

Zależność pomiędzy stopniem rozwoju ciała żółtego i poziomem progesteronu a wynikami zacieleń biorczyń zarodków

JUSTYNA ŻYCHLIŃSKA, ZYGMUNT GIL, KRZYSZTOF SŁONIEWSKI*

Katedra Hodowli Bydła Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

*Zakład Doskonalenia Zwierząt IGiHZ PAN w Jastrzębcu, ul. Postępu 1, 05-552 Wólka Kosowska

Żychlińska J., Gil Z., Słoniewski K.

Relationship between the stage of development of corpus luteum and progesterone concentration and pregnancy rate in embryo recipients

Summary

The aim of the study was to discover the relationship between the degree of corpus luteum development and progesterone level - and pregnancy results in embryo recipients.

The study was carried out on 382 recipients including 351 heifers and 31 cows. The degree of corpus luteum development on the ovary closest to which the embryo had been placed was evaluated by palpation before ET intervention. The degree of the development was denoted as one (+) to three (+++) pluses. In 36 recipients the progesterone concentrations in blood serum was determined by radio-immunological method on the day of ET and during 5 subsequent days. The lowest pregnancy rate in heifers as well cows was found in the recipients with the lowest degree of corpus luteum development (denoted by one plus). The highest pregnancy rate was observed in heifers in which the development of corpus luteum was denoted by three pluses. The obtained results indicate that the pregnancy rate in the recipients increased along with corpus luteum enlargement. The relationships between progesterone concentrations and the pregnancy rate were not proven statistically. Palpation evaluation of corpus luteum size in recipients may be of some predictive value in bovine embryo transfer.

Keywords: cattle, corpus luteum, embryo transfer

Wprawdzie zainteresowanie embriotransferem u bydła w naszym kraju jest w ostatnich latach niewielkie, ale na świecie ta technika rozrodu jest w dalszym ciągu szeroko rozpowszechniona. Jaśkowski i wsp. (3) podają, że w 2003 r. dawczyniami zarodków w Polsce było zaledwie 68 krów, natomiast na świecie np. w 2000 r. było 113 058 dawczyń i przeniesiono więcej niż pół miliona zarodków. Embriotransfer u bydła, jako metoda rozrodu, wymaga ciągłego doskonalenia, a zwłaszcza poprawy skuteczności. Jest on warunkowany wieloma czynnikami, między innymi: właściwym doбором dawczyń i biorczyń, stopniem zsynchronizowania ich cyklu rujowego, jakością i stadium rozwoju zarodka, rodzajem przenoszonego zarodka – świeży czy mrożony. W przypadku biorczyń jednym z istotnych czynników wpływających na wyniki zacieleń jest poziom progesteronu we krwi, choć zauważa się różnice zdań w tym względzie. Jaśkowski i wsp. (2) wskazują na brak zależności pomiędzy stężeniem progesteronu w dniu transferu zarodka a wynikami zacieleń. Odmienny pogląd prezentują Nishigai i wsp. (5), którzy wykazali, że u biorczyń ze stężeniem progesteronu we krwi poniżej 2,5 ng/ml w dniu transferu zarodka odsetek zacieleń kształtował się na poziomie 35,7%, a u biorczyń ze stężeniem progesteronu powyżej 2,5 ng/ml – na poziomie 56,9%. Badania z ostatnich lat (1, 6, 7) jednoznacznie dowodzą istotnej roli progesteronu w rozwoju zarodka i w utrzymaniu ciąży. Inskip (1) wyróżnia 4 okresy krytyczne, w których poziom progesteronu może decydować o przeżyciu zarodka. Są nimi: wczesny poowulacyjny okres przed upływem 6. dnia po zapłod-

nieniu, okres pomiędzy 4. a 9. dniem po zapłodnieniu, okres matczynego rozpoznania ciąży pomiędzy 14. a 17. dniem, późny okres embrionalny pomiędzy 28. a 42. dniem ciąży. O możliwościach sekrecyjnych ciała żółtego świadczy pośrednio stopień jego rozwoju. Sartori i wsp. (7) wskazują na zależności pomiędzy wielkością owulującego pęcherzyka a wielkością ciała żółtego i stężeniem progesteronu, choć te zależności inaczej kształtowały się u jałówek, a inaczej u krów będących w laktacji, zwłaszcza wysoko wydajnych. U krów stwierdzono większe rozmiary ciała żółtego w porównaniu z jałówkami, ale mniejsze stężenie progesteronu w 6. dniu po owulacji. Zdaniem wymienionych wyżej autorów, prawdopodobną przyczyną różnic w stężeniu progesteronu był większy metabolizm progesteronu u krów niż u jałówek. Byłoby wskazane, aby przy kwalifikowaniu krów lub jałówek na biorczynię zarodków brano pod uwagę łącznie wynik ultrasonograficznego badania jajników oraz poziom progesteronu. Jednakże w praktyce najczęściej określa się tylko stopień rozwoju ciała żółtego poprzez badanie palpacyjne.

