

Pęcherzyk dominujący a wyniki superowulacji u krów

Pracownia Biotechniki Rozrodu Zwierząt Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
Oddział w Bydgoszczy, Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Zjawiskiem nie do końca poznanym i budzącym duże zainteresowanie jest zmienność wyników superowulacji u krów dawczyń zarodków. Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że niemal 25% krów poddawanych superowulacji nie reaguje, bądź reaguje w niedostatecznym stopniu na egzogenne gonadotropiny (4, 27).

Dużą zmienność superowulacji tłumaczono dotychczas przede wszystkim wpływem czynników zewnętrznych, głównie rodzajem podawanej gonadotropiny oraz przyjętym sposobem jej aplikacji (14, 17). Ostatnio, coraz częściej podkreślane jest znaczenie czynników natury wewnętrznej, tj. stanu funkcjonalnego. Wydaje się, że obok prawidłowego rozwoju ciała żółtego podczas cyklu rujowego, istotne znaczenie ma dynamika fal pęcherzyków międzyrujowych. Monitorowanie ich ewolucji stało się możliwe wraz z wprowadzeniem precyzyjnych technik obrazowania struktur jajnikowych – głównie ultrasonografii. Badania echosonograficzne wykazały, że podczas fizjologicznego cyklu rujowego u krów pojawiają się dwie lub trzy fale rozwoju pęcherzyków jajnikowych (6, 18, 23). Fale charakteryzuje występowanie licznych pęcherzyków, z których jeden z nie do końca poznanych powodów ulega selekcji i dynamicznemu rozwojowi. Pęcherzyk ten – nazywany dominującym – hamuje, poprzez wytwarzanie określonych substancji (inhibina, hormony estrogenne) rozwój pozostałych pęcherzyków podrzędnych lub przyspiesza ich regresję. W bardziej szczegółowych badaniach ustalono, że pęcherzyki podrzędne nie różnicują się przede wszystkim w okresie, w którym pęcherzyk dominujący znajduje się w fazie intensywnego wzrostu (15). Podczas cyklu rujowego cechującego się występowaniem dwóch fal wzrostu pęcherzyków jajnikowych, pęcherzyki dominujące pierwszej fali można ultrasonograficznie rozróżnić już około 3 dnia cyklu (dzień zerowy = dzień rui). Osiąga on maksimum około 6–7 dnia, pozostaje w fazie statycznej do około 8–12 dnia, by w końcu ulec regresji około 15 dnia. Druga fala pęcherzykowa pojawia się około 9 dnia cyklu i kończy owulacją pęcherzyka dominującego około 20–21 dnia, podczas gdy pęcherzyki podrzędne ulegają stopniowej regresji.

W nowszych badaniach nad superowulacją u krów oceniano czy obecność pęcherzyka dominującego może oddziaływać ujemnie na rozwój pęcherzyków jajnikowych zapoczątkowany podaniem egzogennego FSH. Ze wstępnych obserwacji wynika, że pęcherzyk dominujący hamuje nie tylko reakcję krów na zaaplikowane hormony ale i proces dojrzewania rosnących pęcherzyków jajnikowych (2, 10, 12, 13). Przyjmując za pęcherzyk dominujący twór o średnicy powyżej 9 mm, który utrzymywał się na jajnikach przez kilka dni Guilbault i wsp. (10) ustalili, że liczba owulujących pęcherzyków po podaniu FSH była istotnie niższa niż u krów bez widocznego pęcherzyka. Jednocześnie u tych ostatnich większa była liczba ciałek żółtych stwierdzanych w 7 dniu po superowulowanej rui, jak i koncentracja osoczowego progesteronu. Podobne wyniki uzyskiwał Huh-tinen i wsp. (12), którzy posługiwali się dwoma zbliżonymi kryteriami definicji pęcherzyka dominującego. W obu przypadkach obecności pęcherzyka towarzyszyły istotnie gorsze wyniki produkcji zarodków. Jednocześnie autorzy ci ustalili, że częstość występowania pęcherzyka dominującego była najniższa między 10 a 12 dniem cyklu rujowego. Jak ustalono, pęcherzyk nadrzędny w znaczący sposób zmniejszał liczbę ulegających atrezji pęcherzyków o średnicy 4,5 do 7,9 mm oraz obniżał zdolność do sekrecji estradiolu przez pęcherzyki większe niż 8 mm (8, 22). Interesujących rezultatów dostarczają nowsze badania Lussier i wsp. (17), z których wynika, że efekt superowulacji w większym stopniu zależy od obecności pęcherzyka dominującego niż rodzaju egzogennego preparatu gonadotropowego. Wprawdzie przy nieobecności pęcherzyka dominującego podanie wysokooczyszczonego preparatu FSH – Ovaset gwarantowało lepsze wyniki produkcji zarodków niż FSH-P, jednak u krów z pęcherzykiem dominującym efektywność superowulacji, niezależnie od podawanego preparatu była niska.

