

Synchronizacja rui i superowulacja wpływają na funkcje ciała żółtego krowy: czy manipulacje hormonalne zawsze przynoszą oczekiwane efekty?*)

WOJCIECH PILAWSKI*,**, MARTA J. SIEMIENIUCH*, DARIUSZ J. SKARŻYŃSKI*

*Zakład Immunologii Rozrodu Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

**Prywatna Lecznica Zwierząt w Łapach, ul. Brańska 2, 18-100 Łapy

Pilawski W., Siemienuch M. J., Skarżyński D. J.

Influence of estrus synchronization and superovulation on corpus luteum functioning in cattle. Does hormonal manipulation always provide desirable effects?

Summary

The main function of the corpus luteum (CL) is progesterone (P4) production, a factor which regulates the estrous cycle and provides proper embryo and fetus development, the hormone that determines the efficiency of reproduction. Estrus synchronization is one of the basal methods applied in reproductive biotechnics. However, pharmacological manipulation of the estrous cycle may cause various CL dysfunctions, including abnormal P4 synthesis after superovulation or synchronization of the cycle. In the authors studies the influence of different methods of estrus synchronization (injection of PGF_{2α} analogues: dinoprost, cloprostenol and luprostiol; or gestagens treatment: norgestomet) on CL sensitivity to luteotropic factors (LH and PGE₂) was investigated. With the use of PGF_{2α} analogues the lower action of luteotropic factors on the CL function was demonstrated in the CL after estrus synchronization. Physiological CL sensitivity to the stimulation was observed in CL from the cows with norgestomet-synchronized cycles. The only effects of dinoprost on CL functioning in vitro were conferrable and similar to the natural PGF_{2α} action. Other PGF_{2α} analogues much more powerfully and differently influenced the cells/tissues of the bovine reproductive tract compared to natural PGF_{2α} action. Lower P4 production in the CL after hormonal manipulation may cause insufficient protection of the embryo by the CL products during the first critical pregnancy period and lead to the early termination of pregnancy.

Keywords: prostaglandin F_{2α}, corpus luteum, estrus synchronization, cow

Farmakologiczne sterowanie owulacją i cyklem płciowym służy w praktyce lekarsko-weterynaryjnej do poprawy organizacji rozrodu w dużych stadach zwierząt, jak również stanowi integralną część programów hodowlanych obejmujących pozyskiwanie i przenoszenie zarodków (5, 27, 30). Do tej pory na świecie i w kraju opracowano wiele metod synchronizacji rui i superowulacji; nie są one jednak pozbawione wad. Badania przeprowadzone w wielu światowych i krajowych ośrodkach określiły skuteczność różnych preparatów gonadotropowych, gestagenowych oraz analogów/preparatów prostaglandyny F_{2α} (PGF_{2α}) ze względu na wyniki synchronizacji rui u krów (9, 10, 25, 27, 30). Badania te wykazały różną skuteczność poszczególnych metod biotechniki i stosowanych preparatów hormonalnych, w zależności od kondycji zdrowotnej, warunków żywieniowych i utrzymania, co ostatecznie rzutowało na wyniki synchronizacji rui, superowulacji, jakość i liczbę uzyskiwanych zarodków zdolnych do transferu (11, 13, 18, 25, 27). Większość badań opisujących metody synchronizacji i/lub superowulacji koncentrowała się jednak na wskaźnikach ilościowych:

skuteczności superowulacji, skuteczności i czasu pojawienia się rui, rzadko uwzględniając wpływ i mechanizm działania stosowanych preparatów farmakologicznych na funkcje życiowe komórek ciała żółtego (CL), jajnika, jajowodu i macicy w cyklach następujących po farmakologicznej ingerencji, co może bezpośrednio wpływać na wczesny rozwój i implantację zarodka.

