

RYSZARD ZNANIECKI, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI*

Czynniki opisujące efektywność superowulacji i wyniki pozyskiwania zarodków u krów mlecznych

Prywatna Praktyka Weterynaryjna, ul. Wejhera 13, 82-200 Malbork

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

Summary

Factors affecting efficiency of superovulation and embryo collection in dairy cows

The influence of individual and environmental factors on superovulation success in dairy analysis of regression, chosen factors affecting 608 ovulations were examined. The number of embryos suitable for transfer were significantly influenced by: the type of FSH used ($p < 0.0001$), the number of superovulations during one service period ($p < 0.0001$), the bull used to inseminate donor cows ($p < 0.01$), the month at which superovulation was induced ($p < 0.02$) and age of cows ($p < 0.02$). Ovagen (ICP) appeared to be more effective than Follicotropin (Spofa) and FSH-P (Schering). The number of embryos suitable for transfer was higher after the 1st superovulation than after the 2nd and 3rd ones. The number of embryos was lower in the summer than in the winter and from cows more than 8 years old than younger ones (3-6 years old).

Efektywność superowulacji i wyniki pozyskiwania zarodków u krów dawczyń zależą od szeregu czynników w tym rodzaju zastosowanej gonadotropiny, czynników indywidualnych, środowiskowych i innych będących efektem działań człowieka. Tym niemniej większość badań, w których próbuje się określać ich wpływ na wyniki superowulacji, uwzględniania wpływu jednego, rzadziej dwu lub trzech czynników jednocześnie. Możliwość uszeregowania tych czynników pozwoliłaby ustalić, które z nich odgrywają rolę pierwszoplanową, które zaś mają znaczenie drugorzędne. Praktyczne znaczenie takiego uszeregowania będzie tym większe, im liczniejszy i bardziej różnorodny materiał porównawczy uwzględnić będzie analiza.

Nieliczne, wieloczynnikowe analizy przeprowadzane w Stanach Zjednoczonych obejmują jedynie wpływ wybranej grupy parametrów na wyniki superowulacji u krów mlecznych i mięsnych (4, 26). Wyniki tych analiz – z racji znacznych różnic w odniesieniu do podawanych preparatów, technologii produkcji zarodków oraz sposobu żywienia i utrzymania krów dawczyń – nie są dostatecznie miarodajne w odniesieniu do panujących u nas warunków.

Celem pracy było określenie wpływu różnych czynników na wyniki superowulacji oraz uzyskiwania zarodków od krów mlecznych.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w latach 1989-1994 na 347 krowach rasy cb z dużym dolewem krwi holsztyńfryza. Krowy pochodziły ze stad hodowli zarodowej i gospodarstw rolników indywidualnych na terenie Żuław. Do synchronizacji rozpoczynanej nie wcześniej niż 100 dni po wycieleniu używano PGF2 α (25 mg dinoprost trometamol lub 0,5 mg cloprostenolu) podawanej w 11-dniowym odstępie. Prowokowanie superowulacji rozpoczynano między 9 a 11 dniem cyklu rujowego podając jeden z trzech preparatów: Follicotropin (Spofa), FSH-P (Schering Corp. Rahway N. J.) oraz Ovagen (ICP). FSH podawano domięśniowo (rano i wieczorem) w obniżających się dawkach stosując łącznie 400 jednostek mysich preparatu Follicotropin, 32 jednostki Armura preparatu FSH-P oraz 16 ml (14,4 mg NIADDAK-oFSH) preparatu Ovagen. Ruję u krów wywoływano podając m.in. podwójną dawkę prostaglandyny. Krowy unasieniano jedno do trzykrotnie. Zarodki pozyskiwano metodą bezkrwawą w 6-8 dniu po zakończeniu rui, wyszukiwano pod mikroskopem stereoskopowym oraz oceniano stopień rozwoju zarodka i jego jakość (2).

Badano wpływ następujących czynników na wyniki superowulacji mierzonej liczbą klinicznie stwierdzanych ciałek żółtych oraz wyniki pozyskiwania zarodków: wpływ buhaja dawcy nasienia, rodzaju zastosowanego preparatu FSH, wieku krów wyrażonego w latach, liczby dni od porodu do zabiegu superowulacji, liczby zabiegów superowulacji podczas jednego okresu międzyciążowego oraz miesiąca i roku, w którym dokonywano superowulacji.

