

Oddziaływanie cloprostenolu oraz gestagenów i PMSG na dynamikę wzrostu pęcherzyków jajnikowych u przeżuwaczy*)

TOMASZ SCHWARZ, MACIEJ MURAWSKI*, EDWARD WIERZCHOŚ*, RYSZARD TUZ

Katedra Hodowli Trzody Chlewnej, *Katedra Hodowli Owiec i Kóz Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Schwarz T., Murawski M., Wierzchoś E., Tuz R.

Effect of cloprostenol, FGA and PMSG on ovarian follicular dynamics in ruminants

Summary

In this study the dynamics of follicular growth during estrous cycle after cloprostenol, FGA and PMSG stimulation in goats was compared. On the day 11 of the estrous cycle Group I of the goats ($n = 4$) was injected with 0.25 mg of cloprostenol for luteolysis stimulation. The follicles which started to grow after treatment formed the ovulatory wave. Group II of the goats ($n = 4$) was stimulated for 17 days by intravaginal sponges with FGA. After withdrawal of the sponges goats were injected with a single dose of 500 I.U. of PMSG (day 17). Observation of growing follicles on the ovaries were carried out every day through the two consecutive estrous cycles, and was finished on the day of ovulation at the end of second estrous cycle. No differences were observed in total number (4.25 ± 0.5) and the number of the large follicles ≥ 5 mm (2.75 ± 0.5) of the ovulatory wave after cloprostenol injection in comparison to waves of follicles growing during the luteal phase. In Group II of the goats stimulated with sponges impregnated with FGA the number of growing follicles did not differ from the number of follicles in Group I of goats and goats with a natural estrous cycle. After PMSG injection the number of follicles growing in the ovulatory wave increased rapidly. After synchronised ovulation in Group II of the goats follicular cysts were observed and disturbed folliculogenesis of the subsequent estrous cycle. No second wave of follicles was observed and the number of follicles growing was significantly lower ($p \leq 0.05$), even in the ovulatory wave, but the ovulation rate did not change in comparison to the natural estrous cycle.

Keywords: goat, estrous, ovarian

Synchronizacja cyklu rujowego jest zabiegiem biotechnicznym umożliwiającym przygotowanie do krycia określonej grupy zwierząt w jednym czasie. Obecnie znane są dwa sposoby postępowania, z których pierwszy, najczęściej stosowany u bydła, polega na skróceniu cyklu rujowego poprzez wywołanie luteolizy ciała żółtego preparatami o działaniu $\text{PGF}_2\alpha$ (11, 13, 15). Drugi natomiast, powszechnie stosowany u wszystkich gatunków przeżuwaczy, zasadza się na wydłużeniu fazy lutealnej cyklu jako skutek podawania egzogennych preparatów o działaniu analogicznym do progesteronu w czasie, gdy ciało żółte ulega naturalnej regresji (1, 4, 7, 12). O ile dobrze poznany jest efekt działania stosowanych preparatów na morfologię i funkcję ciała żółtego, o tyle słabo rozpoznany jest mechanizm oddziaływania na pojawianie się, selekcję i wzrost pęcherzyków.

Dotychczas prowadzone badania obejmowały przede wszystkim hodowlany aspekt stosowanych

metod synchronizacji rui (2, 7, 9, 12) lub omawiały zagadnienia zjawisk endokrynologicznych (15, 20, 21). Z kolei większość badań dotyczących folikulogenezy skupiała się na wzroście pęcherzyków w warunkach naturalnych (3, 5, 6, 14, 16, 18, 19, 22). Wyjątkiem są prace, w których starano się określić metodą histologiczną (8) oraz ultrasonograficzną (10) liczebność pęcherzyków w jajnikach owiec poddanych działaniu egzogennych progestagenów.

Dlatego podjęto badania, których celem było określenie na przykładzie kóz wpływu preparatów powszechnie używanych w synchronizacji rui u przeżuwaczy na wzrost i owulację pęcherzyków jajnikowych zarówno w czasie medykacji, jak też podczas kolejnego cyklu rujowego.

