

Zaburzenia przebiegu folikulogenezy u kóz pod wpływem egzogennych gonadotropin^{*)}

TOMASZ SCHWARZ, MACIEJ MURAWSKI*, EDWARD WIERZCHOŚ*, JACEK NOWICKI

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., Nowicki J.

Ovarian follicular growth disturbances after exogenous gonadotrophin administration in goats

Summary

The aim of the study was to evaluate the influence of large doses of exogenous gonadotrophins on ovarian follicular growth in goats. Folliculogenesis in twelve Polish White Goats was studied in the breeding season. In every goat synchronization of estrus was realized using FGA. In group 1 (6 goats), 1200 iu of PMSG was injected at the day of sponge withdrawal (day 17). In group 2 (6 goats), for four consecutive days from day 15, 40 iu, 30 iu, 20 iu, 10 iu of FSH was injected twice a day. Daily examinations of ovaries were performed from the day when sponges were inserted, to the ovulation in the second day after superovulation estrous cycle. The number of follicles growing during medication using FGA did not differ between groups, and did not differ from observations performed during natural estrous cycle. In ovulation wave of group 1 22.2 (\pm 3.92) of follicles were growing, and 21 (\pm 3.95) reached diameter of \geq 5 mm. In ovulation wave of group 2 20.2 (\pm 2.93) of follicles were growing, and 18.5 (\pm 2.07) reached a diameter of \geq 5 mm. The differences between groups were insignificant. The ovulation rate in group 1 was 13.2 (\pm 3.06), and was significantly lower ($P \leq 0.05$) than in group 2, i.e. 17.5 (\pm 3.67). After ovulation in the animals of group 1, follicular cysts appeared and disturbed folliculogenesis of the next estrous cycle. In the first wave there were more follicles than in the natural cycle, but after the second wave recruitment was stopped. In the ovulation wave less follicles were growing than in the natural cycle, however the ovulation rate was typical. There were larger numbers of growing follicles in the first postovulatory wave in group 2, nevertheless there were no disturbances in the rest of the cycle.

Keywords: goat, folliculogenesis, superovulation

Spośród wielu metod superowulacji, tj. stymulowania wzrostu zwiększonej puli pęcherzyków, oraz ich owulacji, u owiec i kóz największe praktyczne uznanie uzyskały dwie. Najstarsza polega na iniekcji samicom wysokiej dawki gonadotropiny żrebnej kłaczy (PMSG) (8). Przedłużone działanie tego hormonu prowadzi jednakże do obniżenia jakości pozyskiwanych zarodków (11) oraz wzrostu śmiertelności embrionów u biorecyń jako wynik skrócenia cyklu rujowego na skutek przedwczesnej regresji ciałek żółtych (17). Zaś u owiec, w zależności od rasy, notowano niepożądaną hiperstymulację jajników (14). U kóz poziom owulacji i w konsekwencji liczba uzyskanych zarodków po podaniu PMSG jest niższa niż po FSH (1, 2, 13). Natomiast niewątpliwą zaletą gonadotropiny PMSG jest fakt, iż jej wielokrotne podawanie nie powoduje obniżenia reakcji zwierząt na ten hormon (6). Innym rozwiązaniem, bardziej obecnie polecanym, jest podawanie FSH co 12 godzin przez 4 dni w zmniejszających lub zwiększających się dawkach (12). Najczęściej stosowane preparaty zawierają FSH uzyskiwane z przysadek świń, co może po-

wodować pojawianie się przeciwciał, które przy wielokrotnej iniekcji hormonu obniżają skuteczność zabiegu (3, 15).

Wymienione powyżej liczne zastrzeżenia spowodowały, iż zaczęto łączyć podawanie obu hormonów w różnych kombinacjach licząc, że przyniesie to wymierne korzyści (17, 24), opisano również modyfikację metody zalecającą dodatkową iniekcję GnRH (22, 25). W dotychczas prowadzonych badaniach skupiano się przede wszystkim na osiągnięciu maksymalnego poziomu owulacji i uzyskaniu jak największej liczby zarodków, zaś pomijano wpływ stosowania egzogennych hormonów na późniejsze funkcjonowanie jajników.

