

Superovulation in cows – the risk factors and selection of donors

Jaśkowski B.M.¹, Herudzińska M.², Kierbić A.², Kmieciak J.², Nowak T.¹, Gehrke M.¹, Veterinary Institute, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences¹, Scientific Circle of Veterinary Students², Poznań University of Life Sciences

This article aims at the presentation of some important issues associated with the bovine embryo transfer. Superovulation (SOV), production of more than one ovum in ovulation, is an important element of embryo transfer. The aim of SOV is to obtain the greatest number of embryos suitable for transfer. Efficiency of the method depends on individual features of donors, such as age, reproductive history, ovary status at the beginning of program and also the environmental factors: climate, nutrition and welfare. Important is also the choice of gonadotropin (FSH or eCG), its dose, time of administration and FSH-LH ratio. Follitropin (Vetoquinol), with a beneficial ratio of FSH-LH (5:1), is available on the domestic market. It has been proven that 6–7 days program offers better results when comparing to 4 days scheme. The addition of hyaluronic acid allows single FSH application, providing a slower absorption of the product and stress reduction. The beginning of SOV can be postponed by intravaginal progesterone releasing devices. Progesterone prolongs the time for follicular development. Follicular waves seem to have the decisive importance for the efficiency of SOV and the best results were achieved in the day when follicular wave was rising. However, if follicular wave is rising earlier or later than it should do, the number of embryos suitable for transfer is decreasing. Controlling follicular waves development and eliminating the dominant follicle improves the outcome of SOV. A larger number of antral follicles react more strongly on hormones. Fixed time artificial insemination (FTAI), enables donors insemination in a strictly defined time, irrespectively of the estrus symptoms.

Keywords: superovulation, donors, cows, stimulation programs, FSH, eCG, Follitropin.

Superowulacja (SOV) jest istotnym elementem transferu zarodków. Polega ona na wywołaniu u krów owulacji mnogiej (1). Celem procesu jest uzyskanie jak największej liczby zarodków przydatnych do transferu (2). Superowulacja prowokowana jest hormonalnie przez podanie egzogennych gonadotropin, najczęściej hormonu folikulotropowego (FSH), końskiej gonadotropiny kosmówkowej (eCG) albo ludzkiej gonadotropiny menopauzalnej (hMG). Aktualnie dostępne są na świecie preparaty FSH produkowane z przysadek bydła (bFSH), koni (eFSH), owiec (oFSH) i świń (pFSH). Specyfiki te zawierają często substancje pomocnicze, np. kwas hialuronowy, które mają na celu przedłużenie

Superowulacja u krów – czynniki ryzyka i selekcja dawczyń

Bartłomiej M. Jaśkowski¹, Magdalena Herudzińska², Aleksandra Kierbić², Julita Kmieciak², Tomasz Nowak¹, Marek Gehrke¹

z Instytutu Weterynarii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach¹ oraz Sekcji Bujatrycznej Studenckiego Koła Medyków Weterynaryjnych² Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

działania FSH podawanego w pojedynczej iniekcji (3). Do niedawna na rynku krajowym preparatów FSH nie było. W najbliższym czasie jednak pojawi się Follitropin (Vetoquinol).

Dawczyni

Dawczyniami mogą być krowy wieloródki lub jałowice. Powinny one być wolne od urzędowo zwalczanych chorób oraz klinicznie zdrowe. W odniesieniu do krów wieloródek preferuje się samice o wysokiej płodności, będące co najmniej 6 tygodni po wycieleniu, które wykazywały przynajmniej dwie pełnoobjawowe ruje (4).

W osiągnięciu satysfakcjonujących wyników superowulacji ważna jest właściwa selekcja samic, dawczyń zarodków (5). Wykazano, że poziom energetyczny dawki pokarmowej, jak i sposób zarządzania stadem to determinanty wpływające na kondycję i stan ogólny krowy, a w konsekwencji na jej odpowiedź na superowulację oraz odsetek zarodków przydatnych do transferu i zdegenerowanych zarodków (6). Do cech osobniczych zalicza się kondycję dawczyni, jej wiek, liczbę przeprowadzonych superowulacji w danym cyklu reprodukcyjnym, rasę, stan jajników w dniu rozpoczęcia superowulacji, dzień rozpoczęcia superowulacji oraz liczbę stwierdzonych pęcherzyków antralnych (7). Niektóre rasy bydła wyróżniają się szczególnie dużą liczbą pęcherzyków antralnych, a rezultaty wypłukiwania zarodków są u nich istotnie wyższe niż u pozostałych. Czynnikiem limitującym wyniki pozyskiwania zarodków i reakcję na gonadotropiny jest także wiek krów dawczyń, który znacząco wpływa na jej odpowiedź na superstymulację. Im starsza dawczyni, tym gorsza odpowiedź na hormony i wyższy odsetek zdegenerowanych zarodków (8, 9).