Materiał i metody

Doświadczenie objęło kontrolę wzrostu pęcherzyków jajnikowych w czasie synchronizacji rui i owulacji, w sezonie rozrodczym (październik-listopad) u 8 kóz. U 4 samiec – grupa 1, synchronizację rui przy użyciu analogu

*) Badania wykonane w ramach grantu KBN 5 PO6D 03117.

PGF2 α , poprzedzono ultrasonograficzną kontrolą wzrostu owulacyjnej fali pęcherzyków, przebiegu rui i owulacji. Badania te, kontynuowano przez 11 dni kolejnego cyklu rujowego, tj. do momentu najwyższej aktywności ciała żółtego. Wówczas zwierzętom podano w jednorazowej iniekcji 0,25 mg cloprostenol (Bioestrovet Biowet-Polska), nadal prowadząc wizualizację jajników w czasie rui, owulacji i kolejnego cyklu rujowego. W grupie 2 (4 kozy), zastosowano gąbki dopochwowe nasączone 45 mg FGA (Chronogest Intervet-Holandia) oraz pojedynczą iniekcję 500 j.m. PMSG (Folligon Intervet-Holandia) w dniu usunięcia gąbek. Ultrasonograficzne obrazowanie jajników rozpoczęło w momencie założenia gąbek i kontynuowano przez 21 dni, tj. do czasu wystąpienia rui i owulacji. Obserwacje prowadzono także przez 21 dni następnego cyklu rujowego. Jako grupę kontrolną (grupa 3) potraktowano 12 naturalnych cykli rujowych obserwowanych u trzech kóz w analogicznym okresie roku poprzedniego.

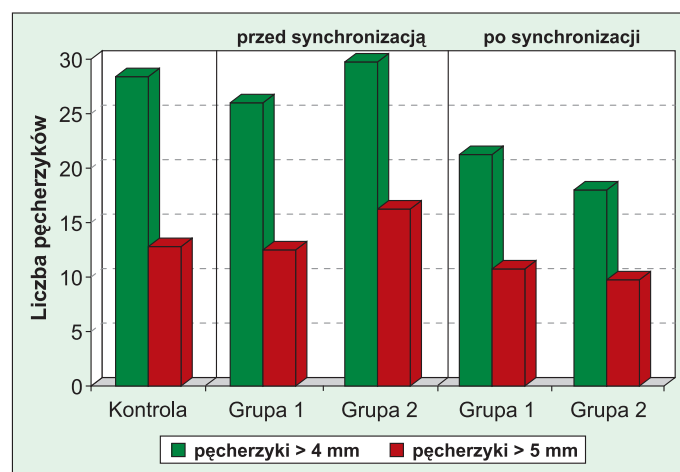
Codziennie obserwacje jajników prowadzone były przez jednego operatora przy użyciu ultrasonografu „Aloka SSD 500 Micrus” wyposażonego w głowicę liniową o częstotliwości 7,5 MHz przystosowaną do badania rektalnego. Zwierzęta unieruchamiano w specjalnie skonstruowanym poskromie w pozycji stojącej. Sondę ultrasonografu wprowadzano do prostnicy i odnajdowano jajnik. Następnie liczono pęcherzyki, mierzono średnicę i wykonywano szkic z zaznaczeniem pozycji wszystkich pęcherzyków w jajniku. Przy zestawianiu danych pęcherzyki dzielono na klasy: 1. pęcherzyki o średnicy < 4 mm, 2. pęcherzyki \geq 4 mm, 3. pęcherzyki \geq 5 mm. W dalszych analizach brano pod uwagę tylko pęcherzyki zaliczone do klasy 2 i 3. Tak przeprowadzone obliczenia pozwoliły na ustalenie liczby pęcherzyków rosnących w jednostce czasu, a także tempa i uporządkowania ich wzrostu.

