

A juh szuperovuláció és embrióátültetés eredményességét befolyásoló tényezők. Szezon és hormonális háttér

Vass Nóra¹ – Jávor András¹ – Balogh Péter¹ –
Cseh Sándor²

¹Debreceni Egyetem

Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma,
Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási
Kar, Állattenyésztéstudományi Intézet, Debrecen

²Szent István Egyetem Állatorvostudományi Kar,
Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika, Budapest
vassnora@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Az embrióátültetési programok sikerét számos, már ismert tényező (fajta, típus, szezon, kezelési protokoll) befolyásolja. Feltételezzük továbbá, hogy egyes metabolikus hormonok (IGF-1, pajzsmirigy-hormonok, leptin, inzulin) perifériás vérszintje összefüggésben állhat a szuperovuláció és az embrió transzfer eredményességével. Eredményeink szerint a fent említett metabolikus hormonok közül az inzulin és az IGF-1 perifériás vérszintje között szezonon belül és kívül szignifikáns különbség van. Továbbá, az inzulin és IGF-1 perifériás vérszintje a vemhes recipiensekben kevésbé drasztikus csökkenést mutat, mint a nem vemhesekben.

Kulcsszavak: juh, embrióátültetés, metabolikus hormonok

SUMMARY

Success of the embryo transfer programs is affected by many factors (breed, type, season, treatment). We assume, that peripheral blood level of some metabolic hormones (IGF-1, thyroid hormones, leptin, insulin) affects the success of superovulation and ET. According to our results, there is a significant difference between the in and out of season peripheral blood level of IGF-1 and insulin. Furthermore, decrease in the periferic blood levels of IGF-1 and insulin is less drastic in the pregnant recipients.

Keywords: sheep, embryo transfer, metabolic hormones

BEVEZETÉS

Az embrióátültetési programokban a szuperovuláció elengedhetetlen ahhoz, hogy a donorokból az élettani értéknél nagyobb számú embriót nyerjünk, és ültethessünk be recipiens állatokba. Az utóbbi években a hormonkészítmények tisztasága nagymértékben javult, de a hatékonyság lényegesen nem változott. A szuperovuláltatott állatok 30%-a nem reagál a kezelésre, 30%-a gyengén reagál (1-4 embrió), 30%-a jó reakciót mutat (5-10 embrió), és csak 10%-a reagál rekord embriótermeléssel (Cseh és Dohy, 2003). Az ilyen mértékű variabilitás fő okaiként a donor fajta, típus, a szezon, és a kezelési protokoll említhetőek (Torres et al., 1987). Feltételezzük továbbá, hogy egyes

metabolikus hormonok (IGF-1, pajzsmirigy-hormonok, leptin, inzulin) perifériás vérszintje embrióátültetési programok során is összefüggésben állhat

(a) **donor** anyákban a többszörös ovuláció standard módszerekkel történt kiváltása nyomán az *ovulációs válaszkészséggel* (amelyet az ovulációs ráta, a képződő sárgatestek száma és P4-termelése, valamint a standard módon kimosható embriók száma és esetleg minősége testesít meg);

(b) **recipiens** anyákban a ciklus standard módszerekkel történő szinkronizációját követően a képződő sárgatestek (CL) számával és P4-termelésével, továbbá az embrióátültetések eredményességével.

A vázolt összefüggések mértéke az őszi tenyészedőszakban feltehetően kisebb fokú, mint a tavaszi (tenyész-szezonon kívüli) időszakban, illetve befolyásolhatja azt a sebészi embriókinyerés, illetve embrió-beültetés előtti – sebésztechnikai okból egyébként elengedhetetlenül szükséges, világszerte alkalmazott és elfogadott – 24-48 órás takarmánymegvonásra adott metabolikus és endokrin válasz is.

In vitro tanulmányok alátámasztották, hogy az inzulin és az IGF-1 fontos mediátorai a folliculogenezisnek, szteroidogenezisnek, az oocyta érésének és az embriófejlődésnek (Gong et al., 1993a, b, 1994; Totey et al., 1996). Tehenekben már megállapításra került az a tény, hogy az inzulin és az IGF-1 perifériás vérszintje pozitívan korrelál az ovulációs rátával (Gong et al., 1997).