Ciało żółte – regulacja i podstawowe funkcje

Ciało żółte (*corpus luteum*, CL) jest gruczołem dokrewnym powstającym z pozostałych po owulacji elementów pęcherzyka jajnikowego: z komórek warstwy ziarnistej i osłonki wewnętrznej pęcherzyka (6, 12). Główną funkcją CL jest produkcja progesteronu (P4), który jest jednym z najważniejszych czynników kontrolujących cykl jajnikowy i zapewniający właściwy rozwój zarodka i płodu, a więc hormonem decydującym o efektywności rozrodu (6). Oprócz komórek steroidogennych, stanowiących od 25% do 40% liczby wszystkich komórek CL krowy, w jego skład wchodzi także komórki śródbłonna naczyń, komórki tkanki łącznej oraz komórki układu immunologicznego (6, 12). Rozwój i trwanie tego złożonego kompleksu komórkowego podczas cyklu jajnikowego i ciąży

*) Referat przedstawiony podczas XI Międzynarodowej Konferencji Naukowej „Rozród Bydła”; Polanica Zdrój 28-30.06.2007.

zależne jest od wielu czynników i podlega złożonym mechanizmom regulacyjnym (15, 17, 21, 22). Bezpośrednio po owulacji rozpoczyna się proces luteinizacji komórek warstwy ziarnistej i osłonki pęcherzyka zainicjowany wylewem z przysadki hormonu luteinizującego (LH). Hormon luteinizujący, chociaż jest podstawowym hormonem wspierającym i kontrolującym funkcje CL, nie jest jedynym czynnikiem decydującym o jego wzroście i rozwoju. Podkreślić należy lokalne mechanizmy regulacyjne wewnątrz samego CL krowy i rolę auto/parakrynych regulatorów, przede wszystkim prostaglandyn (PG) i innych metabolitów kwasu arachidonowego, a szczególnie PGE₂ oraz innych czynników: czynniki wzrostu (IGF-1, EGF, FGF), hormony peptydowe (oksytocyna, angiotensyna, endotelina-1); steroidy jajnikowe (P4, estrogeny); cytokiny (czynnik martwicy nowotworu – TNF- α , interferon – IFN- γ) neuromediatory (noradrenalina i inne) (6, 15, 17, 21, 22).

Synteza i wydzielanie P4 zależne są od wzajemnego stosunku czynników luteotropowych (LH, PGE₂, OT, P4, czynniki wzrostu) do luteolitycznych (PGF_{2 α} , cytokiny, w tym TNF- α , IFN- γ ; tlenek azotu, endotelina-1) (6, 15, 17, 21, 22). Przewaga działania czynników luteotropowych nad luteolitycznymi jest warunkiem niezbędnym dla właściwego rozwoju i funkcji wydzielniczych CL, implantacji zarodka, prawidłowego rozwoju płodu, utrzymania i przebiegu ciąży. Ustąpienie luteotropowej dominacji, połączone z uwolnieniem z macicy czynnika luteolitycznego, jakim u krowy jest PGF_{2 α} , prowadzi do regresji CL (14, 20). Nieprawidłowości w wydzielaniu hormonów oraz innych czynników regulacyjnych, załamujące równowagę pomiędzy działaniem czynników luteotropowych do luteolitycznych może prowadzić do zaburzeń funkcji CL, czego skutkiem mogą być zmiany długości cyklu jajnikowego (wydłużenie, skrócenie), powstawanie CL rzekomociażowych, a z drugiej strony – do obniżonej produkcji P4, co może być przyczyną wczesnej śmierci zarodkowej (8, 18). Wiele tych zaburzeń może powstawać w wyniku niewłaściwie zastosowanej ingerencji farmakologiczno-hormonalnej podczas zabiegów biotechnologicznych (synchronizacja rui, indukcja superowulacji, transfer zarodków).