Dotychczasowe badania jasno wskazują, że superowulację należy rozpoczynać w okresie poprzedzającym selekcję pęcherzyka dominującego tzn. przed wyrzutem FSH i pojawieniem się fali pęcherzykowej (3).

W nielicznych badaniach, w których nie stwierdzano istotnego wpływu pęcherzyka dominującego na wyniki superowulacji albo definiowano pęcherzyk dominujący w odmienny sposób albo opierano obserwacje na jednokrotnym badaniu ultrasonograficznym, które nie jest dostatecznie miarodajne dla ustalenia stanu morfologicznego pęcherzyka (26). Dominacja morfologiczna ustalana wyłącznie w oparciu o kryterium wielkości nie musi być jednoznaczna z dominacją funkcjonalną pęcherzyka.

Jednym ze sposobów kontroli rozwoju fal pęcherzyków jajnikowych oraz pęcherzyka dominującego a poprzez to oddziaływania na wyniki superowulacji u krów jest podawanie choriogonadotropiny kosmówkowej (hCG). Badania te zapoczątkowały obserwacje Breuela i wsp. (5), który podawał hCG krowom w celu poprawy wyników zacielen. Dwukrotna domięśniowa aplikacja 1000 IU hCG w dniu rui oraz w 7 dniu po rui gwarantowała wyższy wskaźnik zacielen. Rajamahendran i wsp. (19) z kolei wykorzystywali hCG do kontroli pęcherzyka dominującego u krów poddawanych superowulacji aplikując hormon w 7 dniu cyklu rujowego. W ten sposób podane hCG prowadzi do owulacji pęcherzyka nadrzędnego i wytworzenia dodatkowych, aktywnych ciałek żółtych, czego dowodem jest wyższy niż u nie leczonych krów poziom progesteronu we krwi. Niestety, pierwsze badania, w których hCG podawano krowom poddawanych superowulacji nie okazały się zadowalające. Podanie gonadotropiny nie wywierało korzystnego wpływu zarówno na liczbę pęcherzyków jajnikowych oraz owulacji podczas rui, jak i na liczbę zarodków, oocytów oraz zarodków przydatnych do transferu (20).

Nie dały oczekiwanych rezultatów w odniesieniu do wyniku superowulacji próby indukowania rozwoju pęcherzyków jajnikowych poprzez podanie około 4 dnia cyklu rujowego wstępnej dawki FSH, a następnie po upływie 4–5 dni serii iniekcji tego hormonu. Dodatkowa aplikacja gonadotropiny przysadkowej miała naśladować naturalną sekrecję endogennego hormonu (9). Podobnie nie sprawdziły się w praktyce metody indukowania owulacji podczas rui następującej po superstymulacji. Jedno lub dwukrotne podanie hormonu GnRH w odstępach 36 i 60 godzin po iniekcji prostaglandyny nie miało większego wpływu na wyniki produkcji zarodków u krów dawczyń (25).