Statystyczna analiza uzyskanych wyników badań objęła następujące parametry: średnią liczbę pęcherzyków rosnących do średnicy \geq 4 mm w obydwu badanych grupach w całym doświadczeniu, a także w cyklu rujowym poprzedzającym sprowokowaną owulację oraz w cyklu kolejnym; średnią liczbę pęcherzyków rosnących do średnicy \geq 5 mm w obydwu badanych grupach w całym doświadczeniu, a także w cyklu rujowym poprzedzającym sprowokowaną owulację oraz w cyklu kolejnym; średnią liczbę pęcherzyków rosnących do średnicy \geq 4 mm pojedynczej fali w obydwu badanych grupach; średnią liczbę pęcherzyków rosnących do średnicy \geq 5 mm pojedynczej fali w obydwu badanych grupach; średni przyrost dobowy pęcherzyka w obydwu badanych grupach; średni poziom owulacji po synchronizacji rui oraz w kolejnym cyklu rujowym w obydwu badanych grupach. Wszystkie wymienione parametry porównano pomiędzy grupami badawczymi z użyciem testu t-Studenta dla par skorelowanych. Istotność różnic w liczbie rosnących pęcherzyków pomiędzy falami oceniano przy użyciu analizy wariancji i testu Duncana.

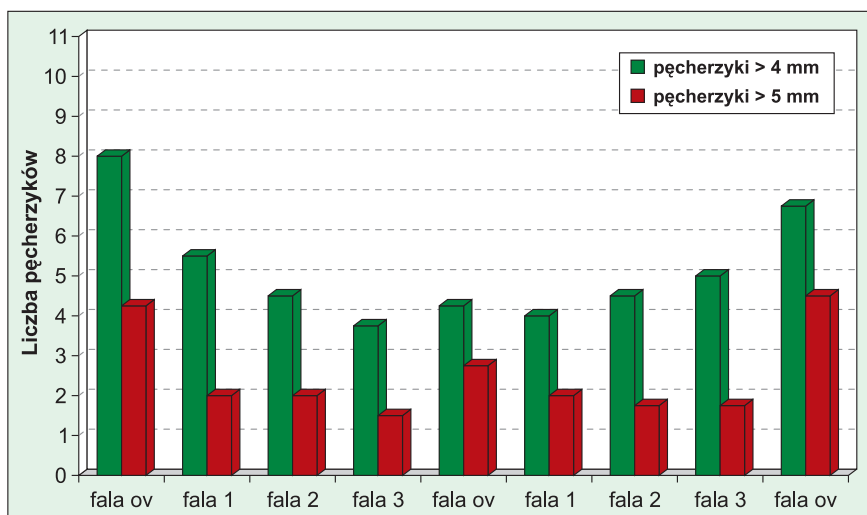
Wyniki i omówienie

W grupie pierwszej (cloprostenol) w czasie trwania obserwacji w jajnikach kóz rozpoczęło wzrost średnio 47,25 (\pm 1,26) pęcherzyków, z których 23,25 (\pm 0,6) osiągnęło średnicę \geq 5 mm, a w grupie drugiej (Chronogest) odpowiednio 47,75 (\pm 1,89) oraz 26 (\pm 1,41). W przeciętnej fali całego okresu badawczego w grupie 1 rosło średnio 5,11 (\pm 1,45) pęcherzyków, z których 2,51 (\pm 1,19) osiągnęło średnicę \geq 5 mm, zaś w grupie 2 rozwijało się średnio 5,31 (\pm 2,74) pęcherzyków, z których 2,89 (\pm 2,19) osiągnęło średnicę \geq 5 mm. Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami w żadnym z wymienionych wyżej parametrów.