Celem badań było określenie zależności pomiędzy stopniem rozwoju ciała żółtego i poziomem progesteronu a wynikami zacieleń biorczyń zarodków.

Material i metody

Badania przeprowadzono na 382 biorczyniach, w tym na 351 jałówkach i 31 krowach, w 11 oborach. Przeprowadzono je przy współpracy z lekarzami weterynarii, rutynowo wykonującymi zabiegi embriotransferu. Po wstępnej selekcji zwierząt, badaniu

klinicznym i przygotowaniu hormonalnym kwalifikowano jałówki i krowy na biorczynie zarodków, do których przenoszono zarodki mrożone. W zdecydowanej większości (ponad 75%) przenoszone zarodki były w stadium moruli, a pozostałe w stadium wczesnej blastocysty lub blastocysty. Zarodki były bardzo dobrej lub dobrej jakości. Przygotowanie hormonalne polegało na domięśniowym podaniu 2 dawek Bioestrovetu (po 2 ml) w odstępie 11-dniowym. Przed zabiegiem embriotransferu określano palpacyjnie stopień rozwoju obecnego na jajniku ciała żółtego. Rozwój ten określano w skali od jednego (+) do trzech (+++) plusów. Ciało żółte oznaczone jednym plusem było słabo, dwoma średnio, a trzema dobrze rozwinięte. Przez dobrze rozwinięte rozumiano ciało żółte duże, dobrze wyczuwalne o jędrnej konsystencji, przez słabo rozwinięte: małe, trudniej wyczuwalne, zajmujące mniej niż trzecią część wielkości jajnika. Zarodek umieszczano w rogu macicy ipsilateralnie w stosunku do ciała żółtego. Od 36 biorczyń (jałówek) pobrano próbki krwi z żyły szyjnej zewnętrznej, celem oznaczenia stężenia progesteronu. Probki krwi pobierano w dniu embriotransferu czterokrotnie – godzinę przed zabiegiem oraz w 5., 8. i 11. godzinie po zabiegu, a także przez następne 5 dni – rano i wieczorem. Oznaczeń stężenia progesteronu dokonywano w surowicy krwi metodą radioimmunologiczną przy użyciu zestawu handlowego RIA Progesterone [¹²⁵I] Spectria (Orion Diagnostika) – czułość metody ≤ 0,3 nmol/l. Wpływ rozważanych czynników na prawdopodobieństwo zacielenia biorczyń analizowano retrospektywnie, badając przy pomocy testu chi-kwadrat niezależności cechy „cielność” („cielna” lub „niecielna”) od odpowiednio cechy „stopień rozwoju ciała żółtego” (3 klasy) lub cechy „poziom progesteronu” (klasa L lub H). Poziom progesteronu w dniu 0 (w dniu przeniesienia zarodka) ustalono dla każdej biorczyny obliczając średnią z czterech wykonanych oznaczeń. Przeciętny poziom progesteronu w osoczu krwi w dniach 0-5 ustalono obliczając średnią ze wszystkich oznaczeń wykonanych dla danej biorczyny. Obserwacje przyporządkowywano do klasy „L” jeśli poziom progesteronu w osoczu biorczyny był niższy niż przeciętny w badanej grupie, a do grupy „H” w pozostałych przypadkach.

Wyniki i omówienie

Zarówno wśród jałówek, jak i krow najmniejszy odsetek zacielen odnotowano w grupie biorczyń, u których stwierdzono najslabiej rozwinięte ciało żółte oznaczone jednym plusem (tab. 1). Największy odsetek zacielen odnotowano zaś w grupie jałówek, u których rozwój ten oznaczono trzema, a w grupie krow dwoma plusami. Zależność między stopniem rozwoju ciała żółtego a odsetkiem zacielen biorczyń była statystycznie istotna ($p \leq 0,001$) dla jałówek (tab. 1). Uzyskane wyniki badań, zwłaszcza u jałówek, świadczą o tym, że im ciało żółte było bardziej rozwinięte, tym większy był odsetek zacielen biorczyń. Wyniki te są zgodne z badaniami innych autorów. Nishigai i wsp. (5) również stwierdzili większy odsetek (55,3%) zacielen biorczyń, u których ciało żółte było odpowiednio duże, w porównaniu z biorczyniami, u których ciało żółte było słabo wykształcone (44,4%). Natomiast Jaśkowski i wsp. (2) najlepsze wyniki zacielen biorczyń notowali wówczas, kiedy ciało żółte miało wielkość ziarna pieprzu (73,6%) lub grochu (58,3%). Analiza statystyczna wykazała brak zależności pomiędzy stężeniem progesteronu a wynikami zacielen biorczyń (tab. 2). W badaniach niniejszych brano pod uwagę średnie stężenie progesteronu w dniu przeniesienia zarodka oraz w następnych 5 dniach, które kształtowało się odpowiednio na poziomie: 2,8 ng/ml