Praktykom stosującym egzogenne gonadotropiny znany jest fakt, że oprócz sprawdzonego efektu obserwuje się też bardzo niekorzystne działania uboczne, opisywane jako przetrwałe pęcherzyki, ciała żółte albo liczne cysty (11, 17, 24). Nie było wiadomo dotychczas, jak mogą one oddziaływać na procesy związane z folikulogenezą, tj. rekrutację, selekcję i owulację pęcherzyków jajnikowych rosnących w kolejnych falach.

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie wpływu stosowania egzogennych gonadotropin (PMSG

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

i FSH) na przebieg folikulogenezy i owulacji, zarówno w okresie stymulacji jajników, jak i w kolejnym cyklu rujowym.

Materiał i metody

Badania wykonano na 12 kozach, w sezonie rozrodczym, tj. w miesiącach styczeń-luty. Synchronizację rui przeprowadzono przy użyciu poliuretanowych gąbek nasączonych 45 mg FGA (Chronogest Intervet – Holandia). Ultrasonograficzną obserwację jajników rozpoczęto w momencie założenia gąbek, kontynuowano podczas rui i owulacji, która nastąpiła po ich usunięciu oraz w kolejnym cyklu rujowym. W grupie 1 (6 kóz) w dniu usunięcia gąbek zastosowano pojedynczą iniekcję 1200 j.m. PMSG (Serogonadotropina Biowet – Polska). W grupie 2 (6 kóz), począwszy od 15. przez cztery kolejne dni podawano dwukrotnie w ciągu dnia odpowiednio 40 j.m., 30 j.m., 20 j.m. i 10 j.m., łącznie 200 j.m. preparatu FSH (Follicotropin Spofa – Republika Czeska). W obu grupach gąbki usunięto w 17. dniu od założenia.

Codziennie obserwacje jajników prowadzone były przez jednego operatora przy użyciu ultrasonografu Aloka SSD 500 Micrus z głowicą liniową o częstotliwości 7,5 MHz przystosowaną do badania rektalnego. Po odnalezieniu jajnika liczone pęcherzyki, mierzone średnicę i wykonywano szkic uwzględniający ich pozycję w strukturze jajnika. Dodatkowo robiono zdjęcie jajnika przy użyciu termoprintera „Mitsubishi”. Przy zestawianiu danych pęcherzyki dzielono na klasy: 1 – pęcherzyki o średnicy < 4 mm, 2 – pęcherzyki \geq 4 mm, 3 – pęcherzyki \geq 5 mm, natomiast do dalszych analiz brano pod uwagę tylko pęcherzyki zaliczone do klasy 2 i 3.

Analizę statystyczną przeprowadzono dla zwierzęcia (łącznie dane z obydwu jajników). Istotność różnic w parametrach charakteryzujących folikulogenezę pomiędzy grupami szacowano testem t-Studenta dla par skorelowanych, podobnie jak istotność różnic w poziomie owulacji. Istotność różnic w liczbie rosnących pęcherzyków pomiędzy falami oceniano przy użyciu analizy wariancji i testu Duncana.

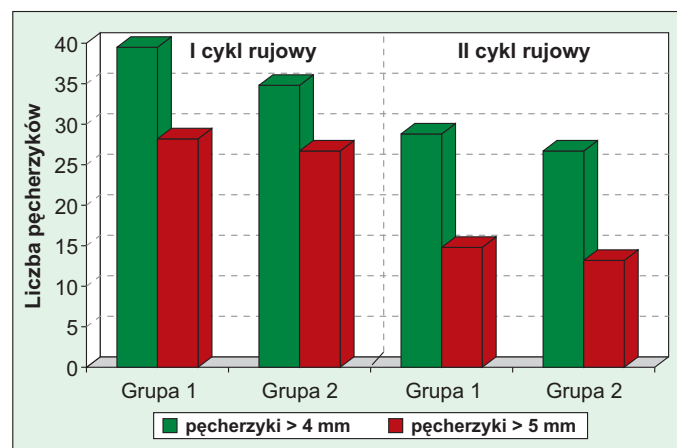
Wyniki i omówienie

W czasie trwania doświadczenia analizami objęto 779 pęcherzyków rosnących w 16 falach. U zwierząt grupy 1 (stymulacja PMSG) rozpoczęło wzrost średnio 68,3 (\pm 10,84) pęcherzyków, z czego 43 (\pm 6,51) osiągnęło średnicę \geq 5 mm. Z tej puli, w pierwszym obserwowanym okresie (I cykl rujowy), rozpoczęło wzrost średnio 39,5 (\pm 5,86) pęcherzyków, w tym 28,2 (\pm 3,66) dużych formując cztery fale, zaś w drugim okresie (II cykl rujowy) 28,8 (\pm 6,82) pęcherzyków, w tym 14,8 (\pm 5,46) dużych, również tworząc cztery fale wzrostu (ryc. 1, 2). Liczba pęcherzyków obydwu klas rosnąca w I cyklu rujowym była istotnie wyższa ($p \leq 0,01$).