Wpływ różnych metod synchronizacji rui i superowulacji na funkcje ciała żółtego

Synchronizacja rui z wykorzystaniem preparatu/analogu PGF_{2 α} polega na wywołaniu regresji istniejącego na jajniku cyklicznego CL. W następstwie tego na jajniku dochodzi do szybkiego wzrostu pęcherzyków i ich owulacji. Po owulacji na jajniku tworzy się nowe CL, które w przypadku skutecznego krycia lub inseminacji powinno zapewnić odpowiedni poziom syntezy i wydzielania P4 celem utrzymania ciąży. Pierwsze kilkanaście dni po zapłodnieniu decyduje o macierzynie rozpoznaniu ciąży i podtrzymaniu funkcji CL. Jak wspomniano wcześniej, P4 wydzielany przez CL chroni wczesną blastocystę już podczas jej wędrowki przez jajowód i dalej w macicy, zapewniając zarodkowi ochronę immuno-endokrynną oraz korzystne środowisko w macicy. W tych krytycznych dla zarodka chwilach mechanizmy ochrony luteotropowej muszą być wysoko sprawne. Sugeruje się jednak negatywny wpływ synchronizacji rui i/lub superowulacji na

funkcje wydzielnicze, czynnościowe oraz morfologię komórek pęcherzyków jajnikowych i CL powstałych w cyklu rujowym następującym zaraz po farmakologicznej manipulacji (7, 19, 28, 29).

We wcześniejszych badaniach własnych wykazaliśmy, że niemalże 10-krotnie niższa dawka analogu PGF_{2 α} (50-75 μ g/zwierzę cloprostenolu) niż dawka sugerowana przez producenta i stosowana w praktyce lekarsko-weterynaryjnej wywołuje jeszcze regresję CL w środkowej i w późnej fazie lutealnej (19). Wykazaliśmy ponadto, że czułość CL krowy na luteolityczne działanie analogów PGF_{2 α} wzrasta gwałtownie pod koniec fazy lutealnej (19). Efekt działania PGF_{2 α} na CL *in vivo* (4, 19) i *in vitro* (3, 21, 26) jest zależny od fazy cyklu jajnikowego. Możliwy jest też wpływ analogów PGF_{2 α} na przepływ krwi przez jajnik (1, 2), co może pośrednio wpływać na funkcje oraz rozwój pęcherzyków jajnikowych i CL powstałych w efekcie synchronizacji rui. Należy więc zastanowić się, czy rekomendowane dawki analogów PGF_{2 α} , jak i stosowane modele synchronizacji rui (dwukrotne podawanie analogów PGF_{2 α} w odstępie 10-14-dniowym, bez uwzględnienia fazy rozwoju CL i pęcherzyków jajnikowych) są właściwe i zawsze gwarantują wysoką zapłodnialność w pierwszej rui po synchronizacji, późniejsze utrzymanie ciąży i w efekcie wysoką płodność i produkcyjność krów. W praktyce zaobserwowano bowiem, że w pierwszej rui po synchronizacji zapłodnialność jest stosunkowo niska; zdecydowanie lepsze wyniki uzyskano inseminując krowy w drugiej rui po synchronizacji (10). Można więc postawić pytanie, jaki wpływ ma zastosowanie analogów PGF_{2 α} na nowo powstające po synchronizacji CL i jego zdolność (status hormonalny) do utrzymania ciąży.

