

ROZRÓD ZWIERZĄT

EDWARD WIERZCHOŚ, MARIAN TISCHNER,
ANTONIO LAURIA*, MARGHERITA MAFFII**

Wywoływanie superowulacji u owiec przy użyciu preparatu gonadotropowego o określonej proporcji FSH do LH

Katedra Rozrodu Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR,

Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

* Instituto di Anatomia degli Animali Domestici con Istologia ed Embriologia
dell'Università di Milano, Via Celoria, 10, 20133 Milano,

** Via Ludovico 35, 00187 Roma, Włochy

Summary

Materiał i metody

Induction of superovulation in sheep using gonadotrophins with a designated ratio of FSH to LH

The purpose of the experiments was to evaluate the effectiveness of superovulation induction in sheep by the use of porcine pituitary gonadotrophins with a defined FSH:LH ratio at determined dosages. The drug Pluset (Serono, Italy) was administered to a total dose of 56 Polish Mountain sheep in dosages of 250 iu (18 ewes), 500 iu (19 ewes) and 750 iu (19 ewes). Oestrus and ovulation were synchronized by means of a 14 day application of intravaginal sponges (Chronogest, Intervet) containing 30 mg PGA. Pluset was administered intramuscularly twice a day for 3 days in diminishing doses.

The application of Pluset provoked superovulation in 75% of ewes. The ewes injected 250 iu produced an average of 7.6 corpora lutea in their ovaries and 6.3 embryos were recovered of which 4.3 were suitable for transfer. When the ewes received 500 iu of Pluset they had 8.5 corpora lutea and 7.5 embryos, 4.1 of which could be transferred. At a dosage of 750 iu 8.3 corpora lutea were observed and 7.6 embryos could be recovered of which an average 5.2 were normal ($p \geq 0.05$).

Wywoływanie superowulacji stanowi jedno z podstawowych ogniw w programie transplantacji zarodków u zwierząt. Po raz pierwszy do stymulacji wzrostu dodatkowych pęcherzyków jajnikowych u owiec zastosowano gonadotropiny surowicy żrebnych klaczy (PMSG) (7). Po iniekcji tego hormonu uzyskuje się jednak bardzo znaczne wahania zarówno w liczbie owulujących pęcherzyków, jak i jakości zarodków. Dlatego też obecnie coraz szersze zastosowanie znajdują ekstrakty gonadotropiny FSH i LH otrzymane z przysadek koni, owiec i świń. Jednakże hormony te, w odróżnieniu od PMSG, mają krótszy okres półtrwania we krwi i dla otrzymania pożądanego efektu muszą być podawane przez 35 kolejnych dni (9). Bardzo często poszczególne preparaty lub serie tych preparatów charakteryzują się różną proporcją FSH:LH, co również wywiera niekorzystny wpływ na wyniki superowulacji.

Ostatnio uzyskano preparat gonadotropowy z wysoko oczyszczonych wyciągów przysadek mózgowych świń, zawierający FSH:LH w proporcji 1:1 (Pluset*). Celem przeprowadzonych badań była wstępna ocena skuteczności i wielkości dawki tego preparatu do wywołania superowulacji u owiec.

* Producent SERONO, Włochy. Badania wykonano w ramach problemu CPBR 20.10.

Badania przeprowadzono w sezonie rozrodczym 1990 r. na 50 maciorkach rasy polska owca górska, w wieku około 3 lat i masie ciała 45–55 kg. Maciorki w okresie poprzedzającym doświadczenie wydały zdrowe potomstwo, a następnie wykazywały regularny cykl rujowy. Przez cały czas przebywały w jednakowych warunkach. W okresie letnim codziennie korzystały z pastwiska oraz otrzymywały pasze treściwą w ilości około 0,3 kg/sztukę.