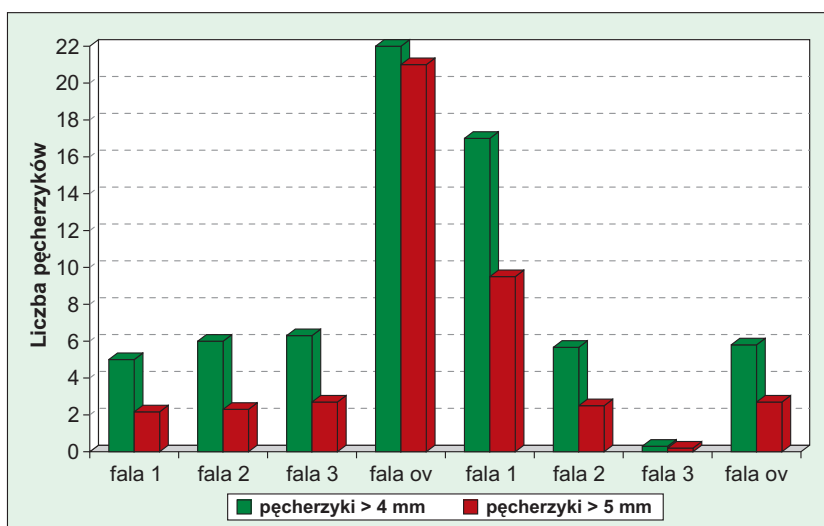
Trzy pierwsze obserwowane fale, których pojawianie się i wzrost przypadły w okresie medykacji FGA, nie różniły się od siebie istotnie, jak również przy liczebności pęcherzyków średnio 5,78 (\pm 1,48) – w tym 2,39 (\pm 0,7) dużych, od fal notowanych w naturalnym cyklu rujowym w analogicznym okresie roku (19). Natomiast w fali owulacyjnej przy liczebności 22,2 (\pm 3,92) pęche-

rzyków, w tym 21 (\pm 3,95) dużych, poziom rekrutacji był istotnie wyższy ($p \leq 0,01$) (ryc. 1). Średnie tempo wzrostu pęcherzyków w tej fali wyniosło 1,4 mm/dobę i było prawie dwukrotnie wyższe od obserwowanego w naturalnym cyklu rujowym (21). Podobne zjawiska obserwowali Driancourt i Fray (8), w przypadku gdy podanie PMSG przyspieszało trzykrotnie tempo wzrostu pęcherzyków. Średni poziom owulacji wyrażony liczbą obserwowanych w kolejnym cyklu rujowym ciałek żółtych wyniósł 13,2 (\pm 3,06) (ryc. 4). Oznacza to, że znaczny odsetek (ok. 37%) rosnących pęcherzyków nie uległ owulacji, kontynuując wzrost do średnicy > 10 mm i pozostając przez długi czas w jajnikach jako tzw. pęcherzyki przetrwałe. Podobne obserwacje poczyniono u owiec, u których stwierdzono zależność poziomu owulacji od obecności dużego pęcherzyka w czasie medykacji hormonalnej, jednak nie zaobserwowano takiej zależności względem liczby wynurzających się pęcherzyków (16).

