

ANDRZEJ MAX

Próba oceny płodności krów na podstawie poziomu hormonów jajnikowych

Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR,
ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Summary

A trial to evaluate fertility in cows on the level of ovarian hormones

The level of progesterone and 17 β -estradiol was determined in plasma of cows at 0, 3 or 4, 7 and 21 day of oestrus. It was found that 6,3% of cows in a phase of active yellow body was declared to inseminate. No differences in the level of progesterone at day 0, 3, 4 and 7 between groups of pregnant and non-pregnant cows were found. At days 7 of oestrus an extraction of the yellow body was not fully developed because the level of progesterone increased twice in pregnant cows between 7 and 21 day. Out of 7 cows revealing at day 21 a high level of progesterone and sterile in 3 dead of embryos can be supposed.

The results of the determination of 17 β -estradiol varied both for individual days oestrus and for the presence of various ovarian structures. The determinations of the level of this hormone appeared to be unuseful in individual evaluation of causes of sterility. In the contrary, for this reason is valuable determination of the level of plasma progesterone.

Wraz z wprowadzeniem metod radioimmunologicznych i immunoenzymatycznych rozwinęły się badania poziomu hormonów w płynach ustrojowych, w tym oznaczenia steroidowych hormonów jajnikowych we krwi i w mleku.

Badanie stężenia progesteronu i estradiolu pozwala na analizę cyklu rujowego i umożliwia wykrycie zarówno pewnych nietypowości w jego przebiegu, jak też wskazuje na błędy w organizacji rozrodu, a ponadto jest przydatne we wczesnej diagnostyce ciąży. Erb i wsp. (15), oznaczając zawartość hormonów w osoczu krwi w dniach 0, 4 i 7, stwierdzili występowanie w grupie krów nieplodnych nieprawidłowości w przebiegu cyklu rujowego. Watson i MacDonald (44) przeprowadzili badania kliniczne krów w dniu rui i przez następnych 7 dni, oznaczając jednocześnie progesteron i 17 β -estradiol w mleku i osoczu krwi. W wyniku tych badań stwierdzili, że w czasie optymalnym dla zapłodnienia unasienniono tylko 57% krów. U zwierząt cielnych zawartość progesteronu w dniach 6 i 7 po inseminacji była istotnie wyższa niż u krów, które się nie zacieliły.

Na podstawie badań zawartości progesteronu w mleku w dniach 0, 7 i 19—23 Arnstadt i Fischer-Arnstadt (2, 16) wyjaśniali przyczyny nieskuteczności unasienniania, zwracając między innymi uwagę na inseminację w niewłaściwym terminie, występowanie cyst jajnikowych, obumieralność zarodków. Wolf i wsp. (46) stosowali test progesteronowy w 0, 7, 21 i 28 dniu cyklu jajnikowego i porównywali otrzymane wyniki w grupach jałówek cielnych, niecielnych z regularnymi cyklami i niecielnych z zaburzeniami w przebiegu cyklu. Stwierdzili w dniu 0 najniższe wartości progesteronu u jałówek które następnie zostały cielne, natomiast w dniu 7 średni poziom progesteronu był najniższy w grupie zwierząt niecielnych o regularnych cyklach. Zawartość estradiolu w surowicy była we wszystkich dniach wyższa u jałówek cielnych niż u niecielnych wykazujących zaburzenia cyklu. Ponadto na podstawie przeprowadzonych badań ocenili występowanie obumieralności zarodkowej, szacując ją na poziomie do 10%.

Oznaczanie zawartości progesteronu w surowicy około 21 dnia po unasiennieniu lub kryciu naturalnym, pozwala na wczesne rozpoznanie ciąży na podstawie wysokiego stężenia hormonu wydzielanego przez ciało żółte ciążowe. Przyjmuje się, że większa trafność tego testu, sięgająca 100%, wyraża się w diagnozie: niecielna (5, 14, 17, 21).

Celem pracy było określenie stopnia przydatności oznaczeń hormonalnych dla diagnostyki zaburzeń rozrodu u bydła.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w fermie bydła Rolniczego Zakładu Doświadczalnego SGGW-AR w Goździach w sezonie zimowo-wiosennym 1985 i 1986. Materiał stanowiło 160 krów w wieku 2—11 lat, użytkowości mlecznej, krzyżówek międzyrasowych. Zwierzęta były utrzymywane częściowo w oborze uwięziowej na matach gumowych, a częściowo w oborach wolnostanowiskowych rusztowych.