Do przedwczesnej owulacji pęcherzyka dominującego można doprowadzić podając preparaty FSH starszych generacji, które zawierają w swoim składzie, wskutek niedostatecznego oczyszczenia, duże ilości LH. Wytworzone dodatkowe ciała żółte jednak z reguły nie reagują na luteolityczną dawkę prostaglandyny podawanej dla indukcji rui po superowulacji (24). Doświadczenia powyższe wskazują także, iż za zmienność w zakresie superowulacji odpowiedzialna jest nie tylko obecność pęcherzyka dominującego, ale i inne czynniki wewnętrzne. Rów-

nocześnie według niektórych autorów, nie należy ignorować znaczenia drobnych pęcherzyków antralnych, jako tych, które mogą zacięrać korzystny efekt owulacji pęcherzyka dominującego po podaniu hCG lub GnRH (24).

Dla kontroli rozwoju pęcherzyka dominującego oraz indukcji kolejnej fali pęcherzyków jajnikowych próbowano wykorzystywać estradiol 17 beta. Badania wynikały ze znajomości supresyjnego oddziaływania estrogenów na follikulogenezę. Estradiol, hamując wzrost pęcherzyka dominującego skraca okres jego funkcjonalnej dominacji. Niezależnie czy iniekcja estradiolu nastąpiła w fazie wzrostu, spoczynku czy regresji pęcherzyka dominującego, kolejna fala pęcherzyków pojawiała się w jednakowym okresie około 4,3 dni (3, 24).

Późniejsze badania wykazały, że lepsze możliwości kontroli rozwoju pierwszej fali pęcherzykowej a poprzez to spontaniczne wystąpienie drugiej fali w ściśle określonym terminie uzyskuje się aplikując progestageny wraz z estradiolem. W tym celu zakłada się implant progestagenu w dniu rui a następnie podaje estradiol. Superowulację rozpoczynało w 5 dniu cyklu rujowego. Wyniki wskazują, że ten model terapii może skutecznie indukować pojawianie się nowej fali pęcherzykowej. Równocześnie liczba pozyskanych zarodków nie różni się od pozyskiwanej od krów poddawanych superowulacji od 8 dnia cyklu rujowego (3, 21).

W kolejnych badaniach oceniano, czy podawanie progesteronu i estradiolu 17 beta może synchronizować pojawianie się fali pęcherzyków w różnych stadiach dominacji pęcherzyka. Badanym zwierzętom podawano implant progestagenu w 2, 5 i 8 dniu cyklu rujowego, a dzień później stosowano iniekcję estradiolu. Ten rodzaj postępowania spowodował wcześniejsze pojawienie się nowej fali pęcherzykowej u krów leczonych estradiolem w 3 dniu cyklu rujowego oraz opóźnienie pojawienia się kolejnej fali pęcherzyków jajnikowych u zwierząt leczonych estradiolem w 6 dniu cyklu. Leczenie w 9 dniu przyspieszało pojawienie się trzeciej fali pęcherzykowej. Badania te okazały się przydatne w superowulacji. Podawano w nich progesteron wraz z estradiolem krowom dawczyniom w nieznanym stadium cyklu rujowego. Po usunięciu implantu rozpoczynało superowulację. Druga grupa krów otrzymała wyłącznie progestagen, w trzeciej superowulację rozpoczynało tradycyjnie między 8 a 12 dniem cyklu rujowego. Nie stwierdzono istotnych różnic w odniesieniu do liczby produkowanych zarodków, tym niemniej liczba zapłodnionych komórek była blisko 20% wyższa w grupie krów poddawanej kombinowanemu stosowaniu hormonów (3).