W grupie 2 (stymulacja FSH) rozwijało się średnio 61,5 (\pm 6,16) pęcherzyków, w tym 39,8 (\pm 5,6) dużych. W I cyklu rujowym, w postaci czterech fal rozpoczęło wzrost 34,8 (\pm 2,79) pęcherzyków, w tym 26,7 (\pm 3,67)



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

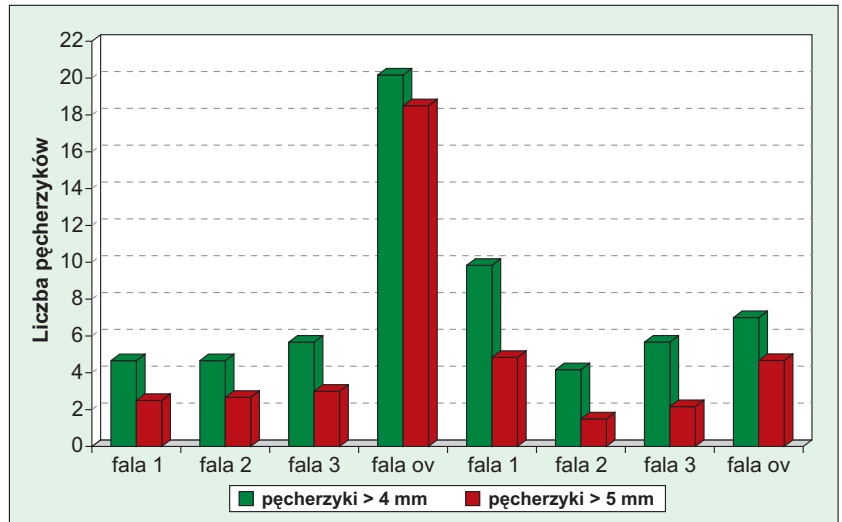


Ryc. 2. Liczba pęcherzyków jajnikowych rosnących w poszczególnych falach u kóz poddanych działaniu PMSG

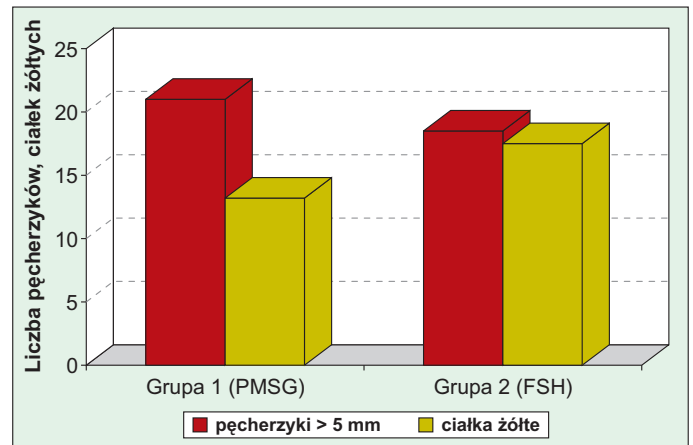
dużych, zaś w II cyklu rujowym 26,7 (\pm 3,93) pęcherzyków, w tym 13,2 (\pm 2,04) dużych, również grupując się w cztery fale wzrostu (ryc. 1, 3). Podobnie jak w grupie 1, w przypadku obydwu klas pęcherzyków różnice były wysoce istotne ($p \leq 0,01$) na korzyść okresu poprzedzającego owulację. Nie odnotowano natomiast istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami w żadnym z wymienionych parametrów.

W grupie 2, podobnie jak w grupie 1, trzy pierwsze fale nie różniły się istotnie pomiędzy sobą. Nie odnotowano też istotnych różnic w stosunku do odpowiadających im fal z grupy 1 ani fal fazy lutealnej cyklu rujowego w warunkach naturalnych (19). Średnia liczba rosnących w tych falach pęcherzyków wynosiła 5 (\pm 1,37), w tym 2,72 (\pm 1,07) dużych. W fali owulacyjnej przy liczbie 20,2 (\pm 2,93) pęcherzyków, w tym 18,5 (\pm 2,07) dużych, rozwijało się ich istotnie więcej ($p \leq 0,01$), zaś różnic w stosunku do fali owulacyjnej zwierząt grupy 1 nie odnotowano (ryc. 3). Średnie tempo wzrostu pęcherzyków w fali owulacyjnej wyniosło 1,53 mm/dobę. Pomimo iż FSH stymulowało wzrost pęcherzyków nieznacznie słabiej niż PMSG, to jednak średni poziom owulacji w grupie 2 był istotnie wyższy niż w grupie 1 ($p \leq 0,05$), odpowiednio 17,5 (\pm 3,67) w stosunku do 13,2 (\pm 3,06) (ryc. 4). Po stymulacji jajników przy użyciu PMSG owulowało jedynie około 63% rosnących pęcherzyków, zaś w przypadku zastosowania FSH aż 95%. Dlatego też w grupie 2 nie odnotowano tworzenia się pęcherzyków przetrwałych i wpływ przeprowadzonej stymulacji na przebieg kolejnego cyklu rujowego był znikomy.