Badania Wierzchosia i wsp. (29) wykazały znaczne różnice w uwalnianiu hormonów (P4, estradiolu i androgenów) z komórek CL i pęcherzyków jajnikowych u owiec po synchronizacji rui za pomocą analogów PGF_{2 α} oraz po superowulacji, w porównaniu do zwierząt kontrolnych – ze spontanicznymi, fizjologicznymi cyklami płciowymi. Również Okada i wsp. (16) wykazali, że po superowulacji u owiec w następnym cyklu tworzą się „niekompletne” CL – *luteal hypoplasia*, ze znacznie krótszym okresem trwania i ograniczoną syntezą i wydzielaniem P4. Hansen i wsp. (7) porównał w swoich badaniach poziom wydzielania P4 w CL w naturalnym cyklu oraz zsynchronizowanym przy użyciu PGF_{2 α} . Badania te wykazały, że w CL powstałych po synchronizacji rui może dochodzić do zaburzenia steroidogenezy. Urbaniak i Jaśkowski (27) analizując wpływ stosowania preparatów stosowanych do synchronizacji rui na wyniki zacieleń u krów biorczyń zarodków sugerują, że zaburzenia wydzielania P4 u krów mogą być przyczyną wczesnej śmierci zarodkowej i w konsekwencji rzutować na niedostateczne wyniki zacieleń (9, 10). Potwierdzają to badania Shelton i wsp. (18), w których sugerowano obniżenie wrażliwości CL krów z nieomogą lutealną na czynniki luteotropowe. Ustalenie statusu fizjologicznego CL w 6.-8. dniu cyklu następującym po synchronizacji rui wydaje się niezwykle istotne dla rozwoju i implantacji zarodka szczególnie u jałówek/krów biorczyń zarodków. Mechanizm powstawania zaburzeń w wydzielaniu P4 w CL po synchronizacji rui może uwzględniać zmianę czułości/wrażliwości CL

na endogenne czynniki regulacyjne (LH, PGE₂) – tę hipotezę weryfikowano w badaniach własnych (23, 24). Zbadano wrażliwość CL powstałych po synchronizacji rui na czynniki luteotropowe (LH, PGE₂) (24) oraz określono wpływ różnych analogów PGF_{2α} na komórki CL i aktywność motoryczną tętnicy jajnikowej (23). W porównaniu do grupy kontrolnej (ruja spontaniczna) odnotowano słabszą odpowiedź CL na podawane czynniki luteotropowe (LH, PGE₂) u krów poddanych synchronizacji rui z zastosowaniem analogów PGF_{2α} (cloprostenol, luprositiol). Jednakże zastosowanie do synchronizacji rui preparatu PGF_{2α} (dinoprost) nie wywoływało tak znacznych objawów niedomogi lutealnej w porównaniu do działania analogów PGF_{2α}. Zbliżoną do fizjologicznej wrażliwość CL na stosowane stymulatory wykazano w CL krów po synchronizacji rui przy użyciu implantów gestagenowych – norgestomet (23, 24).

W drugiej części badań własnych określono wpływ różnych analogów/preparatów PGF_{2α} stosowanych w synchronizacji rui na steroidogenne komórki CL *in vitro*, analizując ponadto różnice w potencjale działania poszczególnych analogów/preparatów na komórki poprzez zmiany w wewnątrzkomórkowym wpływie jonów wapnia [Ca²⁺]_i (24). Naturalna PGF_{2α} i dinolitic, podobnie jak LH, stymulowały wydzielanie P4 z komórek. Nie wykazano wpływu cloprostenolu i luprositiolu na syntezę P4, wykazano za to bardzo silny wpływ cytotoksyczny tych preparatów na komórki CL krowy. Naturalna PGF_{2α} oraz wszystkie zastosowane jej preparaty/analogi (dinoprost, cloprostenol, luprositol) stymulowały uwalnianie jonów wapnia [Ca²⁺]_i w komórkach CL krowy – najsilniejszy efekt miał jednak luprositiol (23). Wykazany został również wpływ różnych analogów PGF_{2α} na aktywność motoryczną tętnicy jajnikowej, co pośrednio pozwoliło określić wpływ analogów PGF_{2α} na funkcje jajnika (tworzącego się pęcherzyka) poprzez ewentualne zmiany w przepływie krwi (23). Najsilniejszy efekt kurczący na tętnicę jajnikową wykazano po podaniu luprositiolu (23). Tylko dinoprost okazał się być preparatem, którego działanie jest analogiczne do naturalnej PGF_{2α}. Cloprostenol, a szczególnie luprositiol, są analogami znacznie silniej i odmiennie działającymi od naturalnej PGF_{2α} na komórki/tkanki układu rodowego krowy.