Do oznaczeń hormonów użyto osocza obwodowej krwi żyłnej pobieranej w dniach: 0, 3 lub 4, 7 i 21 cyklu rujowego. Krew napełniano plastikowe probówki o pojemności 10 ml, zawierające heparynę. Krew wirowano, uzyskane osocze rozlewano do probówek o pojemności 1 ml i zamrażano w temp. -23°C do czasu badania. Poziom hormonów oznaczono metodami radioimmunologicznymi (23). Badanie progesteronu wykonano w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Jabłonie, a 17 β -estradiolu w Instytucie Fizjologii Zwierząt AR-T w Olsztynie.

Dla statystycznego porównania wyników badań posłużono się testem t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Wśród krów, u których w dniu zgłoszonej rui stwierdzono obecność pęcherzyka jajnikowego, 97% cechowało się poziomem progesteronu poniżej 2 ng/ml. Te z nich, które zostały cielne miały w dniu unasiennienia zawartość progesteronu w osoczu w granicach 0,01—1,98 ng/ml.

Średni poziom progesteronu u krów (n=158) w dniu zgłoszonej rui wyniósł 0,69 ng/ml osocza. U 10 krów (6,3%) zawartość progesteronu przekroczyła 2 ng/ml. Zwierzęta te, będące w fazie lutealnej w sposób sztuczny zmieniałyby średnie poziomy progesteronu w poszczególnych dniach cyklu, dlatego też zostały one wyłączone z dalszych obliczeń. Na problem inseminacji krów nie będących w rui zwracają uwagę liczni autorzy, wskazując, że zjawisko to występowało z częstotliwością od kilku do 20—30% (2, 7, 17, 18, 21, 24, 29, 31, 32, 38, 41). Jedną z przyczyn wystąpienia w fazie lutealnej objawów zbliżonych do rujowych jest wzrost pęcherzyków określanych jako międzyrujowe, które przejściowo wydzielają estrogeny, ulegając następnie atrezji (22, 35, 36).

Porównanie poziomów progesteronu w 0, 3, 4, i 7 dniu cyklu jajnikowego (tab. 1) nie wykazało istotnych różnic pomiędzy krowami, które zostały cielne i krowami, które się nie zacieliły. W odróżnieniu od wyników uzyskanych w niniejszej pracy, badania Wolfa i wsp. (46) wykazały, że zawartość progesteronu w osoczu krwi była w dniu 0 istotnie niższa u krów, które zostały cielne, co pokrywa się z wynikami przedstawionymi przez Cseha i wsp. (12).

Wolf i wsp. (46) ustalili, że w 7 dniu cyklu najniższy poziom progesteronu miały jałowki niecielne o regularnych cyklach, w odróżnieniu od zwierząt cielnych i przejawia-

jących zaburzenia cyklu. Erb i wsp. (15) wykazali w grupie krów płodnych nieco wyższe wartości progesteronu w dniach 0, 4 i 7, niż w grupie krów jałowych, przy czym w dniu 7 wyniosły one odpowiednio ok. 3,5 i ok. 2,5 ng/ml. Także Randel i wsp. (30) znaleźli więcej progesteronu w surowicy krów cielnych (średnio 9 ng/ml), niż u krów, które powtórzyły w różnym czasie (5–7 ng/ml). Przeprowadzone badania wskazują na to, że w 7 dniu u dużej liczby krów czynność wydzielnicza ciała żółtego nie była jeszcze w pełni rozwinięta. Wyrazem tego jest dalszy przeszło dwukrotny wzrost średniego poziomu progesteronu w grupie krów cielnych między 7 a 21 dniem, co pozostaje w zgodzie z wynikami badań Schamsa i wsp. (34), według których osiągnięcie pełnej zdolności wydzielniczej ciała żółtego następuje około 10-go dnia cyklu.