Synchronizację rui przeprowadzono przy użyciu gąbek dopochwowych (Chronogest, Intervet) zawierających 30 mg FGA, które zakładano na 14 dni. W dniu wprowadzenia gąbek dokonywano oceny jajników przy użyciu laparoskopu. Superowulację wywoływano preparatem „Pluset”, który podawano domięśniowo 2× dziennie w zmniejszających się dawkach przez 3 dni, tj. 24 godz. przed wyjęciem gąbek. W dniu wyjęcia i 24 godz. po usunięciu gąbek. Maciorki grupy I — 18 szt., otrzymywały gonadotropinę w ilości 250 I.U. FSH i LH, II — 19 szt., 500 I.U. FSH i LH oraz III — 19 szt., 750 I.U. FSH i LH, (tab. 1).

Ruję wykrywano przy pomocy tryka próbnika. Krycie macierek trykami o sprawdzonej płodności rozpoczynano w dniu wystąpienia rui i powtarzano tym samym trykiem w odstępach co 12 godzin, aż do zakończenia rui. Ocenę stopnia superowulacji przeprowadzano na podstawie bezpośrednich oględzin jajników oraz liczby zarodków pozyskiwanych metodą operacyjną w 6 dniu po zakończeniu rui. Określano również liczbę nie pękniętych pęcherzyków (> 4 mm), cyst pęcherzykowych i lutealnych.

Krew do oznaczeń poziomu progesteronu pobierano od wszystkich macierek dwukrotnie, tj. w dniu założenia gąbek i w dniu pozyskiwania zarodków. Progesteron oznaczano metodą radioimmunologiczną podaną przez Abrahama i wsp. (1) używając przeciwciał wyprodukowanych przez firmę Amersham.

Całość uzyskanych wyników poddano analizie statystycznej. Porównano średnią liczbę ciałek żółtych i liczbę uzyskanych zarodków w poszczególnych grupach oraz obliczono istotność różnic przy użyciu testu t-Studenta.

Wyniki i omówienie

W dniu założenia gąbek dopochwowych stwierdzono u 42 macierek pojedyncze i u 4 podwójne ciała żółte. Pozostałe miały na jajnikach pęcherzyki w różnej fazie wzrostu lub zanikające ciała żółte. Ruj wystąpiła 20 godzin po usunięciu gąbek u 48 (86%) macierek, a po 40 godzinach u 8 (14%) macierek i trwała 24 godziny u 3 (5%), 48 godzin u 13 (23%), 72 godziny u 39 (70%) i 96 godzin u 1 (2%) maciorki. Wielkość dawki wprowadzanej gonadotropiny nie miała wpływu na czas wystąpienia i trwania rui.

Zestawienie wyników superowulacji podano w tabeli 2. Zastosowanie preparatu „Pluset” w dawkach 250 I.U., 500 I.U. i 750 I.U. spowodowało wystąpienie superowulacji u 42 szt., tj. 75% macierek. U pozostałych 14 szt. (25%) stwierdzono tylko 1–2 ciała żółte.

U macierek, które otrzymywały dawkę 250 I.U. stwierdzono średnio 7,6 ciałek żółtych i 0,3 nie pęknię-

Tab. 1. Schemat podawania różnych dawek preparatu „Pluset” do wywołania superowulacji u owiec

Grupa owiec	Dawka	Czas	24 godz. przed wyjęciem gąbek	W dniu założenia gąbek	24 godz. po wyjęciu gąbek
I	250 IU	8 ⁰⁰ i 20 ⁰⁰	62,5 IU	41,6 IU	20,8 IU
II	500 IU	„	125,0 IU	83,2 IU	41,6 IU
III	750 IU	„	187,5 IU	125,0 IU	62,5 IU

Tab. 2. Wyniki superowulacji u owiec rasy polska owca górską po podaniu różnych dawek preparatu „Pluset”