Wyniki oceniono statystycznie posługując się analizą regresji wielokrotnej.

Wyniki i omówienie

Istotny wpływ na wyniki superowulacji u dawczyń zarodków wywierały: rodzaj zastosowanego preparatu FSH, liczba superowulacji przeprowadzonych na krowie podczas jednego okresu międzyciążowe-

go, buhaj dawca nasienia, wiek krów oraz miesiąc i rok, w których przeprowadzano superowulację.

W tab. 1 przedstawiono efektywność superowulacji po zastosowaniu wybranych preparatów FSH. Analiza statystyczna wykazała, że rodzaj użytego preparatu wywierał istotny wpływ ($p < 0,0001$) na liczbę zarodków przydatnych do transferu, liczbę zarodków zdegenerowanych oraz liczbę komórek jajowych, a także istotny ($p < 0,02$) na liczbę pozyskanych zarodków i oocytów. Po podaniu preparatu Ovagen produkcji nowozelandzkiej uzyskiwano 7,33 zarodków i oocytów ogółem w tym 5,25 zarodków. Po podaniu preparatów Follicotropin i FSH-P, odp. 6,82 i 5,63 zarodków i oocytów oraz 3,85 i 2,72 zarodków przydatnych do transferu.

Tab. 1. Wyniki superowulacji po zastosowaniu wybranych preparatów FSH

Oznaczone cechy	Rodzaj preparatu		
	Follicotropin	FSH-P	Ovagen
Liczba superowulacji (n)	490	97	21
Liczba ciałek żółtych (\bar{x})	8,23	7,0	8,0
Liczba pozyskanych zarodków i oocytów (\bar{x})	6,82	5,63	7,33
Liczba zarodków ogółem (\bar{x})	5,32	4,01	5,71
Liczba zarodków przydatnych do przeniesienia (\bar{x})	3,85	2,72	5,25
Liczba oocytów (\bar{x})	1,50	1,62	1,62

Dobre wyniki superowulacji po zastosowaniu preparatu Ovagen potwierdzają inni autorzy. Dixon i Reid (6) aplikując Ovagen krowom rasy bawół indyjski uzyskiwali przeciętnie 6,6 zarodków, w tym 50% przydatnych do transferu, podczas gdy po podaniu FSH-P ich liczba wynosiła 5,57, zaś przydatnych do przeniesienia było 47%. Na wysoką liczbę zarodków po zastosowaniu preparatu Ovagen wskazują również nieliczne jeszcze badania krajowe (15, 16). Z kolei badania własne są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami, w których wykazano wyższą efektywność superowulacji po zastosowaniu preparatu Follicotropin niż FSH-P (17). Bardzo dobre wyniki uzyskiwane po podaniu preparatu nowozelandzkiego mogą wynikać ze ściśle ustalonej, niskiej zawartości LH (mniej niż 0,2%) i zachowaniu wysokiej, niezmiennej aktywności FSH. Podwyższone stężenie LH, szczególnie w okresie następującym po indukowanej luteolizie może wpływać na przedwczesną luteinizację pęcherzyków jajnikowych, niedostateczne uczulenie receptorów LH oraz

wcześniejsze owulacje (3, 9, 11). Wszystkie te zaburzenia nie sprzyjają pozyskiwaniu wysokiej liczby zarodków i powodują wzrost odsetka zdegenerowanych zarodków. Pośrednim dowodem słuszności tej interpretacji jest istotnie wyższa liczba nieprawidłowych zarodków po zastosowaniu preparatów Follicotropin i FSH-P o węższym stosunku LH/FSH. Nie można także wykluczać wyższej częstości zaburzeń profilu LH w rui podczas indukowanej po zastosowaniu do wywoływania rui preparatów starszej generacji. Związek tych zaburzeń z pozyskiwaniem małej liczby zarodków przedstawili Greve i wsp. (11). Liczba superowulacji przeprowadzona podczas jednego okresu międzyciążowego wywierała istotny ($p < 0,0001$) wpływ na liczbę zarodków przydatnych do transferu, liczbę zdegenerowanych zarodków oraz liczbę komórek jajowych.