Oznaczenia progesteronu, dokonane w 21 dniu po inseminacji, w pełni potwierdzają przydatność tego badania do wczesnej diagnostyki ciąży. Wszystkie krowy, które w tym czasie miały poziom progesteronu poniżej 2 ng/ml, okazały się niecielnne, zatem zgodność była 100%-owa, podobnie jak w badaniach różnych autorów (5, 7, 17, 21). Inni badacze wykazywali tu nieco mniejszą zgodność, a mianowicie 91% (14), a nawet 77,6% (43).

Przy wysokim poziomie progesteronu (powyżej 2 ng/ml) stwierdzonym w badaniach własnych w dniu 21 u 46 krów, 7 z nich okazało się niecielnymi, a zatem zgodność cielności z oznaczeniem progesteronu osiągnęła 84,8% i jest zbliżona do wyników uzyskiwanych w innych badaniach (5, 14, 21, 32), albo nieco od nich (1, 41, 43) wyższa.

Średni poziom progesteronu w 21 dniu u 7 krów, które ostatecznie okazały się niecielnymi wyniósł 5,0 ng/ml i był podobny do średniej zawartości progesteronu, wynoszącej 4,92 ng/ml, krów cielnych. U zwierząt tych podejrzewać można obumieralność zarodkową. Utrata zarodka przed 14–16 dniem ciąży (3, 4, 47) lub według innych autorów przed 10–13 dniem (6, 45) nie wiąże się z opóźnieniem luteolizy i nie wpływa na wydłużenie cyklu, dlatego też jest niemożliwa do wykrycia przy pomocy oznaczeń hormonalnych. Wśród ogólnych strat zarodkowych u bydła, szacowanych na około 20% (33, 37), z największą częstotliwością obumieralność występuje według różnych autorów w dniach 6–7 (4, 47), do 11–13 (6, 8), 8–18 (13, 33, 40).

Wysoki poziom progesteronu w 21 dniu cyklu nie zawsze jest związany z istnieniem ciąży. U niektórych krów mogą występować fizjologicznie dłuższe cykle, bądź też mogą powstawać zaburzenia luteolizy, prowadzące do utrzymywania się ciała żółtego rzekomociałowego (9, 10, 23). Z tego względu diagnoza obumieralności zarodkowej na podstawie oznaczeń progesteronu jest obarczona pewnym błędem. W badaniach własnych, spośród 7 krów o wysokim poziomie progesteronu w 21 dniu, u 4 zwierząt zachodzi raczej podejrzenie braku zapłodnienia, niż obumarcia zarodka. U 3 pozostałych krów nie znaleziono żadnych potencjalnych przyczyn niepłodności i w tych wypadkach uznano za uzasadnione domniemanie obumieralności zarodkowej. Zwierzęta te stanowią 2,6% wszystkich badanych krów.

Zawartość estradiolu w osoczu krów wahał się od 0 do 21 pg/ml. Średnie poziomy estradiolu w osoczu krwi przedstawia tab. 2. W zestawieniu ujęto tylko te krowy u których w dniu 0 poziom progesteronu wynosił poniżej 2 ng/ml.

W tabeli 3 porównano wyniki badania klinicznego jajników ze średnimi stężeniami estradiolu w dniu zgłoszonej ruji. Wyniki oznaczeń poziomu estradiolu charakteryzują się dużą rozpiętością, tak w poszczególnych dniach cyklu (tab. 2), jak też w obecności różnych struktur jajnikowych (tab. 3). Także Hoffman (20) wskazuje na znaczne wahania w wykresie 17 β -estradiolu w przebiegu cyklu jajnikowego u różnych krów.

Tab. 1. Poziom progesteronu w osoczu krwi krów cielnych i niecielnnych w różnych dniach cyklu rujowego (ng/ml)

Krowy	Dni cyklu jajnikowego						
	0	3	4	7	21	21A	21B
Cielne n=39	\bar{x} 0,47 ^a \pm 0,35	0,70 ^a 0,36	0,89 ^a 0,39	2,21 ^b 0,75	4,92 ^c 1,59	X	X
Niecielnne n=75	\bar{x} 0,49 ^d \pm 0,36	0,75 ^d 0,51	0,77 ^d 0,57	2,08 ^{b,e} 1,10	0,94 ^a 1,39	5,0 1,07	0,54 0,41

Objaśnienia: 21A krowy o wysokiej zawartości progesteronu w 21 dniu, które następnie okazały się niecielnne; 21B krowy pozostałe po wydzieleniu grupy 21A; a < b < c przy p < 0,01; d < e przy p < 0,01.