Nie bez znaczenia pozostaje także stan ogólny dawczyni. Wykazano, że krowy po przebytych zaburzeniach okołoporodowych – szczególnie ciężkich porodach, zatrzymaniu łożyska i zapaleniu błony śluzowej macicy, a także z chorobami gruczołu mlekowego i chorobami racic – są gorszymi dawczyniami od samic niewykazujących tych komplikacji (10). Z innych danych

wynika, że dodatek wydzieliny zapalnej do pożywki stosowanej podczas hodowli zarodków *in vitro* powodował wzrost odsetka zdegenerowanych zarodków. Z drugiej strony dodanie do pożywek czynnika martwicy nowotworów (tumor necrosis factor – TNF α), wytwarzanego w procesie zapalnym, nie miało wpływu na rozwój zarodków produkowanych w warunkach laboratoryjnych (11).

Dawczyniami nie powinny być także krowy wielokrotnie inseminowane (powtarzające). Bourdin i wsp. (12) dowodzą, że mimo satysfakcjonującej reakcji na gonadotropinę od takich samic nie wypłukuje się żadnych zarodków. Szczegółowe badania jednoznacznie wskazują, że powodem tego może być – przynajmniej częściowo – nabyta niedrożność jajowodów. Obecnie ponad 90% dawczyń ras mlecznych to kilkunastomiesięczne jałowice. Możliwe jest pozyskiwanie zarodków od dobrze odżywionych, wykazujących cykle rujowe 12 lub 14–20-miesięcznych jałowic, w przypadku bydła, odpowiednio, ras mlecznych lub mięsnych.

Protokół superowulacji, stosowane preparaty i dawkowanie

Proces superowulacji jest stosunkowo prosty, rozpoczyna się w połowie cyklu rujowego, zwykle między 8. a 14. dniem po naturalnej, indukowanej lub synchronizowanej rui (4). Poglądy odnośnie do wskazania dokładnego terminu startu programu superowulacji we wskazanym wyżej okresie są podzielone. Na superowulację wpływają nie cechy indywidualne dawczyni, ale także rodzaj preparatu gonadotropowego, jego dawka całkowita, a w przypadku FSH czas trwania programu superowulacji oraz miejsce i drogi podania (13). Standardowo FSH podawany jest regularnie przez cztery lub pięć dni co 12 godzin w malejących dawkach. Niewielkie odstępy pomiędzy kolejnymi iniekcjami FSH wynikają z jego krótkiego okresu półtrwania. Przykładowo okres ten dla preparatu Follitropin wynosi 5 godzin. Wykazano, że lepsze rezultaty uzyskuje się po domięśniowym wprowadzeniu preparatu niż po jego podaniu nadoponowo lub

podskórnie. Przedowulacyjny wyrzut LH w przypadku iniekcji domięśniowych pojawia się najszybciej i był najwyższy (14).

Bó i wsp. (15) donoszą, że alternatywą dla domięśniowego podawania FSH może być jednorazowa podskórna iniekcja FSH. Jednak zadowalające wyniki notowano jedynie w przypadku krów, których wskaźnik kondycji ciała (body condition score-BCS) był wyższy niż 3. U krów z mniejszą ilością tkanki tłuszczowej odpowiedź na FSH była słaba lub niedostateczna (15). Donoszono także o podawaniu obniżonej, dodatkowej dawki FSH następującej po podskórnym podaniu pełnej dawki preparatu (16). W takich przypadkach Folltropin był rozpuszczany w 2% roztworze kwasu hialuronowego zapewniającym powolne wchłanianie gonadotropiny (3,17). Mankamentem 2% roztworów kwasu hialuronowego jest kleistość takich preparatów. Z badań Tribulo i wsp. (3) wynika, że zastosowanie 0,5 lub 1% roztworu kwasu hialuronowego pozwalało uzyskać 6,1 i 5,0 zarodków przydatnych do ET. W przypadku końskiej gonadotropiny kosmówkowej (eCG), której okres półtrwania wynosi 40 dni, wystarczająca była jednokrotna iniekcja w dawce 2–3 tys. j.m., u jałowic natomiast dawka nieprzekraczająca 2,5 tys. j.m. Podawanie eCG jest obecnie krytykowane z uwagi na podwyższone ryzyko występowania nieprawidłowości w sekrecji progesteronu po rui, pojawianie się cykli niepołączonych z owulacją pęcherzyka dominującego, torbieli jajnikowych oraz obniżenie jakości produkowanych zarodków (2). Negatywne skutki stosowania eCG próbowano eliminować, aplikując przeciwciała neutralizujące (anti-PMSG, Neutra-PMSG; 8). Podawano je jednokrotnie w postaci dożylnego iniekcji, przeważnie w momencie zastosowania prostaglandyny, ewentualnie 6, 36, 48 lub 60 godzin po jej podaniu, a także przy pierwszej inseminacji. Uzyskiwana poprawa – w odniesieniu do liczby wypłukiwanych zarodków – nie była jednoznaczna, zwiększała się natomiast liczba owulujących pęcherzyków. Wcześniej następował też poowulacyjny spadek produkcji estrogenów (19). Nie odnotowano znaczących różnic w odniesieniu do liczby zarodków przydatnych do transferu w zależności od terminu podania anti-PMSG (20).