Jak wynika z danych tab. 2 najwięcej zarodków przydatnych do transferu produkowały krowy, u których superowulację przeprowadzano po raz pierwszy. Po kolejnych zabiegach liczba zarodków – choć nie bez wyjątków – obniżała się. Fakt ten nie jest zaskakujący i wynika z obniżającej się – przy wielokrotnym stosowaniu – wrażliwości jajników na stosowane gonadotropiny (2). Także Hasler i wsp. (12) podają, że w miarę zwiększania liczby zabiegów superowulacji zmniejsza się stopniowo średnia liczba zarodków pozyskiwanych od krowy oraz zmniejsza się odsetek komórek jajowych. Obniżanie się wrażliwości na dany hormon powodowane jest pojawieniem się przeciwciał na obcą substancję białkową. Stąd w celu zapobieżenia niepożądanym efektem Anglicy zalecają przy drugiej i kolejnych zabiegach superowulacji zwiększać nieznacznie dawkę używanego preparatu FSH.

W badaniach własnych używano niezmiennie takiej samej dawki preparatu, stąd być może istotne obniżanie się liczby zarodków przydatnych do prze-

Tab. 2. Liczba zarodków przydatnych do przeniesienia, zdegenerowanych zarodków i komórek jajowych w zależności od liczby zabiegów superowulacji podczas jednego okresu międzyciążowego

Numer superowulacji	Liczba krów	Liczba		
		zarodków przydatnych do przeniesienia	zarodków zdegenerowanych	oocytów
I	248	5,11	1,23	1,73
II	182	3,16	1,09	1,48
III	108	3,54	1,04	1,51
IV	46	4,0	0,85	2,02
V	24	3,25	1,04	1,38

niesienia w drugim i dalszych zabiegach pozyskiwania zarodków. W przeciwieństwie do wyników badań własnych Gielen i wsp. (10) oraz Moor i wsp. (20) nie notowali istotnego ujemnego wpływu wielokrotnie powtarzanych zabiegów superowulacji na liczbę zarodków najwyższej jakości. Także oni jednak donoszą o nieznacznie wyższej liczbie zarodków pozyskiwanych podczas pierwszego płukania.

Liczba zdegenerowanych zarodków była największa i najniższa odp. u krów, od których pozyskiwano zarodki po raz pierwszy i czwarty. Jednak, wyrażona w procentach proporcja zarodków zdegenerowanych do przydatnych do transferu była najkorzystniejsza podczas pozyskiwania pierwszego i czwartego, tj. wówczas gdy uzyskiwano najwięcej zarodków. Wydaje się zatem mało prawdopodobne by uzyskane różnice w odniesieniu do liczb nieprawidłowych zarodków były bezpośrednim następstwem rosnącej liczby zabiegów pozyskiwania zarodków, którym poddawano krowy.

Mały procentowy udział zdegenerowanych zarodków przypadający na zarodki przydatne do transferu, potwierdza raczej tendencję sugerowaną przez Donaldsona (8). Zgodnie z nią im wyższa jest liczba zarodków ogółem, tym wyższa przydatnych do transferu.

Uzupełniając uzyskane wyniki dodać należy, że wysoka liczba zdegenerowanych zarodków zależy przede wszystkim od dawki i sposobu podawania FSH oraz, co ważniejsze, rodzaju preparatów gonadotropowych używanych do prowokowania superowulacji (7, 8, 20). Istotne różnice w liczbie pozyskiwanych oocytów podczas kolejnych zabiegów płukania macicy – biorąc pod uwagę ich wyraźny związek ze sposobem przeprowadzania zabiegu unasiwienia – można tłumaczyć jedynie zaburzeniami hormonalnymi, bardziej prawdopodobnymi przy wielokrotnym używaniu preparatów gonadotropowych. W efekcie dochodzić może do zaburzeń transportu nasienia w obrębie dróg rodnych samicy (2).