Tab. 2. Poziom estradiolu w osoczu krwi krów cielnych i niecielnnych w różnych dniach cyklu rujowego (pg/ml)

Krowy	Dni cyklu jajnikowego				
	0	3	4	7	21
Cielne n=36	\bar{x} 6,4 \pm 4,4	4,4 ^a 2,9	5,3 ^c 3,7	8,5 ^b 4,9	6,4 ^c 3,9
Niecielnne n=76	\bar{x} 6,6 \pm 4,6	5,3 4,1	4,7 4,4	5,9 ^a 3,9	6,0 4,3

Objaśnienia: a < b przy p < 0,01; c < b przy p < 0,05.

Tab. 3. Poziom estradiolu w osoczu krwi krów przy obecności różnych struktur jajnikowych

Stwierdzono klinicznie	Liczba krów	Estradiol w pg/ml \bar{x} (od — do)
Pęcherzyk	98	6,5 (0 — 19,5)
Ciało żółte	12	4,3 (0 — 9,5)
Jajniki gładkie	31	6,6 (0 — 14,0)
Torbiele	6	5,7 (3,7 — 9,8)
Ogółem	147	6,2 (0 — 19,5)

Średnie zawartości estradiolu w osoczu krwi krów cielnych i niecielnnych wskazują na istnienie pewnej tendencji w zachowaniu tego hormonu. U krów cielnych zaznacza się wzrost poziomu estradiolu w 7 dniu w porównaniu z dniami: 0, 3, 4 i 21, podczas gdy u zwierząt, które nie zacieliły się, wykres średnich poziomów hormonu jest mniej zróżnicowany, co może wskazywać na ograniczoną zdolność sterydogenezy hormonów jajnikowych u tych krów. Potwierdzają to pośrednio wyniki badań Wolfa i wsp. (46), którzy badając krowy 4-krotnie od 0 do 28 dnia cyklu, stwierdzili we wszystkich dniach pobrań wyższe poziomy estradiolu u krów cielnych, niż u tych, które wykazywały zaburzenia cyklu.

Należy podkreślić duży rozrzut wyników indywidualnych pomiarów poziomu estradiolu (tab. 3). Przy obecności cyst jajnikowych poziomy hormonu w różnych dniach pobrań różniły się znacznie od siebie wahając się między 0 a 14,5 pg/ml. Na zróżnicowanie poziomów estradiolu w osoczu z cystami jajnikowymi zwracają też uwagę Kesler i Garverick (26). Podobnie duże, indywidualne wahania zanotowano przy stwierdzanych pęcherzykach jajnikowych, ciałkach żółtych i jajnikach gładkich. Ten brak regularności wyników oznaczeń estradiolu można częściowo wiązać ze specyfiką jego wydzielania, charakteryzującego się przerywanymi wzrostami trwającymi 9–15 godzin i spadkami niezależnymi od pory dnia i fazy cyklu (39, 42). Takie zróżnicowanie pomiarów bardzo poważnie ogranicza możliwość

ich wykorzystania w indywidualnej ocenie prawidłowości, bądź zaburzeń w cyklu rujowym.

Przy wykorzystaniu pomiarów endokrynologicznych należy pamiętać o możliwości występowania w poszczególnych fazach cyklu rujowego nietypowych poziomów hormonów (25), co może ujemnie wpływać na trafność diagnozy. Ponadto w różnych stadach stwierdza się odmienne wartości stężenia hormonów oznaczonych w tych samych fazach cyklu (11, 19, 27), co może być związane z warunkami środowiskowymi, rasą i użytkowością zwierząt. Oprócz tego stosuje się zróżnicowaną metodykę badawczą oraz przyjmuje się różne wartości progowe stężenia hormonów. Z tych względów porównawcza ocena wyników oznaczeń endokrynologicznych jest trudna, a formułowane wnioski odnoszą się w zasadzie do konkretnych warunków badawczych.