A kecskék szuperovuláltatása előtti inzulinkezelés jótékony hatással van az ovulációs rátára, a folliculus növekedésére, és megelőzi a folliculus atréziát (Selvaraju et al., 2003). A fent említett közlemény ellenére kiskérődzőkben a metabolikus hormonok vizsgálata az ovulációs rátával, az oocyta és az embriófejlődéssel összefüggésben még igen szegényes. Kísérletünk célja az volt, hogy információt szerezzünk egyes metabolikus hormonok szezonbeli/szezonon kívüli perifériás vérszintjeiről, valamint, hogy bizonyítást nyerjen ezen hormonoknak az ovulációs rátára, az oocyta és az embriófejlődésre kifejtett hatása.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatainkat szezonon belül (február) és szezonon kívül (április) is 16-16 klinikailag egészséges, 2-5 éves korú, egy éven belül ellett, de már nem tejelő, közepes vagy jó tápláltsági állapotú merinó egyedeken végeztük. Az állatokat a hazai üzemi körülményeket reprezentáló módon tartottuk és

takarmányoztuk. A ciklust/ovulációt a biológiai tenyész-szezonban, valamint a tavaszi acikliás időszakban azonos módszerrel indukáljuk/szinkronizáljuk, és évszakonként megegyezik a szuperovuláció előidézésének, valamint az ovariális válaszkészség nyomon követésének a módja is (1. táblázat).

1. táblázat

A donor és recipiens anyajuhokban alkalmazott kezelési (szuperovuláció, ivarzás-szinkronizálás) és mintagyűjtési protokoll

Kezelési nap(1)	Időpont(2)	Beavatkozás(3)	
		Donorok(4)	Recipiensek(5)
1	Reggel 8 h(6)	Gesztagén-forrás ¹ behelyezése(7)	
12	Reggel 8 h	FSH kezelés ² (8)	---
	Este 8 h(9)	FSH kezelés ²	---
13	Reggel 8 h	FSH kezelés ²	---
	Este 8 h	FSH kezelés ²	---
14	Reggel 8 h	FSH kezelés ²	Gesztagén-forrás eltávolítása + eCG ³ (10)
	Este 8 h	FSH kezelés ² + gesztagén-forrás eltávolítása(11)	---
15-16-17	Reggel/este(12)	---	Ivarzásmegfigyelés ⁴ (13)
16	Reggel 8 h	Mesterséges termékenyítés (laparoszkópiás) + GnRH ⁵	Ivarzásmegfigyelés ⁴
		Ezt követően: fedeztetés ⁶ (14)	
		Vérmenták gyűjtése metabolikus és hormonális vizsgálatokra (továbbiakban: d0 minta)(15)	
19	Reggel 8 h	Vérmenták gyűjtése metabolikus és hormonális vizsgálatokra (továbbiakban: d2 minta), majd 24-48 óra teljes táplálékmegevonás(16)	
21	Reggel 8 h	Embriókinyerés ⁷ (17)	Embrióbeültetés ⁷ (18)
		(a) Vérmenták gyűjtése metabolikus és hormonális vizsgálatokra (továbbiakban: d3/4 minta)(15)	

¹ 20 mg Cronolon (szin.: Fluorogeston; Chronogest CR hüvelyszivacs, Intervet, Angers, Franciaország)(19)

² Folicotropin (Spofa, Csehország)(20)

³ 500 NE vemhes kanca szérum-gonadotropin (eCG, korábbi szin.: PMSG; Folligon inj, Intervet, Angers, Franciaország)(21)

⁴ Vasectomizált kereső kosokkal(22)

⁵ 50 µg Buserelin acetát (Receptal inj., Intervet, Angers, Franciaország)(23)

⁶ Tenyészkosoknak a donorok közé helyezésével (háremzetetés; kisonként 4 anyajuh)(24)

⁷ A 48 órás teljes táplálékmegevonást követően(25)

Table 1: Treatment (superovulation and synchronisation) and sample collection protocol of donor and recipient ewes

Treatment day(1), time(2), treatment(3), donors(4), recipient(5), morning(6), gestagen in(7), FSH(8), evening(9), gestagen out(10), FSH+gestagen out(11), morning/evening(12), heat observing(13), mating/ai(14), blood sample(15), blood sample+starving(16), embryo collection(17), embryo transfer(18), cronolon(19), folicotropin(20), PMSG(21), vasectonisep rams(22), receptal(23), rams(24), after 48 h harving(25)

A donor állatok esetében a *termékenyítés* időpontjában (továbbiakban: d0 minta), a takarmánymegvonás kezdetén (továbbiakban: d2 minta), valamint az *embriókinyerés* időpontjában (továbbiakban: d3/4 minta) gyűjtöttünk vérmintát. Recipiensek esetében az *ivarzás feltételezett időpontjában* (azaz a gesztagénkezelés kezdete utáni 16. napon; a továbbiakban: d0 minta), a takarmánymegvonás kezdetén (továbbiakban: d2 minta), valamint az *embrióbeültetés* időpontjában (továbbiakban: d3/4 minta) történt a vérvétel.