Zaznaczył się istotny ($p < 0,01$) wpływ buhajów dawców nasienia na liczbę zarodków przydatnych

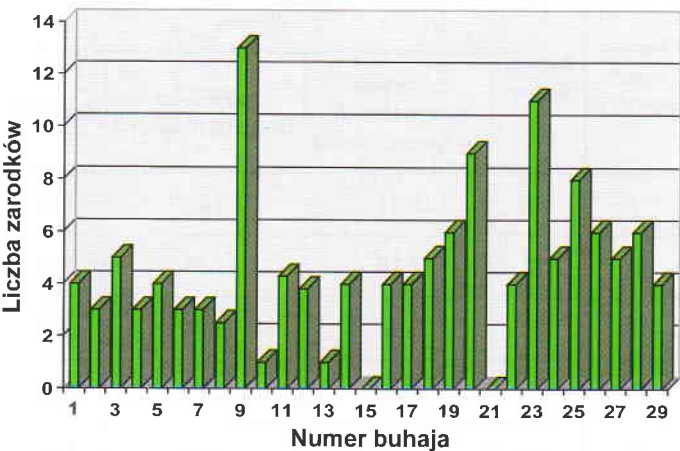
do transferu. Szczegółowe wyniki przedstawia ryc. 1. Jak wynika z ryciny różnice pomiędzy liczbą zarodków przydatnych do przeniesienia po wykorzystaniu do inseminacji nasienia różnych buhajów były znaczne, od bardzo złych do zadowalających. Na istotny wpływ dawcy nasienia na liczbę pozyskiwanych zarodków przydatnych do transferu wskazywało szeregiem autorów w tym również Reklewski i wsp. (23). Spośród pozyskanych zarodków i oocytów, zarodki przydatne do transferu wynosiły w zależności od wykorzystanego do unasiwienia buhaja od 42,5 do 78,9%. Także Saacke i wsp. (24) donoszą o dużych różnicach uzależnionych od buhajów – dawców nasienia odnośnie do liczby uzyskanych 6-7-dniowych zarodków oraz ich przeżywalności w pierwszych dniach po wprowadzeniu do macicy biorczyń. Wykazano także różnice pomiędzy wczesnym rozwojem zarodków po zapłodnieniu *in vitro* nasieniem pochodzącym od różnych buhajów (2, 14). Pewien wpływ na wyniki zapłodnienia u krów poddanych superowulacji wydaje się mieć różna jakość nasienia buhajów używanych do unasiwienia. Stwierdzono, że znacznie większą liczbę zarodków przydatnych do transferu uzyskuje się w tych przypadkach, w których stwierdzano dużą liczbę dodatkowych plemników, przylegających do osłonki przejrzystej komórki jajowej podczas zapłodnienia.

Z kolei u krów, u których pozyskiwano mniejszą liczbę zarodków, względnie były one niedostatecznej jakości, do osłonki przejrzystej komórki jajowej przylegał zwykle jeden dodatkowy plemnik. Duże różnice w liczbie pozyskiwanych zarodków tłumaczył Walawski i wsp. (27) uwarunkowaniami immunogenetycznymi, polegającymi na występowaniu semilatenentnych defektów zapłodnienia lub zaburzeń immunologicznych, przejawiających się zamieraniem zarodków. Stwierdzono, że genotyp charakterystyczny dla alkalicznej RNA-zy leukocytów jest czynnikiem różnicującym wskaźniki płodności kojarzonych par rodzicielskich. Stosując heterospermiczne dawki nasienia buhajów o genotypach AA, AB i BB wykazano mechanizm pro selekcyjny, faworyzujący zygoty AA i dyskryminujący zygoty BB.

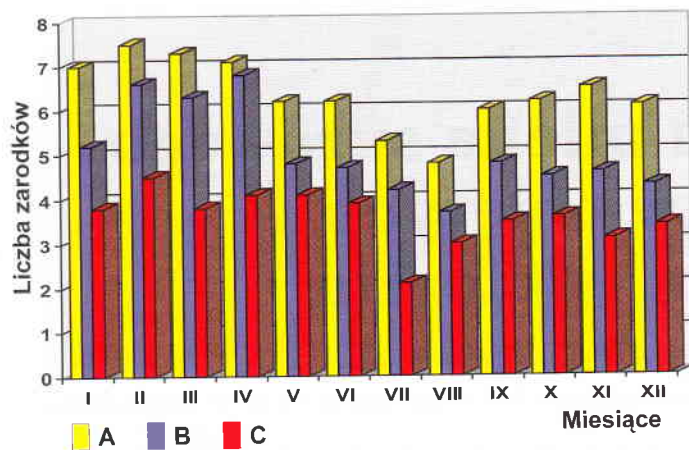
Wiek krów dawczyń wywierał istotny ($p < 0,04$) wpływ na liczbę zarodków przydatnych do transferu. Z tab. 3 wynika, że stosunkowo najwięcej zarodków