Oznaczone parametry	Dawka preparatu (I. U.)		
	250	500	750
Liczba owiec	19	19	18
Liczba: owiec reagujących superowulacją (%): ciałek żółtych (ogółem)	16 (84)	13 (68)	13 (72)
$\bar{x} \pm$	7,6 \pm 3,1 ^a	8,5 \pm 4,0 ^a	8,3 \pm 5,2 ^a
cyst i pęcherzyków (ogółem)	16	18	2
$\bar{x} \pm$	0,3 \pm 1,0 ^a	1,3 \pm 2,8 ^a	0,1 \pm 0,5 ^a
zarodków i komórek jajowych (ogółem)	101	100	99
$\bar{x} \pm$	6,3 \pm 2,4 ^a	7,6 \pm 4,1 ^b	7,6 \pm 5,5 ^b
zarodków (ogółem)	94	74	79
normalnych $\bar{x} \pm$	4,3 \pm 3,0 ^a	4,1 \pm 2,9 ^a	5,2 \pm 5,1 ^a
zdegenerow. $\bar{x} \pm$	1,5 \pm 2,6 ^a	1,5 \pm 1,9 ^a	0,8 \pm 1,4 ^b
komórek jajowych (ogółem)	7	26	20
średnio/ $\bar{x} \pm$	0,4 \pm 0,5 ^a	2,0 \pm 2,9 ^b	1,5 \pm 5,2 ^c
Poziom P4: ng/ml $\bar{x} \pm$ w dniu: wyjęcia gąbek:	0,6 \pm 0,7 ^a	0,7 \pm 0,7 ^a	0,7 \pm 1,2 ^a
pozyskiwania zarodków:	4,6 - 3,5 ^a	5,7 \pm 4,7 ^a	6,1 \pm 5,0 ^a

Objaśnienie: a, b, c — średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p < 0,05$.

tych pęcherzyków. Uzyskano: 6,3 zarodków i komórek jajowych, z których 4,3 nadawało się do transplantacji, 1,5 było zdegenerowanych, a 0,4 komórek jajowych było nie zapłodnionych. W grupie macierek otrzymujących 500 I.U. gonadotropiny stwierdzono przeciętnie 8,5 ciałek żółtych, 1,3 nie pękniętych pęcherzyków oraz wypłukano: 7,6 zarodków i komórek jajowych, z których 4,1 nadawało się do transplantacji, 1,5 było zdegenerowanych, a 2,0 komórki były nie zapłodnione. W ostatniej grupie macierek otrzymujących 750 I.U. gonadotropiny stwierdzono na jajnikach średnio 8,3 ciałek żółtych i 0,1 nie pękniętych pęcherzyków. Uzyskano 7,6 zarodków i komórek jajowych, z których 5,2 wykazywało prawidłową budowę, 0,8 zarodków było zdegenerowanych, a 1,5 komórki były nie zapłodnione.

W dniu założenia gąbek dopochwowych poziom progesteronu u macierek, u których stwierdzono ciałka żółte wynosił średnio 1,0 ng/ml i u pozostałych 0,16 ng/ml. Średni poziom progesteronu w plazmie krwi pobranej w 6 dniu po owulacji wynosił odpowiednio u macierek grupy I — 4,5 ng/ml, grupy II — 5,6 ng/ml i grupy III — 6,1 ng/ml.

Preparaty gonadotropowe FSH i LH znajdują coraz częściej zastosowanie do wywołania superowulacji u zwierząt. W odróżnieniu od PMSG wykazują one bowiem korzystniejsze oddziaływanie zarówno na wzrost pęcherzyków, mechanizm dojrzewania oocytów, jak i sam przebieg owulacji (6). Wielu autorów zwraca jednak uwagę na potrzebę zachowania odpowiednich proporcji FSH do LH, która wraz ze zróżnicowaną aktyw-

nością FSH-LH w poszczególnych preparatach może obniżać skuteczność stymulacji jajników (4, 9, 10). W przeprowadzonym doświadczeniu z zastosowaniem preparatu „Pluset”, w których proporcja FSH do LH wynosi 1:1, uzyskiwano przeciętnie od maciorki po 7 zarodków z wahaniami od 3—20, z których 5 z wahaniami od 1—20 nadawało się do transplantacji. Uwzględniając genetycznie uwarunkowaną niską plenność rasy owiec polska owca górską, na której przeprowadzono doświadczenie, otrzymane wyniki należy uznać za zadowalające. W podobnym bowiem doświadczeniu z zastosowaniem wyciągu gonadotropiny z przysadek świn, w których proporcja FSH:LH = 8, Lopez Sebastian i wsp. (5) uzyskali średnio od maciorki po 4,2 zarodki nadające się do transplantacji. Należy przy tym zaznaczyć, że owce ras niskoplennych wymagają podania większej dawki hormonów w przeciwieństwie do plennych, wykazujących większą wrażliwość na stymulację hormonalną. Na przykład od wysokoplennych ras owiec Booroola uzyskiwano po 12 owulacji, a tylko po 7 od maciorek rasy merynos (2, 3, 8).