A vérminták laboratóriumi feldolgozása során mindkét kísérletben, a februári és az áprilisi ciklusban is meghatároztuk egyes metabolikus hormonoknak (IGF-1, T4, T3, inzulin), továbbá a CL jelenlétéről, és a lutealis aktivitás mértékéről tájékoztató progeszteronnak (P4) a vérszintjét.

Statisztikai elemzés

A csoportok közötti különbségeket egy és két mintás T-próbával, SPSS 13.0 programmal értékeltük.

EREDMÉNYEK

A februári (szezonon belüli) ciklusban szuperovuláltatott donorok eredményei igen variábilisak, bizonyos egyedek igen jó eredményeket produkáltak, míg mások nem reagáltak a kezelésre (2. táblázat).

Az áprilisi (szezonon kívüli) ciklus donor eredményei mindenben elmaradnak a szezonon belüli eredményektől (3. táblázat).

2. táblázat

A februári (szezonen belüli) ciklus donor eredményei

Fülszám(1)	Képződött corpus luteum, db(2)		Kimosott embrió, db/beültetésre alkalmas embrió, db(3)
	Jobb petefészkek(4)	Bal petefészkek(5)	
4331	0	0	0
4249	0	0	0
4187	7	9	20 (18)
419	1	3	3 (2)
414	2	4	4
4176	9	11	13
52107	10	7	16

Table 2: Donor results of the experiment conducted in February

Number(1), CL(2), flushed embryo/embryo transferred(3), right ovarium(4), left ovarium(5)

3. táblázat

Az áprilisi (szezonen kívüli) ciklus donor eredményei

Fülszám(1)	Képződött corpus luteum, db(2)		Kimosott embrió v. petesejt db/beültetésre alkalmas embrió, db(3)
	Jobb petefészkek(4)	Bal petefészkek(5)	
52106	6	3	6/1
416	0	0	0
4171	4	1	1/0
448	3	2	2/0
4289	5	3	5/5 (2 sejtes)
4403	0	0	0

Table 3: Donor results of the experiment conducted in April

Number(1), CL(2), flushed embryo/embryo transferred(3), right ovarium(4), left ovarium(5)

Az IGF-1 szezonon belüli és azon kívüli perifériás vérszintjei között szignifikáns különbség van (1. ábra). Ugyanez állapítható meg az inzulinról is (2. ábra).

A februári és az áprilisi ciklusban is az IGF-1 perifériás vérszintje a 2. és 3. vérvétel között szignifikánsan csökkent, és ugyanez állapítható meg az inzulin esetében is. Ugyanakkor a P4 perifériás vérszintje mindkét vizsgált hónapban növekedett.

Az adatok alapján feltételezzük továbbá, hogy a juhban is összefüggés van az IGF-1 és az inzulin csökkenés mértéke és a donorok ovulációs rátája között. (A kis elemszám és az értékek közötti nagy szórás miatt ezt statisztikai próbákkal még nem támaszthatuk alá, de az adatok további feldolgozása folyamatban van.)

Megállapítható továbbá az, hogy a táplálékmegevonás előtt mért IGF-1 és inzulin szinteknek az ET időpontjában mértékhez képesti csökkenés intenzitása befolyásolja az embriók megtapadását.

Azok az állatok, amelyekben a fent említett időpontokban az IGF-1 és az inzulin szint csökkenés kevésbé volt drasztikus, vemhesnek bizonyultak (4. táblázat).

1. ábra: IGF-1 d0 értéke a februári és áprilisi időszakban (n=16)

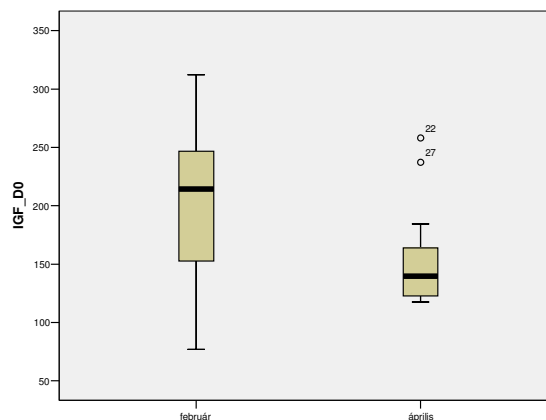


Figure 1: d0 results of the IGF-1 in February and in April (n=16)