Piśmiennictwo

1. Antal T., Faluhelyi S., Szabó I., Tekerés A., Jandky T., Tóth I., Faredin I., László F.: *Magy. Allatorv. Lapja* 41, 579, 1986.
2. Arnstadt K. I., Fischer-Arnstadt A. R.: *Tierärztl. Umschau* 40, 391, 1985.
3. Ayalon N.: *J. Reprod. Fert.* 54, 483, 1978.
4. Ayalon N.: *Zuchthygiene* 16, 97, 1981.
5. Barth T.: *Tierhyg.-Inform.* 14, 45, 1982.
6. Barth T., Horsch F.: *Mh. Vet. Med.* 37, 725, 1982.
7. Barth T., Kiefling J., Schöne G., Keiker L., Herzmann H., Herzmann A., Graeser K.: *Mh. Vet. Med.* 41, 367, 1986.
8. Boyd H., Bacsich P., Young A., Cracken J. A.: *Br. vet. J.* 125, 87, 1969.
9. Bulman D. C., Lamming G. E.: *Vet. Rec.* 100, 550, 1977.
10. Bulman D. C., Lamming G. E.: *J. Reprod. Fert.* 54, 447, 1978.
11. Bulman D. C., Lamming G. E.: *Br. vet. J.* 135, 559, 1979.
12. Cseh S., Molnár L., Solti L.: *Magy. Allatorv. Lapja* 42, 355, 1987.
13. Diskin M. G., Sreenam J. M.: *J. Reprod. Fert.* 59, 463, 1980.
14. Dobson H., Fitzpatrick R. J.: *Br. vet. J.* 132, 538, 1976.
15. Erb R. E., Garverick H. A., Randel R. D., Brown B. L., Callahan C. J.: *Theriogenology* 5, 227, 1976.
16. Fischer A. R., Arnstadt K. J.: *Zuchthygiene* 18, 123, 1983.
17. Fischer-Arnstadt A. R., Arnstadt K. J.: *Tierzüchter* 36, 247, 1984.
18. Günzler E., Rattenberger E., Goriach A., Hahn R., Hocke P., Claus A., Karg H.: *Br. vet. J.* 135, 541, 1979.
19. Guazdauskas F. C., Thatcher W. W., Wilcox C. J.: *J. Dairy Sci.* 56, 873, 1973.
20. Hoffman B.: *Zbl. Vet. Med. Suppl.* 26, 1977.
21. Holtz W., Brackel A. V., Küster J.: *Zbl. Vet. Med. A.* 33, 321, 1986.
22. Ireland J. J., Roche J. F.: *Endocrinology* 112, 150, 1984.
23. Janowski T.: *Medycyna Wet.* 43, 170, 1987.
24. Janowski T., Chmiel J., Kucharski J.: *Medycyna Wet.* 41, 678, 1985.
25. Judek J.: *Medycyna Wet.* 39, 202, 1983.
26. Kesler D. J., Garverick H. A.: *J. Anim. Sci.* 55, 1147, 1982.
27. Kitzig W., Schnetder F., Rodewald S., Blowow G., Kanitz W., Reibock F., Rommel P.: *Mh. Vet. Med.* 41, 477, 1986.
28. Kokot F., Stupnicki R.: *Metody radiologiczne i radiokompetencyjne stosowane w klinice*. PZWL Warszawa 1985.
29. Mc Caughey W. J., Cooper R. J.: *Vet. Rec.* 107, 508, 1980.
30. Randel R. D., Garverick H. A., Surve A. H.: *J. Anim. Sci.* 33, 104, 1971.
31. Rattenberger E., Richter O.: *Terzüchter* 35, 229, 1983.
32. Richter O.: *Tierzüchter* 34, 376, 1982.
33. Roche J. F., Boland M. P., Mc Geady T. A.: *Vet. Rec.* 109, 401, 1981.
34. Schams D., Schallenberger E., Hoffman B., Karg H.: *Acta Endocrinol.* 86, 180, 1977.
35. Schneebeli J., Eggenberger E.: *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 127, 213, 1985.
36. Schneebeli J., Eggenberger E.: *Schweiz Arch. Tierheilk.* 128, 201, 1986.
37. Short R. V.: *Ciba Found. Symp.* 64, Exc. Med. Amsterdam 1979, 1979.
38. Solti L., Molnár L., Huszenicza G., Haraszti J.: *Magy. Allatorv. Lapja* 41, 727, 1986.
39. Spicer L. J., Echternkamp S. E.: *J. Anim. Sci.* 62, 428, 1986.
40. Sreenam J. M., Diskin M. G.: *Vet. Rec.* 28, 517, 1983.
41. Takács T., Balogh A., Ditrói F., Resli I.: *Magy. Allatorv. Lapja* 41, 585, 1986.
42. Thun R., Eggenberger E., Zerobin K.: *Anim. Reprod. Sci.* 9, 341, 1985.
43. Thun R., Eggenberger E., Zerobin K., Summermatter A., Flukiger A., Gaillard C.: *Zuchthygiene* 15, 7, 1980.
44. Watson E. D., Mac Donald B. J.: *Br. vet. J.* 140, 398, 1984.
45. Weigelt B., Weigelt R.: *Tierhyg.-Inform.* 15, 31, 1983.
46. Wolf P., Eulenberger K., Schulz J., Richter A., Tietze H.-J.: *Tierhyg.-Inform.* 15, 18, 1983.
47. Youngquist R. S., Braun W. F.: *J. Am. Vet. Med. Ass.* 189, 411, 1986.