W pierwszej fali cyklu poowulacyjnego grupy 1 rosnęło bardzo dużo pęcherzyków, średnio 17 (\pm 4,65), w tym 9,5 (\pm 3,56) dużych (ryc. 2). Liczba pęcherzyków drugiej fali nie odbiegała od średniej dla fazy medykacji gestagenowej we wcześniejszym cyklu rujowym, zaś w okresie, gdy powinien nastąpić wzrost pęcherzyków fali trzeciej stwierdzono niemal całkowity zanik folikularnej aktywności jajników. To poważne zaburzenie „rytmu fizjologicznego” folikulogenezy spowodowane było niewątpliwie wydłużonym okresem aktywności PMSG (w fali 1) oraz obecnością patologicznych form pęcherzyków przetrwałych (w kolejnych falach). Wyróżniono trzy rodzaje pęcherzyków przetrwałych: pęcherzyki o średnicy ≥ 10 mm (średnio 5,3 (\pm 2,1)), które pochodziły z fali owulacyjnej, pozostawały w jajnikach do ok. 10.-12. dnia cyklu i stanowiły najliczniejszą grupę form patologicznych; pęcherzyki o średnicy ≥ 10 mm (średnio 3 (\pm 1,8)), pochodzące z pierwszej fali po superowulacji, ulegające regresji wraz z luteolizą ciała żółtego; pojedyncze pęcherzyki o średnicy ≥ 14 mm, które przetrwały luteolizę i pozostały w jajnikach po zakończeniu cyklu rujowego. Podobne zjawiska opisano po zastosowaniu gonadotropiny żrebnej klaczy u bydła (26).



Ryc. 3. Liczba pęcherzyków jajnikowych rosnących w poszczególnych falach u kóz poddanych działaniu FSH



Ryc. 4. Porównanie liczby dużych pęcherzyków rosnących w fali owulacyjnej do liczby ciałek żółtych obserwowanych w kolejnym cyklu rujowym

Blokadę wzrostu pęcherzyków obserwowano dopiero w drugiej połowie cyklu rujowego, podczas gdy większą liczbę pęcherzyków przetrwałych odnotowano w pierwszej jego części, mimo że w badaniach przeprowadzonych podczas synchronizacji rui i owulacji z użyciem 500 j.m. PMSG zaobserwowano zablokowanie folikulogenezy już w okresie pojawiania się drugiej fali (20). Najbardziej wiarygodnym uzasadnieniem wydaje się długi, wynoszący około 120 godzin, okres półtrwania PMSG (18, 26), co w powiązaniu z dużą dawką użytą podczas niniejszego doświadczenia, znacznie wyższą niż podczas badań cytowanych powyżej (21), spowodowało, iż stężenie tego hormonu pozostałe we krwi zwierząt było wystarczające do zastymulowania wzrostu jeszcze dwóch, poza owulacyjną falę pęcherzyków. W drugiej części cyklu hormonalna presja ze strony wciąż obecnych patologicznych form pęcherzyków nie pozwoliła na uruchomienie endogennych mechanizmów kontroli wzrostu pęcherzyków, zaś stężenie PMSG było już za niskie, aby efektywnie oddziaływać na jajniki. Związek pomiędzy podaniem wysokiej dawki PMSG a powstawaniem pęcherzyków prze-

trwałych zaobserwowano również u bydła (5, 7, 9), podobnie jak obniżenie płodności, będące odpowiedzią na obecność pęcherzyków przetrwałych w jajniku (4, 23).