2. ábra: Az inzulin d0 értéke a februári és áprilisi időszakban (n=16)

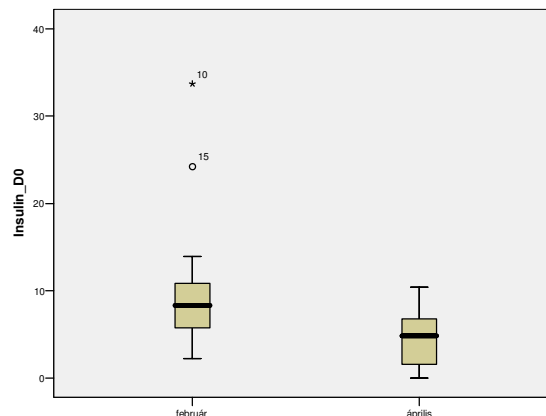


Figure 2: d0 results of insulin in February and in April (n=16)

4. táblázat

A recipiensek inzulin és IGF-1 eredményei

	Inzulin D2 uIU/ml	InzulinD 3/4 uIU/ml	IGF-1 D2 ng/ml	IGF-1 D3/4 ng/ml
Nem vemhes(1)	4,2656	2,1322	174,66	123,8444
Vemhes(2)	4,5	2,6986	163,10	114,7214

Table 4: Insulin and IGF-1 results of the recipient ewes Pregnant(1), not pregnant(2)

MEGBESZÉLÉS

Számos, a bevezetésben feltett kérdés megválaszolásához közelebb jutottunk, de kísérletünk a relatíve kis egyedszám miatt mindenképpen „előkísérletként fogható fel”. Irodalmi adatok alátámasztják, hogy az inzulin és az IGF-1 fontos mediátorai a folliculogenezisnek, szteroidogenezisnek, az oocita érésének és az embriófejlődésnek. Ezeket az összefüggéseket azonban, tudomásunk szerint nem vizsgálták még a juh embrióátültetési programok eredményességére kifejtett hatásukkal kapcsolatban. A juh embrióátültetési programok előtti, műtéttechnikailag elkerülhetetlen „éheztetést” is befolyásoló

tényezőként vizsgáljuk kísérletsorozatunkban. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az IGF-1 és az inzulin perifériás vérszintje szezonon kívül csökken, mely hozzájárulhat – a fent vázolt összefüggések alapján – a szezonon kívüli ET program eredménytelenségéhez.

Az IGF-1 és az inzulin perifériás vérszintje a 2. és 3. vérvétel között szignifikánsan csökkent. Ez az eredmény a két időszak közötti táplálékmegevonással magyarázható. Az adatok alapján mindezek mellett megállapítottuk, hogy a táplálékmegevonás előtt mért IGF-1 és inzulin szinteknek az ET időpontjában mértekhez képesti csökkenés intenzitása befolyásolhatta recipiens állatokban az embrió megtapadásának valószínűségét.

IRODALOM

- Cseh S.-Dohy J. (2003): Asszisztált reprodukciós technikák (ART) a hazai állattenyésztési gyakorlatban: történeti áttekintés. Állattenyésztés és Takarmányozás, 52. 1. 3-15.
- Gong, J. G.-McBride, D.-Bramley, T. A.-Webb, R. (1993a): Effects of recombinant bovine somatotropin, insulin- like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cell in vitro. J Endocrinol. 139:67-75.
- Gong, J. G.-Bramley, T. A.-Webb, R. (1993b): The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. J Reprod Fertil. 97:247-54.
- Gong, J. G.-McBride, D.-Bramley, T. A.-Webb, R. (1994): Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin- like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. J Endocrinol. 143:157-64.
- Gong, J. G.-Baxter, G.-Bramley, T. A.-Webb, R. (1997): Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose response study. J Reprod Fertil. 110:91-7.
- Selvaraju, S.-Agarwal, S. K.-Karche, S. D.-Majumdar, A. C. (2003): Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. Theriogenology, 59. 1459-1468.
- Torres, S.-Cognié, Y.-Colas, G. (1987): Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-p. Theriogenology 27, 407-419.
- Totey, S. M.-Pawshe, C. H.-Appa Rao, K. B. C. (1996): In vitro maturation of buffalo oocytes: role of insulin and its interaction with gonadotrophins. J Reprod Fertil. 50(Suppl):113-9.