Nie bez znaczenia wydaje się także rodzaj zastosowanego FSH oraz proporcja FSH: LH, dawka całkowita użytego preparatu FSH, jego typ oraz seria. Obecnie za sprawę pierwszoplanową uważa się rodzaj zastosowanej gonadotropiny oraz, wynikający z dynamiki fal pęcherzyków jajnikowych stan (obraz) jajników w momencie startu programu superowulacji, a także faza fali pęcherzykowej. Jak wspomniano, do wywoływania superowulacji wykorzystywane są różne preparaty gonadotropowe.

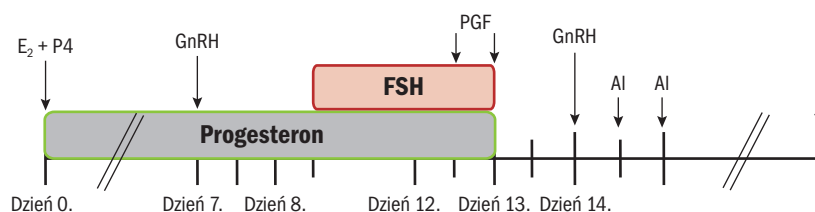
Zasadnicza różnica między nimi polega na wzajemnej relacji FSH do LH. Mihm i wsp. (21) podają, że FSH odpowiada za wzrost pęcherzyka jajnikowego do osiągnięcia przez niego średnicy do 9 mm, natomiast LH wspomaga pęcherzyk na końcowych etapach jego wzrostu. Przykładowo podając 450 µg FSH oraz 4500 µg LH, a dalej 450 µg FSH i 900 µg LH, oraz 450 µg FSH i zaledwie 50 µg LH uzyskiwano odpowiednio 0,5, 2,1 i 4,6 zarodków przydatnych do transferu (22). Równie istotna co relacja FSH do LH wydaje się całkowita dawka preparatu. W badaniach porównywano preparat Folltropin o wzajemnej proporcji FSH do LH 5:1 oraz hMG i FSH-P o relacji FSH do LH odpowiednio 1:1 i 1:5. We wszystkich przypadkach podawano 50, 100 i 200% zalecanej dawki. Efekty były zaskakujące – zbyt wysoka dawka preparatu powodowała obniżenie liczby stwierdzanych w dniu superowulacji ciałek żółtych, liczby zarodków i oocytów, a w końcu liczby zarodków przydatnych do transferu. Podobne obserwacje z zastosowaniem kilku różnych dawek FSH przeprowadzono później, dochodząc do podobnych wniosków. Dawczynie otrzymujące ponadnormalne dawki FSH miały częściej silnie powiększone jajniki, a ultrasonograficzna analiza ich struktury wskazywała na obecność pojedynczych ciałek żółtych i licznych niezowulowanych pęcherzyków jajnikowych. Rezultaty wypłukiwania zarodków od takich samic były niesatysfakcjonujące. Mimo znacznej liczby zarodków i oocytów ogółem, liczba zarodków przydatnych do transferu była niska. Z drugiej strony, użycie dawek poniżej wymaganego optimum zapewniało lepszą proporcję zarodków najwyższej jakości w stosunku do pozostałych (23). W jednym z doświadczeń podanie 500 IU eCG 2 dni przed rozpoczęciem leczenia FSH spowodowało lepszą reakcję dawczyni na superstymulację (24). Natomiast Davis i wsp. (25) donoszą, iż zastąpienie ostatnich dwóch iniekcji FSH przez eCG skutkuje wzrostem odsetka zdalnych do transferu zarodków.

Modyfikacje protokołu superowulacji

Początek programu superowulacji można przesunąć, używając progesteronowych

pesariów. Aplikacja dopochwowej wkładki PRID lub podskórnego implantu norgestometu pozwalała na przesunięcie terminu rozpoczynania superowulacji na 2–6, względnie 13–17 dzień cyklu. Progesteron podany przed iniekcją FSH powodował wzrost liczby owulujących pęcherzyków (26). Podobnie wprowadzenie norgestometu w momencie podania eCG, w celu przedłużenia okresu stymulacji rozwoju pęcherzyków jajnikowych przez supresję wyrzutu LH, a następnie podanie w 54 godzinie – po iniekcji prostaglandyny – GnRH wraz z anti-PMSG, umożliwiało uzyskiwanie zarodków w zbliżonym stadium rozwoju (27, 28). Interesujący program superowulacji z zastosowaniem P4 zaproponował Bó i wsp. (2; ryc. 1). Zakłada on wprowadzenie wkładki progesteronowej w dniu „zerowym” i jednoczesnym podaniem PGF_{2α}. W 7. dniu podawane jest GnRH, natomiast po upływie kolejnych 36 godzin rozpoczyna się seria iniekcji FSH. Prostaglandyna podawana jest dwukrotnie w 3 dniu po 1 iniekcji FSH, następnie usuwa się wkładkę progesteronową. GnRH aplikuje się ponownie 14 dnia programu i przeprowadza dwukrotną inseminację 12 i 24 godziny po iniekcji gonadoliberyny (2).