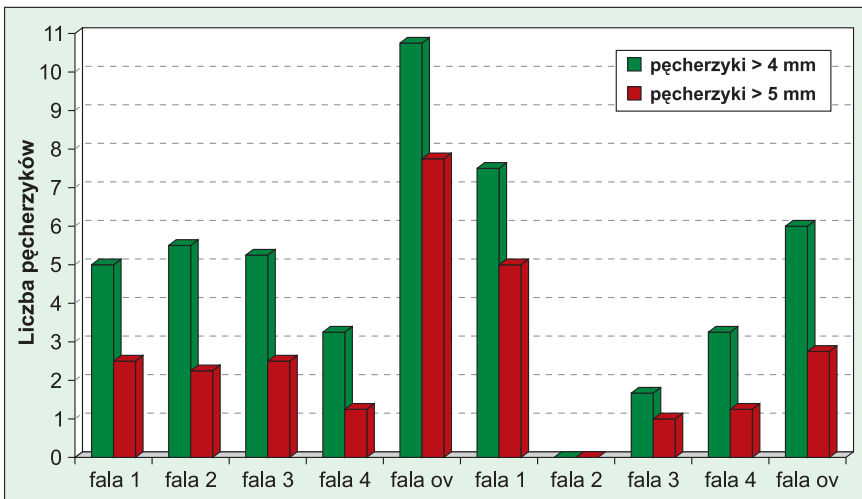
W pierwszej grupie zwierząt w okresie poprzedzającym zsynchronizowaną owulację rozwijało się średnio 26 (\pm 0,82) pęcherzyków, z których 12,5 (\pm 0,58) osiągnęło średnicę \geq 5 mm (ryc. 1). Zastosowanie cloprostenolu w szczycie aktywności ciała żółtego, tj. w 11. dniu cyklu rujowego, spowodowało luteolizę ciała żółtego, obniżenie stężenia progesteronu do poziomu umożliwiającego przedowulacyjny wylew en-



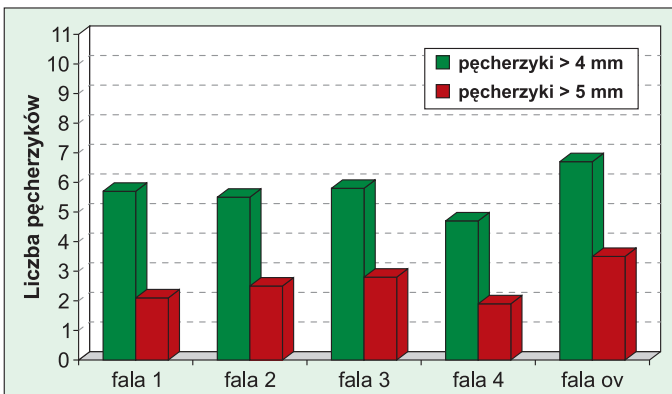
Ryc. 1. Całkowita liczba pęcherzyków rosnących w jajnikach kóz w obydwu etapach doświadczenia



Ryc. 2. Liczba pęcherzyków jajnikowych rosnących w poszczególnych falach u kóz poddanych działaniu cloprostenolu



Ryc. 3. Liczba pęcherzyków jajnikowych rosnących w poszczególnych falach u kóz poddanych działaniu FGA i PMSG



Ryc. 4. Liczba pęcherzyków jajnikowych rosnących w poszczególnych falach u kóz z grupy kontrolnej

dogennych gonadotropin, a tym samym skrócenie cyklu rujowego, zaś wzrastająca w tym czasie fala pęcherzyków stała się owulacyjną. Tak więc przy średniej liczbie 4,25 ($\pm 0,5$) rosnących pęcherzyków, w tym 2,75 ($\pm 0,5$) dużych, nie różniła się ona od przeciętnej fali fazy lutealnej. Była natomiast istotnie mniejsza ($p \leq 0,01$) od typowej fali owulacyjnej naturalnego cyklu rujowego, kiedy rozwijało się średnio 6,7 ($\pm 2,7$) pęcherzyków, z czego 3,5 (± 2) osiągnęło średnicę ≥ 5 mm (25) (ryc. 2 i 4). Zaobserwowano dwa interesujące fakty, po pierwsze wystąpienie pewnego rytmu pojawiania się kolejnych fal, który choć ulegał modyfikacjom związanym ze zjawiskami endokrynnymi, to jednak zachowywał pewną autonomię, prowadząc pomimo zmniejszenia się liczby rosnących pęcherzyków do utrzymania poziomu owulacji w identycznym wymiarze jak w naturalnym cyklu rujowym. Po drugie, poziom owulacji jest cechą tak silnie zdeterminowaną, że czynniki ograniczające pojawianie się nowych pęcherzyków nie wywierały dużego wpływu na ten proces, co potwierdziło wcześniej uzyskane wyniki badań przeprowadzonych w naturalnym cyklu rujowym w okresie wydłużania się dnia świetlnego (17).