Tab. 3. Wpływ wieku dawczyń zarodków na liczbę zarodków przydatnych do transferu

Oznaczone cechy	Wiek krów (w latach)								razem
	3	4	5	6	7	8	9	10	
Liczba superowulacji	3	14	53	101	258	140	31	8	608
Średnia liczba zarodków	7,61	6,32	3,84	3,15	3,56	4,30	2,34	1,0	3,63



Ryc. 1. Wpływ buhaja na liczbę zarodków przydatnych do transferu



Ryc. 2. Całkowita liczba zarodków i oocytów (A), liczba zarodków ogółem (B) i liczba zarodków przydatnych do przeniesienia (C) w poszczególnych miesiącach

przydatnych do transferu uzyskiwano od młodych, 3-5-letnich dawczyń zarodków, mniej od samic w wieku 6-8 lat, najmniej natomiast od krów starych 9-10-letnich. Uzyskane przez nas wyniki nie są zgodne z podawanymi przez Lerner'a i wsp. (18), którzy podają, że liczba zarodków wzrasta stopniowo wraz z wiekiem, osiągając szczyt w 9 roku życia. Ich zdaniem reakcja na gonadotropiny ulega obniżeniu w późniejszym wieku, w efekcie obniżeniu ulega liczba zarodków przydatnych do transferu.

Jak wynika z przeprowadzonej analizy miesiąc, w którym przeprowadzono zabieg superowulacji wywierał znaczny wpływ na całkowitą liczbę pozyskanych zarodków i oocytów ($p < 0,0001$), liczbę zarodków przydatnych do transferu ($p < 0,02$) oraz liczbę zarodków wyprodukowanych ogółem ($p < 0,04$).

Odnośne wyniki zawiera ryc. 2. Niezależnie od zastosowanego preparatu wyniki pozyskiwania zarodków były lepsze w miesiącach zimowych i wczesną wiosną niż latem. Tendencja ta nie jest łatwa do wyjaśnienia. W tym przypadku znaczną zmienność produkcji zarodków trudno przypisywać wyłącznie różnemu latem i zimą poziomowi żywienia. Jak wiadomo dawka pokarmowa latem jest przeważnie zasobniejsza w białko, uboższa w substancje energetyczne. Poziom energii pobieranej z paszą wywiera znaczny wpływ na przysadkę mózgową oraz aktywność jajników (19), co pozostaje nie bez wpływu na wzrost pęcherzyków jajnikowych i liczbę owulacji, w efekcie liczbę pozyskiwanych zarodków.

Schäfer i wsp. (25) stwierdzali u krów, produkujących małą liczbę zarodków, obniżony poziom glukozy, cholesterolu oraz podwyższone stężenie związków ketonowych.

Z nowszych badań Balakrishanan'a i wsp. (1) wynika, że w przypadku gdy stężenie cholesterolu we krwi przekracza 140 mg/dl liczba zarodków przydatnych do transferu była istotnie wyższa niż u krów dawczyń, u których stężenie tego metabolitu było niższe od podanej wartości granicznej. Drugim możliwym wytłumaczeniem istotnej zmienności w

produkcji zarodków w ciągu roku może być odmienna, zależna w znacznym stopniu od warunków świetlnych, reakcja jajników na egzogenne gonadotropiny. Stąd sugestie niektórych autorów (13, 21) by preparaty gonadotropowe podawać w dawce wynikającej z wcześniej ustalonego statusu hormonalnego. Niektórzy wreszcie podkreślają niekorzystny wpływ wysokiej temperatury otoczenia na przeżywalność komórek jajowych (22).