Istotne modyfikacje wymienionego programu wprowadzili Martins i wsp. (29) oraz Chesta i wsp. (30). Pierwszy z nich wskazuje, że zwiększenie liczby zarodków można osiągnąć poprzez usunięcie wkładki progesteronowej 36 godzin po 1 iniekcji PGF_{2α} i opóźnienie podania GnRH z 48 do 60 godzin po aplikacji pierwszej dawki prostaglandyny, a zatem 24 godziny po usunięciu źródła P4. Podobnie z badań Chesta i wsp. (30) wynika, że opóźnienie usunięcia wkładki progesteronowej PRID zapobiegało występowaniu wczesnych owulacji, a iniekcja GnRH następująca 24 godziny po usunięciu źródła egzogennej progesteronu skutkowała polepszeniem stopnia synchronizacji owulacji oraz zwiększeniem liczby produkowanych zarodków. Występowanie synchronicznych owulacji jest kluczowym czynnikiem decydującym o skuteczności orientowanej w czasie inseminacji (FTAI) w superstymulacji dawczyni (29).



Ryc. 1. Schemat superstymulacji z zastosowaniem wkładki progesteronowej (adaptacja od Bó i wsp., 2014; AI – inseminacja)

Indywidualne cechy dawczyń jako czynniki ryzyka powodzenia superowulacji

Typując dawczynie do wielokrotnego pozyskiwania zarodków w konkretnym cyklu reprodukcyjnym, należy uwzględnić pewną powtarzalność wyniku superowulacji. Z zasady tzw. dobre dawczynie, od których pozyskiwano dużą liczbę dobrych jakościowo zarodków, jednocześnie silnie reagujące na gonadotropiny, powtarzają satysfakcjonujące wyniki po kolejnej superowulacji. Niedostateczną liczbę zarodków pozyskiwano po kolejnej superowulacji od tzw. złych dawczyń (31). Z długoletnich obserwacji wynika, że wybitne pod względem produkcji zarodków jałowice dawczynie zarodków okazywały się równie wydajne w produkcji zarodków po kilku przebytych laktacjach. Dane epidemiologiczne nie potwierdzają jednak szczególnych związków pomiędzy wynikami pierwszej i kolejnych superowulacji u statystycznej dawczynie. Pewnym elementem prognostycznym jest tendencja dawczynie do ciąży bliźniaczych. Selekcja krów pod kątem podwyższonego ryzyka ciąży bliźniaczych wiąże się ze zwiększeniem reakcji jajników na gonadotropiny w porównaniu z krowami po porodach pojedynczych. Na gonadotropiny lepiej reagowało żeńskie potomstwo matek rodzących bliźnięta oraz buhajów zapewniających przewagę ciąży bliźniaczych (32). Jednak badania terenowe wydają się przeczyć tym ustaleniom; obecność dwóch ciałek żółtych w dniu rozpoczęcia superowulacji nie miała korzystnego wpływu na jej efektywność. Różnice między tzw. dobrymi i złymi dawczyniami mogą być też efektem uwarunkowań immunogenetycznych, polegających na występowaniu semilataentnych defektów zapłodnienia lub zaburzeń immunologicznych przejawiających się zamieraniem zarodków. Stwierdzono, że elementem różnicującym płodność u kojarzonych par rodzicielskich może być genotyp charakterystyczny dla zasadowej RNA-zy leukocytów. Stosując heterospermiczne dawki nasienia o genotypach AA, AB i BB, wykazywano mechanizm proselekcyjny, faworyzujący zygoty AA i dyskryminujący zygoty BB (31).