W czasie, gdy kozy z grupy 2 poddane były działaniu octanu fluorogestonu (FGA), pojawiły się u nich

średnio cztery fale wzrostu pęcherzyków, zaś liczba rozwijających się pęcherzyków nie odbiegała od fal fazy lutealnej cyklu rujowego zwierząt kontrolnych (ryc. 3 i 4). Działanie FGA upodabnia go zatem do progesteronu, nie tylko ze względu na blokowanie przedowulacyjnego wylewu LH, lecz także ma podobny wpływ na procesy regulujące rekrutację i wzrost pęcherzyków. Po usunięciu gąbek i podaniu egzogennej gonadotropiny (PMSG), rozpoczęła wzrost fala owulacyjna, w której rosło średnio 10,75 ($\pm 0,96$) pęcherzyków, z których 7,75 ($\pm 0,96$) osiągnęło średnicę ≥ 5 mm. Liczebność pęcherzyków, obydwu klas wielkości, była w tej fali istotnie wyższa ($p \leq 0,01$) niż w czterech poprzedzających

falach, a także w porównaniu do fal owulacyjnych w naturalnym cyklu rujowym w analogicznym okresie roku. Również poziom owulacji przy wartości 4,5 ($\pm 1,29$) był istotnie wyższy ($p \leq 0,01$) w porównaniu z naturalnym cyklem rujowym, a co za tym idzie – przewyższał też poziom owulacji odnotowany w grupie 1. W całym omawianym okresie rozpoczęło wzrost średnio 29,75 ($\pm 1,89$) pęcherzyków, z których 16,25 ($\pm 1,26$) osiągnęło średnicę ≥ 5 mm (ryc. 1). W przypadku obydwu rozpatrywanych klas pęcherzyków była to liczba istotnie wyższa ($p \leq 0,05$) niż w grupie 1, jednak przyczyną takiego stanu rzeczy nie była większa liczba pęcherzyków rosnąca w falach fazy lutealnej, tylko znaczne pobudzenie przez PMSG jajników w jednej fali owulacyjnej.

W pierwszej grupie samic po zsynchronizowanej owulacji rosło średnio 21,25 ($\pm 0,5$) pęcherzyków, z których 10,75 ($\pm 0,5$) osiągnęło średnicę ≥ 5 mm (ryc. 1). Pomimo iż średnia liczba fal była mniejsza od obserwowanej w cyklu rujowym samic nie poddanych synchronizacji rui, to jednak ich rozkład w czasie był równomierny, zaś liczba rosnących pęcherzyków typowa. W fali owulacyjnej kończącej drugi okres badawczy rosło średnio 6,75 ($\pm 0,5$) pęcherzyków, w tym 4,5 (± 1) dużych i w porównaniu do fal fazy lutealnej były to wartości istotnie wyższe ($p \leq 0,05$) pod względem ogólnej liczby pęcherzyków oraz istotnie wyższe ($p \leq 0,01$) pod względem pęcherzyków dużych. Nie odnotowano natomiast istotnych różnic w stosunku do fal owulacyjnych w naturalnym cyklu rujowym. Taki przebieg obserwowanego cyklu rujowego świadczy o ograniczonym wpływie cloprostenu na folikulogenezę rozpatrywaną w dłuższym czasie.

W grupie 2 w cyklu rujowym, który rozpoczął się po zsynchronizowanej owulacji, rozpoczęło wzrost średnio 3,75 ($\pm 0,5$) fal pęcherzyków. W omawianym okresie odnotowano wzrost 18 ($\pm 0,82$) pęcherzyków, z których 9,75 ($\pm 0,5$) osiągnęło średnicę ≥ 5 mm. W stosunku do grupy 1 różnica była istotna ($p \leq 0,01$) w przypadku pęcherzyków o średnicy ≥ 4 mm oraz ($p \leq 0,05$) w przypadku pęcherzyków dużych.