Tab. 1. Wyniki zacielen biorczyń w zależności od stopnia rozwoju ciała żółtego

Stopień rozwoju ciała żółtego	Krowy		Jałówki	
	cielne n (%)	niecielne n (%)	cielne n (%)	niecielne n (%)
Słabo rozwinięte (+)	1 (50)	1 (50)	6 (18)	26 (82)
Średnio rozwinięte (++)	17 (89)	2 (11)	71 (40)	106 (60)
Dobrze rozwinięte (+++)	5 (50)	5 (50)	90 (63)	52 (37)
Razem	23 (74)	8 (16)	167 (48)	184 (52)
Wartość testu chi-kwadrat	5,9854		28,8342	
Prawdopodobieństwo*	0,0502		< 0,001	

Objaśnienie: * prawdopodobieństwo, że wyniki zacielen są niezależne od wielkości ciała żółtego, oszacowane testem chi-kwadrat

Tab. 2. Wyniki zacielen biorczyń w zależności od poziomu progesteronu

Poziom progesteronu*	Dzień 0		Dni 0-5	
	Liczba biorczyń		Liczba biorczyń	
	cielne	niecielne	cielne	niecielne
Niski (grupa L)	4	12	6	11
Wysoki (grupa H)	8	14	6	15
Wartość testu chi-kwadrat	0,5536		0,1965	
Prawdopodobieństwo**	0,4568		0,6576	

Objaśnienia: * wartością graniczną, na podstawie której biorczynie przydzielano do grupy L lub H była koncentracja progesteronu w surowicy krwi równa 2,8 ng/ml dla dnia „0” oraz odpowiednio 4,3 ng/ml dla dni 0-5; ** prawdopodobieństwo, że wyniki zacielen są niezależne od poziomu progesteronu, oszacowane testem chi-kwadrat

oraz 4,3 ng/ml. Na brak zależności pomiędzy wynikami zacielen biorczyń a stężeniem progesteronu w dniu transferu zarodka wskazują badania Jaśkowskiego i wsp. (2), a także Kamimury i wsp. (4). Natomiast Nishigai i wsp. (5) wykazali taką zależność, stwierdzając większy odsetek zacielen u biorczyń, u których stężenie progesteronu w dniu przeniesienia zarodka było wyższe niż 2,5 ng/ml.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że palpacyjna ocena stopnia rozwoju ciała żółtego biorczynie może być przydatna w prognozowaniu efektów embriotransferu.

Piśmiennictwo

1. Inskip E. K.: Preovulatory, postovulatory and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J. Anim. Sci.* 2004, 82, (Suppl.), 24-39.
2. Jaśkowski J. M., Znaniecki R., Hutnikiewicz I. M., Sucharski M., Lewandowski Z.: Profil metaboliczny i zależność pomiędzy stężeniem progesteronu a wynikami zacielen u krow biorczyń zarodków. *Medycyna Wet.* 1994, 50, 619-622.
3. Jaśkowski J. M., Włodarek J., Urbaniak K.: Aktualny stan biotechnologii stosowanych w rozrodzie bydła. *Mat. Sesji Nauk. Problemy w rozrodzie bydła – dziś i jutro. Polanica Zdrój 2004*, s. 37-40.
4. Kamimura S., Ono M., Sameshima H., Enomoto S., Hamana K., Goto K., Yanagita K.: Ultrasonic findings in the ovaries and the associated concentrations of plasma progesterone in Japanese black cows transferred with frozen-thawed embryos. *Bull. Faculty of Agriculture Kagoshima University. (Japan)* 1994, 44, 29-34.
5. Nishigai M., Kamomae H., Tanaka T., Kaneda Y.: Pregnancy rate and blood progesterone concentrations on the previous day and the day of frozen embryo transfer in parous recipient cows of Japanese black. *J. Reprod. Develop. (Japan)* 1998, 44, 413-419.
6. Sartori R., Haughian J., Rosa G. J. M., Shaver R. D., Wiltbank M. C.: Differences between lactating cow and nulliparous heifers in follicular dynamics, luteal growth and serum steroid concentrations. *J. Dairy Sci.* 2000, 83 (Suppl. 1), 212 (abstr.).
7. Sartori R., Rosa G. J. M., Wiltbank M. C.: Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 2813-2822.

Adres autora: dr inż. Justyna Żychlińska, 32-060 Liszki 289; e-mail: jzychlin@ar.krakow.pl