Pozostałe czynniki ryzyka

Obecnie istotne znaczenie dla efektywności superowulacji przypisuje się momentowi wynurzania się fali pęcherzykowej. Podczas cyklu rujowego występują dwie, czasem trzy fale pęcherzykowe. Każda fala rozpoczyna się wzrostem kilku małych pęcherzyków, z których selekcjonuje się duży pęcherzyk dominujący (PD). Po okresie dominacji, trwającym 2–4 dni, pęcherzyk ulega regresji, względnie owuluje (33). Ustalono, że rozpoczynanie superowulacji w dniu wynurzania się fali pęcherzykowej gwarantuje uzyskiwanie satysfakcjonującej liczby pęcherzyków jajnikowych, w konsekwencji bardzo dobrą odpowiedź superowulacyjną. Rozpoczęcie superowulacji przed wynurzeniem się fali, względnie po jej wynurzeniu, obniża efektywność procesu. Proces wynurzania się fali pęcherzykowej można synchronizować. Jednym ze znanych sposobów jest ablacja dwóch największych pęcherzyków jajnikowych 1,5 dnia przed startem superowulacji. W takim przypadku w momencie rozpoczęcia superowulacji pojawia się pożądana, kolejna fala pęcherzykowa. Usunięcie dużego pęcherzyka/ów jest metodą skuteczną, ale nie zawsze wykonalną w warunkach terenowych. Korzysta z niej jednak około 80% zespołów europejskich, dokonując manualnego usunięcia PD. W kraju, oryginalny, prosty instrument do wykluwania pęcherzyków pod kontrolą ultrasonografu oraz wpływ ablacji pęcherzyka w dniu rozpoczęcia SOV na wyniki superowulacji opisał Zbylut (34). Kolejną metodą kontroli pęcherzyka dominującego jest podawanie 4 dni przed rozpoczęciem superowulacji 17- β -estradiolu, benzoesanu estradiolu lub walerianianu estradiolu połączonego z jednoczesną aplikacją progesteronu (2). Schemat z wykorzystaniem estradiolu przedstawił Bó i wsp. (ryc. 2; 35). Także i w tym przypadku wykorzystanie tej metody synchronizacji fali pęcherzykowej nie zawsze jest możliwe. W wielu krajach stosowanie egzogennych estrogenów jest niedozwolone.

Trzecia metoda polega na podawaniu 2 dni przed rozpoczęciem SOV iniekcji GnRH oraz pLH (29, 35). Ta z kolei metoda jest jednak w dużym stopniu

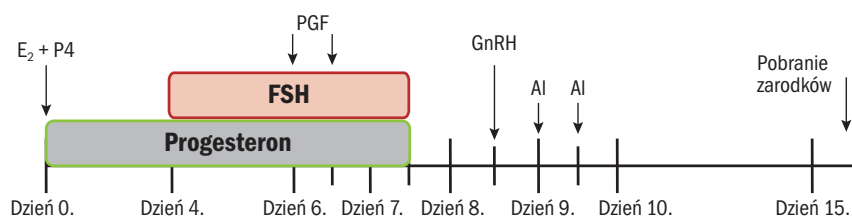
nieprzewidywalna w odniesieniu do efektu superowulacji i zapewnia pełną synchronizację fali jedynie w przypadku owulacji pęcherzyka jajnikowego. Z nieopublikowanych danych terenowych, przeprowadzonych na bydło mięsne, wynika, że uzyskiwane korzystne rezultaty SOV znacząco odbiegają od oczekiwanych, o ile GnRH połączone zostanie z podaniem progesteronu. W takich przypadkach dopochwowa wkładka progesteronowa wprowadzana jest 2 dni przed startem superowulacji i usuwana w ostatnim dniu programu FSH.

W wielu badaniach podkreślano związek pomiędzy liczbą pęcherzyków stwierdzoną w dniu rozpoczęcia SOV a jej efektywnością. Im więcej pęcherzyków jajnikowych o średnicy 2 mm i więcej w dniu rozpoczęcia superowulacji, tym więcej zarodków i oocytów ogółem oraz zarodków przydatnych do ET (36, 37). Pewną rolę w odpowiedzi na superstymulację odgrywa stopień rozwoju pęcherzyków jajnikowych warunkujący ich reakcję na LH. W zasadzie im dłużej trwał program stymulacji hormonalnej, tym większe było prawdopodobieństwo satysfakcjonującej reakcji. Tradycyjny schemat terapii wymaga podawania iniekcji FSH przez 4–5 dni dwukrotnie w ciągu doby. Badania wskazują, że wydłużenie okresu podawania FSH do 6–7 dni korzystnie wpływa na wskaźnik efektywności superowulacji (15, 38). W dniu inseminacji na jajnikach dawczyń, u których zastosowano program 7-dniowy, stwierdzano w 93% obecność dużych >9 mm pęcherzyków, a liczba wartościowych zarodków wyniosła 6,3, podczas gdy w grupie, u której zastosowano program 4-dniowy odsetek dużych pęcherzyków w dniu inseminacji wyniósł 66%, natomiast liczba wypłukanych, dobrych jakościowo zarodków – 4,2 (38).

Wyniki doświadczeń potwierdzają, że tradycyjne 4-dniowe schematy superstymulacji nie mogą zapewnić odpowiedniego czasu na przygotowanie się do owulacji wszystkich pęcherzyków w danej grupie (2). Dias i wsp. wykazali, że 7-dniowa terapia spowodowała 2,5-krotny wzrost liczby wypłukanych zarodków od jednej dawczynie i zwiększenie produkcji zarodków *in vitro* w porównaniu do tradycyjnego 4-dniowego schematu (9, 39).