W pierwszej po owulacji fali liczba rosnących pęcherzyków była istotnie niższa ($p \leq 0,01$) niż w owulacyjnej i rozwijało się w niej średnio 7,5 ($\pm 1,29$) pęcherzyków, w tym 5 ($\pm 0,82$) dużych. Była ona jednakże istotnie ($p \leq 0,05$) liczniejsza od przeciętnej fali badanego okresu, jak również od typowej fali fazy lutealnej cyklu rujowego. Było to spowodowane znanym faktem wydłużonego działania PMSG w stosunku do hormonów endogennych (21). Wzrost dużej liczby pęcherzyków bez możliwości ich owulacji (rosnący poziom progesteronu) prowadził do powstania pęcherzyków przetrwałych o dużej średnicy, które zaburzały przebieg wzrostu kolejnych fal w cyklu rujowym. Należy zaznaczyć, że pęcherzyki przetrwałe o średnicy > 10 mm w liczbie średnio 2,2 ($\pm 1,2$) pojawiły się u wszystkich badanych zwierząt. Dlatego też później nastąpiła przerwa we wzroście pęcherzyków w terminie, w którym zwykle pojawiała się druga fala. W fali trzeciej rosło bardzo niewiele pęcherzyków – średnio 1,67 ($\pm 0,58$) w tym 1 duży. Liczba pęcherzyków rekrutujących się w fali czwartej była wciąż niższa od przeciętnej i wynosiła 3,25 ($\pm 0,5$) w tym 1,25 ($\pm 0,5$) dużych. Mimo iż w czasie luteolizy ciałek żółtych zanikowi uległa też większość pęcherzyków przetrwałych, liczba pęcherzyków w fali owulacyjnej była wciąż niższa od przeciętnej i wynosiła 6 ($\pm 0,82$), w tym 2,75 ($\pm 0,5$) dużych (ryc. 3 i 4). W porównaniu do fal owulacyjnych zwierząt nie poddanych stymulacji hormonalnej były to wartości istotnie niższe w przypadku pęcherzyków ≥ 4 mm ($p \leq 0,05$), jak też w przypadku pęcherzyków dużych ($p \leq 0,01$).

Porównując zatem falowy wzrost pęcherzyków po synchronizacji rui do ich wzrostu w naturalnym cyklu daje się zauważyć zaburzenie „rytmu fizjologicznego” pojawiania się fal wzrostu pęcherzyków (18), które spowodowane zostało bez wątpienia obecnością cyst w jajnikach. Wskazuje to na silne, negatywne oddziaływanie PMSG na wzrost pęcherzyków, „wyłączające” endogenne mechanizmy regulujące rekrutację pęcherzyków i powodujące zmiany w przedowulacyjnej sekrecji LH (21). Oddziaływania takiego nie zaobserwowano natomiast po podaniu cloprostenolu. Pomimo tego liczba pęcherzyków owulujących w drugim cyklu rujowym pozostała na poziomie typowym dla osobnika, co kolejny raz potwierdza silną determinację cechy, jaką jest poziom owulacji powodującą, że nawet zmniejszona rekrutacja pęcherzyków nie wywiera wpływu na ten proces.

Wnioski

1. Luteoliza ciała żółtego spowodowana podaniem cloprostenolu przekształca kolejną falę wzrostu pęcherzyków w falę owulacyjną, bez wyraźnego zwiększenia poziomu rekrutacji pęcherzyków jajnikowych.

2. W cyklu rujowym będącym następstwem sztucznie spowodowanej luteolizy folikulogeneza przebiega bez zakłóceń.

3. Medykacja samicy gestagenami nie wpływa na przebieg folikulogenezy, natomiast podanie PMSG znacząco zwiększa poziom rekrutacji pęcherzyków w fali owulacyjnej i pierwszej fali kolejnego cyklu.

4. Folikulogeneza w cyklu rujowym będącym następstwem podania gestagenów i PMSG wykazuje zaburzenie rytmu pojawiania się fal będące wynikiem uformowania się przetrwałych pęcherzyków jajnikowych.