Podsumowanie

Synchronizacja rui, w zależności od metody i rodzaju stosowanego preparatu (szczególnie zastosowanie analogów PGF_{2α}), może obniżać wrażliwość CL na endogenne czynniki luteotropowe, co może być przyczyną niedomogi lutealnej. Obniżone wydzielanie P4 w CL krów po hormonalnej ingerencji może być przyczyną niedostatecznej osłony rozwijającego się zarodka przez produkty CL w pierwszych, krytycznych fazach ciąży, a przez to doprowadzać do wczesnej śmierci zarodkowej. Jednakże po synchronizacji rui z zastosowaniem implantów gestagenowych lub preparatów naturalnej PGF_{2α} (np. dinoprost) na jajniku tworzą się CL najbardziej funkcjonalnie zbliżone do powstających spontanicznie, w naturalnych cyklach jajnikowych. Obok stosowania implantów/wkładów gestagenowych (CIDR, PRID, Crestar) zasadne wydaje się też stosowanie złożonych metod synchronizacji rui (np. OVSYCH), łączących podawanie analogów/preparatów

PGF_{2α} z preparatami/analogami hormonów gonadotropowych (18, 25, 27). Działanie luteolityczne analogów/preparatów PGF_{2α} zostaje wtedy wzbogacone o ochronne/stymulujące działanie hormonów tropowych na dojrzewający i owulujący pęcherzyk, co może później wpływać pozytywnie na formujące się po owulacji CL.