Inseminacja dawczyń

Po zakończeniu programu superowulacji dawczynie są inseminowane. Standardowo termin unasiwienia przypada 12–16 godzin po rozpoczęciu rui. W Europie przeważa pogląd o konieczności wielokrotnego unasiwienia dawczynie. Zabieg inseminacji przeprowadzany jest przez pracowników technicznych, rzadziej przez



Ryc. 2. Schemat superowulacji z wykorzystaniem wkładki progesteronowej i estradiolu (adaptacja od Bó i wsp., 2006)

lekarzy weterynarii wolnej praktyki lub ekipę embriotransferu. Ruja u dawczyń zarodków pojawia się kilka do kilkunastu godzin wcześniej niż w przypadku rui zakończonych pojedynczą owulacją (7). Korzystając z gotowych programów, dawczyń nie unasienia się po raz pierwszy później niż po upływie 48–54 godzin po indukowanej luteolizie. Do pierwszej inseminacji wykorzystuje się dość często podwójną porcję nasienia (20×10^6 plemników w dawce). Reinseminację przy dwukrotnej inseminacji przeprowadza się po upływie 12–16 godzin. W przypadku unasienniania trzykrotnego zachowuje się – pomiędzy kolejnymi inseminacjami – przeważnie 12-godzinne odstępy. Według nowszych danych dwie inseminacje w zupełności wystarczają do uzyskiwania wysokiego odsetka zapłodnionych komórek jajowych. Ze szczególnych badań wynika, że szczyt wyrzutu LH po luteolizie indukowanej 48 i 60 godzin po podaniu pierwszej iniekcji FSH pojawia się w przedziale od 44 do 48 godzin, przy odchyleniu standardowym około 2 do 12 godzin i jest niemal identyczny u krów i jałowic dawczyń zarodków. Równocześnie od wyrzutu LH do owulacji pierwszych pęcherzyków jajnikowych upływa przeciętnie 24–30 godzin. Owulacja po indukowanej luteolizie trwa od 1,2 godziny do ponad 12 godzin. Przeciętny czas do wystąpienia piku LH występuje u krów otrzymujących PMSG wcześniej niż u krów, którym podawano iniekcje FSH (40,9 godziny wobec 44,9 godziny; 40). Nasienie używane do inseminacji dawczyń powinno być najwyższej jakości. Przy braku takiej gwarancji pewnym rozwiązaniem może być głęboka, drogowa inseminacja (UTJ). Celem sprowadzenia owulacji i uzyskania zarodków o wyrównanym stopniu rozwoju praktykowane jest niekiedy podawanie bezpośrednio przed unasiennianiem iniekcji GnRH.

Obecne protokoły superowulacji zalecają stosowanie inseminacji w ściśle określonym terminie. Celowi takiemu służy aplikacja LH następująca 24 godziny po usunięciu wkładki progesteronowej. W takiej sytuacji inseminacja następuje 12 i 24 godziny po podaniu LH i nie wymaga wcześniejszego wykrywania rui. Schemat ten stosowany jest także z powodzeniem u dawczyń inseminowanych nasieniem seksowanym, z tą różnicą, że pierwsza inseminacja następuje 18, a druga 30 godzin po podaniu LH.

Ocena dawczyń przed zabiegiem wyłukiwania zarodków

Przed zabiegiem pozyskiwania zarodków przeprowadza się ostateczną kwalifikację dawczyń na podstawie badania klinicznego jajników *per rectum*. Określone są wówczas: przybliżone rozmiary jajników, liczba

wyczuwalnych na jajnikach ciałek żółtych, względnie obecność torbieli jajnikowych lub dużych niezowulowanych pęcherzyków. Liczba stwierdzanych na jajnikach ciałek żółtych umożliwia dość precyzyjne określenie stopnia reakcji dawczyń na gonadotropiny. Na ogół stwierdzenie kilku (4–5) ciałek żółtych na jajniku jest dostateczną gwarancją uzyskania dużej liczby zarodków. Gwarancji takiej nie dają natomiast nadmierna reakcja na hormony (więcej niż 8–10 ciałek żółtych na jednym jajniku, jego duże rozmiary). Obecność na jajnikach wyłącznie dużych, niezowulowanych pęcherzyków lub torbieli jest z zasady powodem do dyskwalifikacji dawczyń. Selekcja dawczyń przed rozpoczęciem pozyskiwania zarodków jest istotna, tym bardziej że liczba owulujących pęcherzyków jest zmienna pomiędzy poszczególnymi zwierzętami, nawet w obrębie tej samej rasy, jednak jest dość stała osobniczo (41, 42).