W przeprowadzonym doświadczeniu niezależnie od wielkości dawki gonadotropiny „Pluset” uzyskano superowulację na podobnym poziomie ($p < 0,05$). Także różnice w liczbie wypłukanych zarodków we wszystkich grupach owiec były niewielkie (tab. 2). Wydaje się zatem, że do wykorzystania w praktyce można proponować dawkę 250 I.U., przy której koszt przygotowania owiec do superowulacji jest najniższy.

Piśmiennictwo

1. Abraham G. E., Swerdloff R., Tuchlinsky O., Odell W. D.: J. Clin. Endocrinol. 32, 619, 1971.
2. Bindon B. M., Piper L. R., Cabill L. P., Driancourt M. A., Shea O.: Theriogenology, 25, 53 1986.
3. Boundy T., Clarkson M. J., Vinter A. C.: Vet. Rec. 117, 379, 1985.
4. Lindsell C. E., Rajkumar H., Manning A. W., Emery S. K., Mapletoft R. J., Murphy B. D.: Theriogenology 25, 167, 1986.
5. Lopez Sebastian A., Cogne Y., Cocero M. J., De La Fuente Y., Poulin N.: Theriogenology 34, 175, 1990.
6. Morr R. M., Krup T. A. M., Green D.: Theriogenology 21, 103, 1981.
7. Łoginowa N. W., Łopyrin A. I.: Probl. Životn. 10, 114, 1938.
8. Quirke J. F., Meyer H. H., Lahtou-Kassi A., Harrahan J. P., Bradford G. E., Stabenfeldt G. H.: J. Reprod. Fert. 81, 309, 1987.
9. Torres S., Cogne Y., Colas G.: Theriogenology 27, 407, 1987.
10. Wright R. W., Bondioli K., Grammer J.: J. Anim. Sci. 1, 115, 1981.

Adres autora: doc. dr hab. Edward Wierchoś, 32-083 Balice k.Krakowa 1/18

NICHOLAS R. A. J., CULLEN G. A.: Opracowanie i wykorzystanie odczynu ELISA do wykrywania przeciwciał dla Salmonella enteritidis w stadach kurcząt. (Development and application of an ELISA for detecting antibodies for Salmonella enteritidis in chicken flocks). Vet. Rec. 128, 74—76, 1991 (4)

Wprowadzono odczyn ELISA do wykrywania przeciwciał dla Salmonella enteritidis w surowicach drobiu. Porównano także wyniki tego odczynu z użyciem LPS lub antygeny ekstrahowanego na gorąco (HE) z wynikami otrzymanymi w szybkim odczynie płytowym (RST), odczynie mikroaglutynacji (MT) i w odczynie MAG. W stadzie kurcząt SPF zakażonych doświadczalnie S. enteritidis występowała dużego stopnia korelacja między wynikami uzyskanymi we wszystkich odczynach. Jednakże wcześniej przeciwciała były wykrywalne w odczynie MAG i MT. Także najwyższe miana przeciwciał notowano w tych dwóch odczynach. Stosując LPS wykazano obecność przeciwciał wcześniej niżeli stosując HE. W ELISA notowano odczyn krzyżowy między S. enteritidis i S. typhimurium, przy czym miana w reakcjach homologicznych były wyższe. Surowice dla S. montevideo i S. senftenberg reagowały słabo z S. enteritidis w odczynie ELISA. Badania przeprowadzone w dwóch stadach wykazały, że stosując HE-ELISA lub MAG wykrywa się przeciwciała prawie u wszystkich ptaków, LPS-ELISA u ponad 60%. W tym stadzie S. enteritidis wyosobniono z 25% ptaków. W drugim stadzie wolnym od zakażeń wszystkie testy wypadły ujemnie.