Adres autora: dr Andrzej Max, ul. Hawajska 12 m. 27, 02-776 Warszawa

HIGIENA ŻYWNOŚCI

TOMASZ MOTYL

Kwas orotowy w mleku: pochodzenie, fizjologiczne znaczenie oraz konsekwencje spożycia

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR,
ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa

Kwas orotowy jest metabolitem pośrednim w syntezie nukleotydów pirymidynowych. Znany jest on już od 1904 roku, kiedy to Biscaro i Bellani (2) wyizolowali go z serwatki mleka. W późniejszych badaniach poznano jego rolę jako metabolitu pośredniego w syntezie nukleotydów pirymidynowych. Synteza i metabolizm kwasu orotowego przebiegają przy udziale enzymów zlokalizowanych w cytoplazmie, z wyjątkiem dehydrogenazy kwasu dwuhydroorotowego, która związana jest z zewnętrzną powierzchnią wewnętrznej błony mitochondrialnej. Cytoplazmatyczne enzymy występują w dwóch kompleksach. Jeden, złożony z syntetazy karbamoilofosforanowej II, karbamoilotransferazy asparaginianowej i dwuhydroorotazy, prowadzi do syntezy kwasu dwuhydroorotowego — prekursora kwasu orotowego, drugi natomiast, złożony z fosforybozylotransferazy orotynianowej i dekarboksylazy kwasu orotodylowego katalizuje syntezę kwasu urydylowego z kwasu orotowego.

Synteza kwasu orotowego nie przebiega z jednakową szybkością w różnych tkankach. Największą aktywnością pod

tym względem charakteryzuje się gruczoł mlekowy, śledziona, wątroba, nerki i mózg w życiu płodowym (36). Chen i Larson (5), porównując różne tkanki oraz płyny fizjologiczne laktującej krowy, stwierdzili najwyższe stężenie kwasu orotowego w mleku. Bardzo wysokie stężenie zanotowano także w homogenacie gruczołu mlekowego wypelnionego mlekiem. W samym gruczole mlekowym bez wydzieliny koncentracja kwasu orotowego zbliżona była do obserwowanej w innych tkankach, co wskazuje na dużą zdolność akumulacji tego związku w mleku. We krwi stężenie kwasu orotowego jest szczególnie niskie i stanowi około 0,01 stężenia tego związku w moczu i zaledwie około 0,001 koncentracji kwasu orotowego w mleku (21). Turnover kwasu orotowego w osoczu krwi jest krótki i u owcy w warunkach fizjologicznych wynosi 4,5 min. (22). Podając owcy dożylnie egzogenny kwas orotowy stwierdzono, że 55% podanej dawki wydala się z moczem, natomiast 45% podlega przemianom w tkankach (22). Zastanawiającym jest niezwykle wysokie stężenie kwasu orotowego w mleku, które można tylko porównać ze stężeniem tegoż związku w moczu przy dziedycznych niedoborach enzymów metabolizujących kwas