Wiele zespołów rezygnuje także z wyłukiwania zarodków od dawczyń reagujących na gonadotropiny w stopniu niedostatecznym (<2 ciała żółte; 43). W kraju z powodu niesatysfakcjonującej reakcji na gonadotropiny niewyłukiwanych jest od 4 do 17% dawczyń. Do ostatecznej selekcji dawczyń wykorzystuje się coraz częściej bardziej precyzyjne badanie ultrasonograficzne. Pewne znaczenie prognostyczne posiada stwierdzenie licznych ciałek żółtych o homogennej echoteksturze w obrębie USG.

Podsumowanie

Celem obecnie stosowanych programów superowulacji jest uzyskiwanie maksymalnej liczby dobrych jakościowo zarodków. Efekt taki zapewnia stosowanie wysokiej jakości preparatów gonadotropowych o optymalnej proporcji FSH: LH, umiarkowana dawka oraz odpowiednio długi program podawania preparatu. Efektywność superowulacji zależy także od fizjologii fal pęcherzykowych i sposobów kontroli pęcherzyka dominującego. Z kolei błędy zapłodnienia, w efekcie wysoki odsetek zdegenerowanych zarodków i niezapłodnionych komórek jajowych, eliminowane są poprzez orientowaną w czasie inseminację bez konieczność wykrywania rui (2).

Piśmiennictwo

- Machaty Z., Peippo J., Peter A.: Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. *Theriogenology* 2012, **78**, 937–950.
- Bó G.A., Reuben J.M.: Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 2014, **81**, 38–48.
- Tribulo A., Rogan D., Tribulo H., Tribulo R., Mapletoft R.J., Bo G.A.: Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Follitropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology* 2012, **77**, 1679–1685.

- Martens G., Nohner H.P., Leiding C., Schneider F., Becker F., Nuernberg G., Kanitz W.: 326 Optimizing frequency of FSH application for superovulatory treatment in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 2004, **17**, 313–314.
- Wrenzycki C., Stinshoff H.: Bedeutung der Biotechnologie beim Rind in Europa. *Tierärztliche Praxis Großtiere* 2015, **2**, 115–122.
- Jones A.L., Lamb G.C.: Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. *Theriogenology* 2008, **69**, 107–115.
- Hasler J.F.: Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 2014, **81**, 152–169.
- Malhi P.S., Adams G.P., Mapletoft R.J., Singh J.: Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging. *Anim. Reprod. Sci.* 2008, **109**, 100–109.
- Dias F.C., Khan M.L., Adams G.P., Sirard M.A., Singh J.: Granulosa cell function and oocyte competence: super-follicles, super-moms and super-stimulation in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2014, **149**, 80–89.
- Jaśkowski J.M., Antosik P.: XIV doroczny Zjazd Europejskiego Stowarzyszenia Embriotransferu (A.E.T.E) we Francji. *Życie Wet.* 2008, **83**, 946–947.
- Hill J., Gilbert R.: Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. *Aust. Vet. J.* 2008, **86**, 312–316.
- Bourdin P.: Étude des facteurs de variation de la production d'embryons chez les bovins dans le cadre de mid-test. Diss. 2008.
- Jaśkowski J.M.: Superowulacja u krów – rodzaje preparatów gonadotropowych i sposoby ich podawania. *Med. Weter.* 1996, **52**, 347–350.
- Schallenger E., Ulrich P., Möstl E., Fuchs S., Tenhumberg H.: Induction of superovulation in cattle comparing single subcutaneous and repeated epidural with standard intramuscular administration of FSH. *Theriogenology* 1994, **41**, 290.
- Bó G.A., Guerrero D.C., Adams G.P.: Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology* 2008, **69**, 81–87.
- Alvarez R.H., Martinez A.C., Pires R.M.L.: Superovulatory Response of Zebu Cows Treated with pFSH in a Single Subcutaneous Injection Followed by an Additional Intramuscular Sub-Dose 48 h Later. *Repr. dDomest. Anim.* 2010, **45**, 421–424.
- Tribulo A., Rogan D., Tribulo H., Tribulo R., Alasinod R.V., Beltramod D., Biancod I., Mapletoft R.J., Bó G.A.: Superstimulation in beef cattle with a single intramuscular injection of Follitropin-V. *Anim. Reprod. Sci.* 2011, **129**, 7–13.
- Boryczko Z., Bostedt H., Gajewski Z., Witkowski M., Hoffmann B.: Morphological and hormonal changes after superovulation in cows treated with Neutra-PMMSG. *Arch. Vet. Pol.* 1994, **34**, 117–126.
- Goulding D., Williams D.H., Roche J.F., Boland M.P.: Factors affecting superovulation in heifers treated with PMMSG. *Theriogenology* 1996, **45**, 765–773.
- Alfarajji M.M., Broadbent P.J., Hutchinson J.S.M., Dolman D.F., Atkinson T.: Effect of time of administration of monoclonal anti-PMMSG on superovulatory response and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 1989, **31**, 165.
- Mihm M., Baker P., Ireland J. L. H., Smith G. W., Cousins P.M., Evans A.C.O., Ireland J.J.: Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. *Biol. Reprod.* 2006, **74**, 1051–1059.
- Chupin D., Combarous Y., Procureur R.: Antagonistic effect of LH on FSH-induced superovulation in cattle. *Theriogenology* 1984, **21**, 229.
- Kanitz W., Schneider F., Becker F.: Zum Einfluss der FSH-Dosis auf Prozesse des Follikelwachstums und Superovulationsergebnisse beim Rind. *Arch. Anim. Breed.* 1996, **39**, 387–400.
- Caccia M., Tribulo R., Tribulo H., Bó G.A.: Effect of eCG pretreatment on superovulatory response in CIDR-B treated beef cattle. *Theriogenology* 2000, **53**, 495.
- Davis R.L., Arteaga A., Hasler J.E.: 225 addition of equine chorionic gonadotropin to a traditional follicle stimulating hormone protocol for superovulation of Bos taurus beef cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 2012, **24**, 224–225.
- Callejas S., Alberio R., Cabodevila J., Aller J., Catalano R., Teruel M., Dulout E.: Effect of progesterone administration on the ovarian response to superovulatory treatments in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2008, **107**, 9–19.
- Merton J.S., de Roos A.P.W., Mullaart E., de Ruigh L., Kaal L., Vos P.L.A.M., Dieleman S.J.: Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo

- technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 2003, **59**, 651–674.
28. Knijn H.M., Fokker W., van der Weijden G.C., Dieleman S.J., Vos, P.L.: Effects of superovulation with oFSH and Norgestomet/GnRH-Controlled Release of the LH Surge on Hormone Concentrations, and Yield of Oocytes and Embryos at Specific Developmental Stages. *Reprod. Domest. Anim.* 2012, **47**, 177–183.
 29. Martins C.M., Rodrigues C.A., Vieira L.M., Mapletoft R.J., Bó G.A., SáFilho M.F., Baruselli P.S.: The effect of timing of the induction of ovulation on embryo production in superstimulated lactating Holstein cows undergoing fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 2012, **78**, 974–980.
 30. Chesta P., Tribulo L., Tribulo H., Balla E., Baruselli P.S., Bó G.A.: Effect of time of ovulation induction by gonadotrophin releasing hormone or pituitary luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef cows inseminated at a fixed time. *Reprod. Fert. Dev.* 2007, **19**, 307–308.
 31. Jaśkowski J.M.: Superowulacja u krów – nowe dane. *Med. Weter.* 1999, **55**, 292–294.
 32. Snyder D.A.: Superovulation of cows and heifers selected for twinning. *Theriogenology* 1986, **25**, 200.
 33. Peter A.T., Levine H., Drost M., Bergfelt D.R.: Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology* 2009, **71**, 1343–1357.
 34. Zbylut J., Jaśkowski J.M.: Praktyczna metoda eliminacji pęcherzyka dominującego u jałowic. *Magazyn Wet.* 2001, **10**, 58, 28–30.
 35. Bó G.A., Baruselli P.S., Chesta P.M., Martin C.M.: The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 2006, **65**, 89–101.
 36. Singh J., Domínguez M., Jaiswal R., Adams G.P.: A simple ultrasound test to predict the super stimulatory response in cattle. *Theriogenology* 2004, **62**, 227.
 37. Ward F., Lonergan P., Jimenez-Krassel F., Ireland J.J., Evans, A.C.O.: 240 relationship between peak number of antral follicles and follicular waves, hormone concentrations, superovulatory response, and embryo quality in beef heifers. *Reprod. Fert. Dev.* 2006, **18**, 228.
 38. García Guerra A., Tribulo A., Yapura J., Singh J., Mapletoft R.: Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology* 2012, **78**, 353–360.
 39. Dias F.C., Dadarwal D., Adams G.P., Mrigank H., Mapletoft R.J., Singh J.: Length of the follicular growing phase and oocyte competence in beef heifers. *Theriogenology* 2013, **79**, 1177–1183.
 40. Greve T., Callesen H., Hyttel P., Høier R., Assey R.: The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 1995, **43**, 41–50.
 41. Burns D.S., Jimenez Krassel F., Ireland J.L., Knight P.G., Ireland J.J.: Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum folliclestimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 2005, **73**, 54–62.
 42. Ireland J.J., Ward F., Jimenez-Krassel F., Ireland J.L., Smith G.W., Lonergan P., Evans A.C.: Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum. Reprod.* 2007, **22**, 1687–95.
 43. Chebel R.C., Demétrio D.G., and Metzger J.: Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology* 2008, **69**, 98–106.

Lek. wet. Bartłomiej M. Jaśkowski, Instytut Weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach UP, ul. Wołyńska 35, 60-635 Poznań