khởi đầu một sóng phát triển nang mới. Những nang có kích thước nhỏ hơn chưa có các thụ quan với FSH, không được huy động vào quá trình này. GnRH được tiêm vào giai đoạn bắt đầu xuất hiện sóng nang với tác dụng kép, kích thích bài tiết cả FSH cả LH nội sinh; trong khi FSH làm gia tăng kích thước các nang thì LH có tác dụng làm phát triển các thụ quan của nang trứng đối với FSH [6]. Tác dụng kép này làm gia tăng số lượng và chất lượng các nang trứng được huy động cho sóng phát triển nang mới. Như vậy, GnRH góp phần cùng với các yếu tố nội tiết, tự tiết và cận tiết khác làm đồng pha xuất hiện và kéo dài sóng nang thứ nhất của chu kỳ. Sự kéo dài sóng nang về mặt thời gian cho phép các nang mới lớn đủ kích thước và sở hữu thụ quan với FSH, bổ sung vào nguồn huy động. Duy trì trong 4 ngày mức FSH

(gonadotropin nói chung) ngoại lai cao làm cho tất cả các nang nhạy cảm gonadotropin có cơ hội phát triển đến giai đoạn cận rụng trứng mà không bị tính độc tôn nang chi phối. Mũi PGF2 α được tiêm vào cuối kỳ kích thích FSH làm thoái hóa thể vàng, cùng với sự lấy đi viên đặt P4 (trong trường hợp có đặt viên âm đạo)

làm giảm đột ngột mức progesterone trong máu, gây phản ứng động dục và rụng trứng. Số rụng trứng tỷ lệ thuận với số nang trứng được huy động vào sóng phát triển nang, điều này giải thích tại sao tiêm GnRH trước khi xử lý kích thích siêu bài noãn làm gia tăng rụng trứng tổng số và rụng trứng trung bình.

Bảng 2. Kết quả gây siêu bài noãn không và có bổ sung GnRH

STT	Các thông số	Gây siêu bài noãn (FAO, 1991), n=10	Gây siêu bài noãn (GnRH), n=10	P
1	Tỷ lệ bò có rụng trứng	100%	100%	
2	Rụng trứng tổng số	107	140	
3	Số thể vàng	10,7 \pm 3,2	14,0 \pm 4,6	<0,05
4	Số trứng/phôi	6,3 \pm 2,7	8,1 \pm 2,2	
5	Số phôi có thể cấy truyền	4,3 \pm 2,0	6,8 \pm 1,8	<0,05
6	Số phôi nang	3,1 \pm 0,4	5,1 \pm 1,0	<0,01
7	Tỷ lệ phôi có thể cấy chuyển (%)	67,6 \pm 16,1	83,4 \pm 21,3	<0,05
8	Khoảng cách từ PGF2 α (11,PM) đến thời điểm bỏ cuối cùng động dục (giờ)	50-98	58-64	

Nếu mũi GnRH đầu tiên có tác động làm gia tăng số nang được huy động vào phản ứng gây siêu bài noãn thì mũi GnRH thứ 2 (48 giờ sau mũi PGF2 α thứ nhất) có tác động kích thích sự đồng pha của các nang cận rụng trứng [4], sự gia tăng số lượng phôi nang chứng minh cho giả thiết này. Tác dụng của GnRH cũng làm đồng pha sự động dục của các bò cho (và bò nhận): trong nghiên cứu này ở 10 bò thí nghiệm, tiêm GnRH 48 giờ sau PGF2 α , các bò động dục từ 58-64, lệch nhau cao nhất là 6 giờ. Điều này cho phép làm FTAI (dẫn tinh vào thời điểm xác định) mà không cần theo dõi phát hiện động dục. Hệ quả của điều này là có thể làm FTET, cấy phôi vào thời điểm xác định trước mà không cần theo dõi phát hiện động dục nếu xử lý với GnRH cả ở bò cho và bò nhận.

Như vậy lồng ghép kỹ thuật gây siêu bài noãn truyền thống và kỹ thuật gây động dục đồng pha có xử lý với GnRH, thí nghiệm cải thiện số rụng trứng tổng số, làm gia tăng số phôi nang, qua đó nâng cao số lượng phôi có thể cấy chuyển, cải thiện hiệu quả của công nghệ cấy phôi bò nói chung. Kết quả này tương tự với các công bố gần đây của các tác giả khác [1, 6].