Kontynuacją tych badań były doświadczenia, w których próbowano ocenić, jaki wpływ na wyniki superowulacji może mieć dopochwowe wprowadzenie spirali PRID, zawierającej progesteron oraz ben-

zoesan estradiolu, w różnych fazach cyklu rujowego (7). Niekorzystny wpływ w odniesieniu do produkcji wartościowych zarodków uzyskano podając dopochowo PRID we wczesnej fazie lutealnej cyklu rujowego. Fakt ten tłumaczono obecnością pęcherzyków znajdujących się pod presją pęcherzyka dominującego i oocytów ulegających degeneracji w momencie rozpoczynania superowulacji. Niska jakość zarodków u jałowic, którym spiralę wprowadzano w różnych stadiach cyklu rujowego tłumaczona jest obecnością pęcherzyków w różnych stadiach rozwojowych w momencie rozpoczynania superowulacji.

Podobne możliwości kontroli pęcherzyka dominującego oraz pojawiania się fal pęcherzykowych zapewnia usunięcie pęcherzyka dominującego, jego kauteryzacja lub aspiracja wypełniającego wnętrze pęcherzyka płynu. Pierwsze korzystne wyniki superowulacji dzień po manualnym usunięciu pęcherzyka dominującego przedstawił Hahn (11). Opierając się na jego pionierskich badaniach stosuje się obecnie w celu indukcji oraz synchronizacji pojawiania się fal pęcherzykowych aspirację płynu pęcherzykowego pod kontrolą głowicy ultrasonograficznej. Z pierwszych badań przeprowadzonych przez Adamsa i wsp. (1, 3), którzy stosowali powyższą metodę do indukowania fal pęcherzykowych w różnych stadiach cyklu rujowego wynika, że fala pęcherzyków jajnikowych pojawia się dwa dni wcześniej po usunięciu pęcherzyków (< 5 mm) między 0 a 3 dniem cyklu rujowego oraz jeden dzień później po usunięciu pęcherzyków między 3 a 6 dniem (1). Owulacja następuje u 81% zwierząt w ciągu 3 do 5 dni, podczas gdy u jałowic kontrolnych zaledwie u 47%. Jednocześnie w dalszych badaniach ustalono, że efektywność superowulacji jest podobna do używanej po użyciu terapii progesteronowo estradiolowej. Korzystny efekt usunięcia pęcherzyka dominującego na 2 dni przed startem superowulacji można w pewnym zakresie wzmagać łącząc ów zabieg z domięśniową iniekcją 200 µg GnRH (16).

Powyższe badania wykazały, że stosowanie określonych modeli hormonalnych umożliwia rezygnację z dokładnej obserwacji rui u krów dawczyń zarodków w okresie poprzedzającym superowulację oraz zapewnia wrażliwość pęcherzyków na egzogenne gonadotropiny. Równocześnie wykazano, że indukowane pojawianie się fal pęcherzykowych, niezależnie od stadium cyklu rujowego warunkuje pełną odpowiedź superowulacyjną krów, która jest porównywalna z tradycyjnymi modelami przeprowadzania superstymulacji.

Piśmiennictwo

1. Adams G. P., Matteri R. L., Kastelic J. P., Ko J. C. H., Ginther O. J.: J. Reprod. Fert. 94, 177, 1992.
2. Adams G. P., Kot K., Smith C. A., Ginther O. J.: Can. J. Anim. Sci. 73, 267, 1993.