Fala owulacyjna osiągnęła podobny poziom wzrostu pęcherzyków do fali 2, co oznacza, że rozwijało się w niej mniej pęcherzyków od przeciętnej fali owulacyjnej cyklu rujowego (21) (ryc. 2). Pomimo obniżonej liczby pęcherzyków poziom owulacji był typowy dla każdego zwierzęcia. U jednej z kóz, po luteolizie ciążki żółtych nie doszło do owulacji i rozpoczął się okres spoczynku płciowego. Trudny do wytłumaczenia jest fakt zachowania typowego dla każdej samicy poziomu owulacji, pomimo wzrostu w fali owulacyjnej mniejszej liczby pęcherzyków. Wydaje się jednak, że poziom owulacji jest cechą tak silnie zdeterminowaną genetycznie, że zmniejszona liczba pęcherzyków w fali nie wywiera na niego dużego wpływu, co potwierdzają badania przeprowadzone w naturalnym cyklu rujowym w okresie wydłużania się dnia świetlnego, jak również w czasie synchronizacji rui (19, 20).

W pierwszej po owulacji fali w grupie 2, podobnie jak miało to miejsce w grupie 1, rosło istotnie więcej pęcherzyków niż w pozostałych falach nieowulacyjnych, średnio 9,8 ($\pm 2,64$), w tym 4,8 ($\pm 0,98$) dużych. Zaznaczyć jednak należy, że w tej grupie pojawiało się w omawianej fali blisko dwukrotnie mniej pęcherzyków niż w grupie 1. Najważniejszym elementem różnicującym reakcję kóz wydaje się znacznie krótszy okres półtrwania FSH we krwi wynoszący ok. 5 godz. (10). Wzrost pęcherzyków w dwóch kolejnych falach przy średniej liczbie 4,92 ($\pm 1,31$), w tym 1,83 ($\pm 0,83$) dużych, był zachowany na poziomie typowym dla fazy lutealnej cyklu rujowego w analogicznym okresie roku (21). Średnia liczba pęcherzyków rosnących w falach nieowulacyjnych nie różniła się istotnie pomiędzy grupami, jeśli jednak rozpatrywać każdą falę z osobna, to w fali pierwszej istotnie więcej pęcherzyków rosło w grupie 1, w fali drugiej różnic nie odnotowano, zaś w fali trzeciej istotnie więcej pęcherzyków rosło w grupie 2. Wskazuje to na fakt, że zaburzenie „rytmu fizjologicznego” pojawiania się fal miało miejsce tylko w grupie 1, otrzymującej PMSG, zaś wpływ zastosowanej stymulacji przy użyciu FSH na późniejszą pracę jajników w grupie 2 był znikomy. W fali owulacyjnej rozwijało się średnio 7 ($\pm 2,45$) pęcherzyków, w tym 4,7 ($\pm 1,86$) dużych, co oznacza istotną różnicę w stosunku do fal 2 i 3 (ryc. 3) oraz w stosunku do grupy 1 pod względem pęcherzyków o średnicy ≥ 5 mm.

Wnioski

1. Przebieg folikulogenezy u kóz w czasie 17-dniowej medykacji octanem fluorogestonu nie różni się od fazy lutealnej naturalnego cyklu rujowego.

2. Użycie PMSG do stymulacji jajników znacząco zwiększa liczbę pojawiających się, rosnących i owulujących pęcherzyków, jednak rozwój pęcherzyków przetrwałych doprowadza do poważnych zaburzeń w przebiegu folikulogenezy w poowulacyjnym cyklu rujowym.

3. Liczba pęcherzyków owulujących po podaniu FSH jest istotnie wyższa niż po PMSG, a w cyklu poowulacyjnym nie powstają przetrwałe pęcherzyki jajnikowe, występuje jedynie nieznaczna hiperstymulacja pierwszej fali wzrostu pęcherzyków.