Rok, w którym przeprowadzano zabieg superowulacji wywierał wpływ jedynie na liczbę zarodków ogółem ($p < 0,0001$). Więcej zarodków wyplukiwano w dwóch ostatnich latach badań (odp. 5,96 i 5,89) niż w pierwszych czterech. Wyjaśnienie tego faktu napotyka na pewne trudności. Najprostszym wytłumaczeniem byłoby mniejsze doświadczenie kliniczne i techniczne zespołu przenoszenia zarodków w pierwszych latach badań.

Piśmiennictwo

- Balakrishanan M., Bhaskar B. V., Chinnaiya G. P., Arora V. K., Ramu A., Sarma P. A.: *Theriogenology* 40, 643, 1993.
- Bielanski A., Tischner M.: *Biotechnologia rozrodu zwierząt gospodarskich „Universitas”* Kraków, 1993.
- Bindon B. M., Piper L. R., Cahill L. P., Driancourt M. A., Shea T. O.: *Theriogenology* 25, 53, 1986.
- Burton N. R., Pashen R., Darrow M., Lean I. J.: *Theriogenology* 41, 171, 1994.
- Callesen H., Greve T., Hyttel P.: *Theriogenology*, 30, 477, 1988.
- Dixon T. E., Reid J. I.: *New Zealand Embryo Transfer Workshop*, Hamilton, New Zealand 1, 22, 1994.
- Donaldson L. E.: *Theriogenology* 22, 205, 1984.
- Donaldson L. E.: *Vet. Rec.* 118, 661, 1986.
- Foote R. H., Fox T. C., Morgan G. L., Weels M. E., Wettemann R. P., Zavy M. T.: *J. Reprod. Fert.* 92, 475, 1991.
- Gielen J. Th., Roerink G. H., Atoon R. E., Vonk Noordegraaf C. A., Pasman J., Nell T.: *Theriogenology* 33, 229, 1990.
- Greve T., Callesen H., Hyttel P.: *Theriogenology* 21, 237, 1984.
- Hasler J. F., McCauley A. D., Schermerthorn E. C., Foote R. H.: *Theriogenology* 19, 83, 1983.
- Herrler A., Elsaesser N., Paravizi N., Nieman H.: *Theriogenology* 35, 633, 1991.
- Hillery P. L., Parrish J. J., First N. L.: *Theriogenology* 33, 249, 1990.
- Jaśkowski J. M., Hutnikiewicz I. M., Lewandowski Z., Sucharski M., Znaniński R., Kaźmierczak Z.: *Medycyna Wet.* 51, 97, 1995.
- Jaśkowski J. M., Znaniński R.: *Życie wet.* 70, 268, 1995.
- Jaśkowski J. M., Zbylut J., Hutnikiewicz I. M.: *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 40, 41, 1996.
- Lerner S. P., Thayne W. V., Baker R. D., Henschen T., Meridith S., Inskip E. K., Dayley R. A., Levis P. E., Buchter R. L.: *J. Anim. Sci.* 63, 176, 1986.
- Mani A. U., Watson E. D., McKelvey W. A. C.: *Theriogenology* 41, 1673, 1994.
- Moor R. M., Kruip Th. A. M., Green D.: *Theriogenology* 21, 103, 1984.
- Murphy M. G., Mapletoft R. J., Manns J., Humprey D.: *Theriogenology* 21, 117, 1984.
- Putney D. J., Drost M., Thatcher W. W.: *Theriogenology* 30, 195, 1988.
- Reklewski Z., Dymnicki E., Grochowska R.: 42. Jahrestag. EVT and 42nd Annual Meeting EAAP, Berlin 1, 8, 1991.
- Saake R. G., Nadir S., Nebel R. L.: *Theriogenology* 41, 45, 1994.
- Schäfer M., Tran Thi Hien, Paarmann S., Kramer G.: *Arch. Exper. Vet. Med. Leipzig* 44, 157, 1990.
- Slennig B. D., Wheeler Z. M. B.: *Theriogenology* 31, 653, 1989.
- Walawski K., Czarnik U., Znaniński R., Roszak D., Prusinowska I.: *Symp. „Biotechnologia Zwierząt – badania oraz zastosowanie w hodowli i weterynarii”* Kraków 1, 87, 1993.