3. Adams G. P.: Theriogenology 41, 19-24, 1994.
4. Bielański A., Tischner M.: Biotechnologia rozrodu zwierząt gospodarskich, Universitas, Kraków 1993.
5. Breuel K. F., Spitzer J. C., Thompson C. E., Breuel J. F.: Theriogenology 34, 139, 1990.
6. Ginther O. J., Kastelic J. P., Knopf L.: Anim. Reprod. Sci. 20, 187, 1989.
7. Goulding D., Williams D. H., Roche J. F., Boland M. P.: J. Reprod. Fert. 100, 505, 1994.
8. Grasso F., Guilbault L. A., Roy G. L., Matton P., Lussier J. G.: Theriogenology 31, 199, 1989.
9. Gray B. W., Cartee R. E., Stringfellow D. A., Riddell M. G., Riddell K. P., Wright J. C.: Theriogenology 35, 207, 1991.
10. Guilbault L. A., Grasso F., Lussier J. G., Roullier P., Matton P.: J. Reprod. Fert. 91, 81, 1991.
11. Hahn J.: Theriogenology 38, 269, 1992.
12. Huhtinen M., Rainio V., Aalto J., Bredbacka P., Makai-Tanilla A.: Theriogenology 37, 457, 1992.
13. Jaśkowski J. M., Kościński W., Lewandowski Z., Zbylut J., Krasucki J., Janowski T.: Konf. Nauk. „Postęp w rozrodzie zwierząt” Bydgoszcz, 1, 50, 1995.
14. Jaśkowski J. M.: Medycyna Wet. 1996 (w druku).
15. Ko J. C. H., Kastelic M. R., Del Campo M. R., Ginther O. J.: J. Reprod. Fert. 91, 511, 1991.
16. Kohram H., Bousquet D., Durocher J., Guilbault L. A.: Theriogenology 43, 252, 1995.
17. Lussier J. G., Lamothe P., Pacholek X.: Theriogenology 43, 270, 1995.
18. Max A.: Życie wet. 67, 179, 1992.
19. Rajamahendran R., Sianangama P. C.: J. Reprod. Fert. 95, 577, 1992.
20. Rajamahendran R., Calder M. D.: Theriogenology 40, 99, 1993.
21. Roberts A. J., Grizzle J. M., Echterkamp S. E.: Theriogenology 42, 917, 1994.
22. Roullier P., Matton P., Guilbault L., Grasso F., Lussier J.: Theriogenology 33, 313, 1990.
23. Savio J. D., Keenan L., Boland M. P., Roche J. F.: J. Reprod. Fert. 83, 663, 1988.
24. Stock A. E., Stolla R.: Tierarztl. Umsch. 50, 543, 1995.
25. Voss H. J., Allen S., Aquardo P., Foote R. H.: Theriogenology 25, 210, 1986.
26. Wilson J. M., Jones A. L., Miller D. R.: Theriogenology 33, 349, 1990.
27. Znaniecki R.: Czynniki określające powodzenie transferu zarodków u krów mlecznych na Żuławach Wiślanych. Praca dokt. Wrocław, 1995.

Adres autora: doc. dr hab. Jędrzej M. Jaśkowski, ul. Św. Trójcy 35/50, 85-224 Bydgoszcz

HAMIR A., MOSER G., WAMPLER T., HATTEL A., DIETCHOLD B., RUPPRECHT C. E.: Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych dla nukleokapsydu celem wykrycia antygenu wirusa wścieklizny w preparatach histologicznych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. (Use of a single anti-nukleokapsid monoclonal antibody to detect rabies antigen in formalin-fixed paraffin embedded tissues). Vet. Rec. 138, 114-115, 1996 (5)

Badaniom w kierunku wścieklizny poddano tkanki 90 zwierząt domowych i dzikich. Wściekliznę zdiagnozowano w 55 przypadkach badając testem immunofluorescencji. Skrawki tkanek rozmrożone w temperaturze pokojowej utrwalano w zbuforowanym roztworze formaliny, zatapiano w parafinie i barwiono hematoksyliną-eozyną. Część preparatów ogrzewano do 55°C, odtuszczone w ksylole, odwodniono w różnych stężeniach etanolu, poddano działaniu ultradźwięków, trawiono proteazą celem odsłonięcia antygenów wirusa wścieklizny i poddano działaniu normalnej surowicy koziej. Następnie inkubowano je z przeciwciałem monoklonalnym i barwiono. W teście ABC stwierdzono w cytoplazmie neuronów obecność charakterystycznego dla wirusa wścieklizny antygenu. Wyniki testu ABC pokrywały się z wynikami odczynu immunofluorescencji.