Dùng GnRH như yếu tố gây động dục đồng pha ở bò nhằm dẫn tinh vào thời điểm xác định (FTAI) không những giải quyết vấn đề dẫn tinh không cần theo dõi phát hiện động dục ở bò [3, 5], mà còn mở rộng làm giảm nhẹ công sức khi áp dụng FTET (cấy truyền phôi vào thời điểm xác định) mà không cần theo dõi phát hiện động dục ở cả bò cho và bò nhận phôi [2].

KẾT LUẬN

Bổ sung GnRH vào qui trình gây siêu bài noãn cải thiện số phôi nang, số phôi có thể cấy truyền được ở bò cho phôi.

Bổ sung GnRH vào qui trình gây siêu bài noãn làm ra tăng mức động dục đồng pha ở bò các bò cho (và bò nhận) phôi.

Từ kết quả này có thể mở rộng qui mô thí nghiệm để đưa ra qui trình FTET, thu cấy phôi vào thời điểm xác định trước.

Lời cảm ơn: Công trình này được tài trợ kinh phí của đề tài “Ứng dụng công nghệ cấy chuyển phôi bò sữa cao sản tại Tây Nguyên”, Chương trình Tây Nguyên 3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baruselli P. S., Marques M. O., Carvalho N. A. T., Berber R. C. A., Valentin R., Carvalho Filho A. F., Costa Neto, 2003. Follicular dynamics and pregnancy rate in embryo recipient treated with "Ovsynch" protocol for fix-time embryo transfer. *Braz J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 40: 96-106.
2. Baruselli P. S., Ferreira R. M., Sales J. N. S., Gimenes L. U., Sá Filho M. F., Martins C. M., Rodrigues C. M., Bó G. A., 2011. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*, 76: 1583-1593.
3. Bó G. A., Baruselli P. S., Martinez M. F., 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci.*, 78: 307-326.
4. Kohram H., Twagiramungu H., Bousquet D., Durocher J., Guilbault L. A., 1998. Ovarian superstimulation after follicular synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle. *Theriogenology*, 49: 1175-1186.
5. Martins C. M., Rodrigues C. A., Vieira L. M., Mapletoft R. J., Bó G. A., Sá Filho M. F., Baruselli P. S., 2012. The effect of timing of the induction of ovulation on embryo production in superstimulated lactating Holstein cows undergoing fix-time artificial insemination. *Theriogenology*, 78: 974-980.
6. Sartori R., Fricke P. M., Ferreira J. C. P., Ginther O. J., Wiltbank M. C., 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicle. *Biol Reprod*, 65: 1401-1409.
7. Traing Program for embryo transplantation, FAO, 1991.
8. Uoc N. T., Long D. D., Nguyen B. X., 1992. Superovulation response in Holstein, Holstein-Zebu and yellow cattle and Swamp buffaloes under tropical conditions. 12th International Congress on Animal Reproduction. The Netherlands, the Hague, 2010-2012.

SUPPLEMENTATION OF GnRH TO SUPEROVULATION IN DAIRY COW IMPROVING THE RESULTS OF EMBRYO PRODUCTION

Le Van Ty¹, Huynh Xuan Phu², Ha Thanh Tung², Le Thi Chau²

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Tay Nguyen Institute for Scientific Research

SUMMARY

Twenty high productive lactating Holstein Friesian selected from the synchronized in estrus treated with PGF2 α cows in Dalatmilk Farm (Da Lat, Lam Dong) were randomly divided into 2 groups for treatment of superovulation. The control group received 50AU pFSH i.m in declining dose for 5 days (from Day 8 PM to Day 12 PM, 8 injections, Day 0 was the day of estrus) with the first PGF2 α at Day 11 PM. The Exp. group received at day 0 the device P4 (CIDR) for 12 days and the same dose of FSH, supplemented with two injections GnRH at day 7 and 48 hrs after the first PGF2 α injections (day 11 PM). The P4 device removal was done by the last FSH injection. Embryo collection was done by 7th day after the day of the first artificial insemination. The mean number of corpora lutea palpated (14.0 \pm 4.6 vs 10.7 \pm 3.2, P<0.05), the mean number of blastocytes (5.1 \pm 0.4 vs 3.1 \pm 1.0; P<0.01) and transferable embryos (6.8 \pm 1.8 vs 4.3 \pm 2.0; P<0.05) were higher in the group supplemented with GnRH. The interval of the first cow beginning estrus to the last one in the GnRH supplemented group was shorter compared with control group (58-64 hrs vs 50-98 hrs). So supplementation of GnRH not only improved the number of transferable embryos but also increased level of synchronization of donors

Keywords: GnRH, superovulation, synchronization in oestrus, dairy HFcow.

Ngày nhận bài: 18-7-2013