5. Zaburzenie rytmu rekrutacji pęcherzyków jajnikowych nie wpływa na poziom owulacji, który jest uwarunkowany genetycznie.

Piśmiennictwo

1. Bo G. A., Adams G. P., Caccia M., Martinez, Pierson R. A., Mapletoft R. J.: Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Aim. Reprod. Sci.* 1995, 39, 193-204.
2. Evans G.: Application of reproductive technology to the Australian livestock industries. *Reprod. Fert. Dev.* 1991, 3, 627-650.
3. Evans A. C. O., Duffy P., Hynes N., Boland M. P.: Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 2000, 53, 699-715.
4. Freitas V. J., Baril G., Martin G. B., Saumande J.: Physiological limits to further improvement in the efficiency oestrous synchronization in goats. *Reprod. Fert. Dev.* 1997, 9, 551-556.
5. Ginther O. J., Kot K.: Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology* 1994, 42, 987-1001.
6. Ginther O. J., Kot K., Wiltbank M. C.: Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 1995, 43, 689-703.
7. Haresign W.: Manipulation of reproduction in sheep. *J. Reprod. Fert.* 1992, Suppl. 45, 127-139.
8. Kruip A. M., Brand A.: Follicular growth during the normal cycle and after treatment with progestagens in the ewe. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 1975, 15, 191-204.
9. Larsson B., Gustafsson A., Bjurström L.: A programme for oestrus synchronization and embryo transfer in sheep. *Reprod. Dom. Anim.* 1991, 26, 301-308.
10. Leyva V., Buckrell B. C., Walton J. S.: Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology* 1998, 50, 395-416.
11. Nuti L. C., Bretzlaff K. N., Elmore R. G., Meyers S. A., Rugila S., Brinsko S. P., Blanchard T. L., Weston P. G.: Synchronization of estrus in dairy goats treated with prostaglandin F at various stages of the estrous cycle. *Amer. J. Vet. Res.* 1992, 53, 935-937.
12. Oliveira M. A., Guido S. I., Lima P. F.: Comparison of different protocols used to induce and synchronise oestrus cycle of Saanen goats. *Small Rum. Res.* 2001, 40, 149-153.
13. Pursley J. R., Mee M. O., Wiltbank M. C.: Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF and GnRH. *Theriogenology* 1995, 44, 915-920.
14. Ravindra J. P., Rawlings N. C., Evans A. C. O., Adams G. P.: Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewe. *J. Reprod. Fert.* 1994, 101, 501-509.
15. Schiewe M. C., Fitz T. A., Brown J. L., Stuart L. D., Wildt D. E.: Relationship of oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin $F_2\alpha$ receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *J. Reprod. Fert.* 1991, 93, 19-30.
16. Schrick N. F., Surface R. A., Pritchard J. Y., Dailey R. A., Townsend E. C., Inskip E. K.: Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.* 1993, 49, 1133-1140.
17. Schwarz T.: Dynamika rozwoju pęcherzyków jajnikowych kozy. Praca dokt., Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt AR, Kraków 2003.
18. Schwarz T., Wierchoś E.: Wzrost pęcherzyków jajnikowych w cyklu rujowym kóz. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 194-197.
19. Schwarz T., Wierchoś E.: Pęcherzyki jajnikowe u kóz w czasie anestrus. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 620-622.
20. Theodosiadou E., Goulas P., Kouskoura Th., Smokovitis A.: Oestrogen and progesterone concentrations in plasma and oviductal tissue of ewes exhibiting a natural or induced oestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 2004, 80, 59-67.
21. Yadav M. C., Walton J. S., Leslie K. E.: Plasma concentration of luteinizing hormone and progesterone during superovulation of dairy cows using follicle stimulating hormone or pregnant mare serum gonadotrophin. *Theriogenology* 1986, 26, 523.
22. Zięba D. A., Murawski M., Schwarz T., Wierchoś E.: Pattern of follicular development in high fecundity Olkuska ewes during the estrous cycle. *Reprod. Biol.* 2002, 2, 39-58.