Piśmiennictwo

1. *Armstrong D. T., Evans G.*: Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 1983, 19, 31-42.
2. *Armstrong D. T., Pfizner A. P., Warnes G. M., Ralph M. M., Seamark R. F.*: Endocrine responses of goats to superovulation with PMSG and FSH. *J. Reprod. Fertil.* 1983, 67, 395-401.
3. *Baril G., Remy B., Leboeuf B., Vallet J. C., Beckers J. F., Saumande J.*: Comparison of porcine FSH, caprine FSH and ovine FSH to induce repeated superovulation in goats. *Proc. 8 Meet. of Eur. Embryol. Trans. Assoc. (Lyon)* 1992, s. 126.
4. *Bo G. A., Adams G. P., Pierson R. A., Mapletoft R. J.*: Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 1995, 43, 31-40.
5. *Boland M. P., Goulding D., Roche J. F.*: Alternative gonadotropin for superovulation in cattle. *Theriogenology* 1991, 35, 5-19.
6. *Cherardi P. C., Martin G. B.*: The effect of multiple injections of pregnant mare serum gonadotropin on the ovarian activity of merino ewes. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 1978, 12, s. 260.
7. *Dieleman S. J., Bevers M. M.*: Effect of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG/PG-treated cows. *J. Reprod. Fertil.* 1987, 81, 533-542.
8. *Driancourt M. A., Fary R. C.*: Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 1992, 27, 279-292.
9. *Gordon I.*: Problems and prospects in cattle egg transfer. *Irish Vet. J.* 1975, 29, 39-62.
10. *Laster B. D.*: Disappearance and uptake of 125I FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J. Reprod. Fert.* 1972, 30, 407-415.
11. *Moor R. M., Osborn J. C., Crosby I. M.*: Gonadotropin induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod. Fertil.* 1985, 74, 167-172.
12. *Nowshari M. A., Beckers J. F., Holtz W.*: Superovulation of goats with purified pFSH supplemented with defined amounts of pLH. *Theriogenology* 1995, 43, 797-802.
13. *Pendleton R. J., Youngs C. R., Rorie R. W., Pool S. H., Memon M. A., Godke R. A.*: Follicle stimulating hormone versus pregnant mare serum gonadotropin for super-ovulation of dairy goats. *Small Rum. Res.* 1992, 8, 217-224.
14. *Quirke J. F., Meyer H. H., Lahlou-Kassi A., Hanrahan J. P., Bradford G. E., Stabenfeldt G. H.*: Natural and induced ovulation rate in prolific and non-prolific breeds of sheep in Ireland, Morocco and New Zealand. *J. Reprod. Fertil.* 1987, 81, 309-316.
15. *Remy B., Baril G., Vallet J. C., Dufour R., Chouvet C., Saumande J., Chupin D., Beckers J. P.*: Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle-stimulating hormone. *Theriogenology* 1991, 36, 389-341.
16. *Rubianes E., Ungerfeld R., Vinales C., Rivero A., Adams G. P.*: Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology* 1997, 47, 1479-1488.
17. *Ryan J. P., Hunton J. R., Maxwell M. C.*: Increases production of sheep embryos following superovulation of merino ewes with a combination of pregnant mare serum gonadotropin and follicle stimulating hormone. *Reprod. Fertil. Develop.* 1991, 3, 551-571.
18. *Schams D., Menzer C., Schallenberger E., Hoffman B., Hahn J., Hahn R.*: Some studies on pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and on endocrine response after application for superovulation in cattle, [w:] Sreenan J. M. (red.): *Control of Reproduction in the cow*. The Hague: Martinus Nijhoff 1978, 122-143.
19. *Schwarz T.*: Dynamika rozwoju pęcherzyków jajnikowych kozy. Praca dokt., Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt AR, Kraków 2003.
20. *Schwarz T., Murawski M., Wierchoś E., Tuz R.*: Oddziaływanie cloprostenolu, oraz gestagenów i PMSG na dynamikę wzrostu pęcherzyków jajnikowych u przeżuwaczy. *Medycyna Wet.* (oddano do druku).
21. *Schwarz T., Wierchoś E.*: Wzrost pęcherzyków jajnikowych w cyklu rujowym kóz. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 194-197.
22. *Sharma V. K., Gupta R. C., Khurama N. K., Khar S. K.*: Oestrus synchronization and superovulation using equine FSH in crossbred ewes. *Vet. Rec.* 1994, 135, 164-165.
23. *Thatcher V. M., de la Sota R. L., Schmitt E. J. P.*: Control and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility. *Reprod. Fertil. Develop.* 1996, 8, 203-217.
24. *Thompson J. G. E., Wales R. G.*: Observations on the loss of the cellular vestment surrounding superovulated sheep oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 1987, 15, 169-175.
25. *Walker S. K., Smith D. H., Frensham A., Ashman R. J., Seamark R. F.*: The use of synthetic gonadotropin releasing hormone treatment in the collection of sheep embryos. *Theriogenology* 1989, 31, 741-752.
26. *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 gonadotropin. *Theriogenology* 1986, 26, 523-540.

Adres autora: dr inż. Tomasz Schwarz, os. Słoneczne 13/41, 31-957 Kraków; e-mail: rzschar@cyf-kr.edu.pl