Piśmiennictwo

1. Acosta T. J., Miyamoto A.: Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim. Reprod. Sci.* 2004, 82, 127-140.
2. Acosta T. J., Yoshizawa N., Ohtani M., Miyamoto A.: Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after PGF_{2α} injection in the cow. *Biol. Reprod.* 2002, 66, 651-658.
3. Bah M. M., Acosta T. J., Pilawski W., Deptula K., Okuda K., Skarżyński D. J.: Role of intraluteal prostaglandin F_{2α}, progesterone and oxytocin in basal and pulsatile progesterone release from developing bovine corpus luteum. *Prostaglandins Other Lipid. Med.* 2006, 79, 218-229.
4. Beal W. E., Milvae R. A., Hansel W.: Oestrous cycle length and plasma P4 concentrations following administration of PGF_{2α} early in the bovine oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 1980, 59, 393-396.
5. Bielański A., Tischner M.: *Biotechnologia rozrodu zwierząt*. PAU, Kraków 1992, 117-136.
6. Hansel W., Dowd J. P.: New concepts of the control of CL function. *J. Reprod. Fert.* 1986, 78, 755-768.
7. Hansen T. R., Randel R. D., Segerson E. C. Jr., Rutter L. M., Harms P. G.: Corpus luteum function following spontaneous or PGF-induced estrus in Brahman cows and heifers. *J. Anim. Sci.* 1987, 65, 524-533.
8. Humblot P.: The frequency and variation of embryonic mortality, and the use of pregnancy specific proteins to monitor pregnancy failure in ruminants. *Reprod. Dom. Anim.* 1999, 6, 19-27.
9. Jaśkowski J. M.: Superowulacja u krów – rodzaje preparatów gonadotropowych i sposoby ich podawania. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 347-349.
10. Jaśkowski J. M., Urbaniak K.: Wpływ ingerencji hormonalnych na skuteczność zacielen u biorczyń zarodków. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 705-708.
11. Lafri M., Ponsari C., Nibart M., Durand M., Morel A., Jeanguyot N., Badinand F., De Mardi K., Humblot P.: Influence of CIDR treatment during superovulation on embryo production and hormonal patterns in cattle. *Theriogenol.* 2002, 58, 1141-1151.
12. Lei Z. M., Chegini N., Rao Ch. V.: Quantitative cell composition of human and bovine CL from various reproductive states. *Biol. Reprod.* 1991, 44, 1148-1156.
13. Lopez-Gatius F.: Effects of cloprostenol, human chorionic gonadotropin and estradiol benzoate treatment on estrus synchronization in dairy cows. *Theriogenol.* 1989, 32, 185-192.
14. McCracken J. A., Custer E. E., Lamsa J. C.: Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 1999, 79, 263-323.
15. Meidan R., Levy N., Kishiouk T., Podlowsky L., Rusiansky M., Klipper E.: The yin and yang of corpus luteum-derived endothelial cells: Balancing life and death. *Dom. Ani. Endocrin.* 2005, 29, 318-328.
16. Okada A., Kamada S., Jeon C. W., Miyamoto A., Fukus Y.: Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. *J. Reprod. Develop.* 2000, 46, 397-402.
17. Pate J. L., Keyes P.: Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? *Reproduction* 2001, 122, 665-676.
18. Shelton K., De Abreu G., Hunter M. G., Parkinson T. J., Lamming G. E.: Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. *J. Reprod. Fert.* 1990, 90, 1-10.
19. Skarżyński D. J., Bogacki M., Kotwica J.: Changes in ovarian oxytocin secretion as an indicator of corpus luteum response to PGF_{2α}. *Theriogenol.* 1997, 48, 733-742.
20. Skarżyński D. J., Bogacki M., Kotwica J.: Involvement of ovarian steroids in basal and oxytocin-stimulated PGF_{2α} secretion from bovine endometrium *in vitro*. *Theriogenol.* 1999, 52, 385-397.
21. Skarżyński D. J., Jaroszewski J. J., Okuda K.: Luteotropic mechanisms in the bovine corpus luteum: role of oxytocin, prostaglandin F_{2α}, progesterone and noradrenaline. *J. Reprod. Develop.* 2001, 47, 125-137.
22. Skarżyński D. J., Jaroszewski J. J., Okuda K.: Role of tumor necrosis factor-α and nitric oxide in luteolysis in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2005, 29, 340-346.
23. Skarżyński D. J., Pilawski W., Bah M. M.: Analogues of prostaglandin (PG)F_{2α} regulate the function of the bovine corpus luteum (CL) differently. *Reprod. Dom. Anim.* 2006, 41, 356 (P187).
24. Skarżyński D. J., Pilawski W., Wocławek-Potocka I., Bah M. M.: *In vitro* assessment of the corpus luteum (CL) function in cattle following different estrus synchronization protocols. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2003, 26 (Suppl 1), 189.
25. Thacher W. W., Moreira F., Pancarci S. M., Bartolome J. A., Santos J. E. P.: Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Dom. Animal. Endocrinol.* 2002, 23, 243-254.
26. Tsai S. J., Wilbank M. C.: PGF_{2α} regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.* 1998, 58, 346-352.
27. Urbaniak K., Jaśkowski J. M.: Wpływ CIDR-B lub hCG na wyniki zacielen u krów biorczyń zarodków. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 793-797.
28. Voughan L., Fitzpatrick E., Boland M. P., Roche J. F.: A histological study of CL from superovulated beef heifers. *Animal. Reprod. Sci.* 1996, 43, 1-14.
29. Wierżchoś E., Gregoraszcuk E., Stokłowska S.: Follicles and CL function following spontaneous and PGF_{2α} induced estrus and superovulation in ewes. *Endocr. Regul.* 1995, 29, 121-126.
30. Zbylut J., Jaśkowski J. M.: Współczesne metody synchronizacji rui u krów mięsnych. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 97-100.

Adres autora: prof. dr hab. Dariusz Jan Skarżyński, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn; e-mail: skadar@pan.olsztyn.pl