

DEBRECENI EGYETEM

AGRÁRTUDOMÁNYI
KÖZLEMÉNYEK **40.**

ACTA AGRARIA DEBRECENIENSIS

2010



	Oldal		Page
<i>Vass Nóra – Jávor András – Balogh Péter – Cseh Sándor:</i>		<i>Nóra Vass – András Jávor – Péter Balogh – Sándor Cseh:</i>	
A juh szuperovuláció és embrióátültetés		Factors affecting the efficiency of superovulation and	
eredményességét befolyásoló tényezők. Szezon és		embryo transfer. Season and hormonal background	
hormonális háttér	73	73

IRODALOM

- Bendich, A. (1989): Carotenoids and the immune response. *Journal of Nutrition*, 119. 112-115.
- Block, G.-Patterson, B.-Subar, A. (1992): Fruit, vegetable, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*; 18. 1-29.
- Fawzi, W. W.-Herrera, M. G.-Willett, W. C.-el Amin, A.-Nestel, P.-Lipsitz, S.-Spiegelman, D.-Mohamed, K. A. (1993): Vitamin A supplementation and dietary vitamin A in relation to the risk of xerophthalmia. *American Journal of Clinical Nutrition*; 58. 385-391.
- Katner, M. (1998): Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proceedings of the Nutrition Society* 12. 9-13.
- Réthy K.-Kiss Zs.-Kerti A.-Bárdos L. (2006): Likopin kiegészítés hatása a tojássárgája színére és koleszterin tartalmára – MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2006. 33. 1.
- Ribaya-Mercado, J. D.-Fox, J. G.-Rosenblad, W. D.-Blanco, M. C.-Russell, R. M. (1992): β -Carotene, retinol and retinyl ester concentrations in serum and selected tissues of ferrets fed β -carotene. *Journal of Nutrition*; 122. 1898-1903.
- Sheldon, B. W.-Curtis, P. A.-Dawson, P. L.-Ferket, P. R. (1984): Effect of dietary vitamin E on the oxidative stability, flavor, color, and volatile profiles of refrigerated and frozen turkey breast meat. *Departments of Food Science and Poultry Science North Carolina State University, Raleigh, North Carolina 27695-7624.*
- Snodderly, D. M. (1995): Evidence for protection against age-related macular degeneration (AMD) by carotenoids and antioxidant vitamins. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62. 1448-1461.
- Stahl, W.-Sies, H. (1998): The role of carotenoids and retinoids in gap junctional communication. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*; 68. 354-359.
- Szalai I. (1974): *Növényélettan I-II.* Tankönyvkiadó, Budapest, 290-392.

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

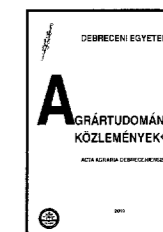
SUMMARY

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 tenyészidőszakban feltehetően kisebb fokú, mint a tavaszi (tenyész-szezonon kívüli) időszakban, illetve befolyásolhatja azt a sebési 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 tenyésztés-szezonban, valamint a tavaszi acikliás időszakban azonos módszerrel indukáljuk/szinkronizáljuk, és évszakonként megegyezik a szuperovuláció előidézésének, valamint az ovariális választésszég 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 Ezt követően: fedeztetés ⁶ (14)	Ivarzásmegfigyelés ⁴
		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 táplálékmevönás(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 hüvelyiszivacs, 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 Tenyésztésnek a donorok közé helyezésével (háremzetetés; kosonként 4 anyajuh)(24)
⁷ A 48 órás teljes táplálékmevönást 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 takarmánymevönás 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 takarmánymevönás 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 progesteronnak (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 szuperovulált 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 (szezonon belüli) ciklus donor eredményei

Fülszám(1)	Képződött corpus luteum, db(2)		Kimosott embrió, db/beültetésre alkalmas embrió, db(3)
	Jobb petefészek(4)	Bal petefészek(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 (szezonon kívüli) ciklus donor eredményei

Fülszám(1)	Képződött corpus luteum, db(2)		Kimosott embrió v. petesejt db/beültetésre alkalmas embrió, db(3)
	Jobb petefészek(4)	Bal petefészek(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 táplálékmevönás 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)

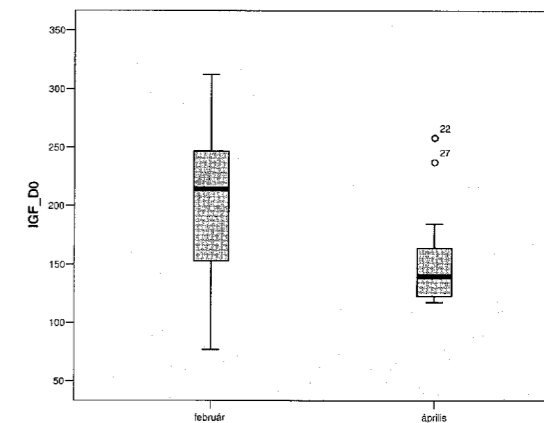


Figure 1: d0 results of the IGF-1 in February and in April (n=16)

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

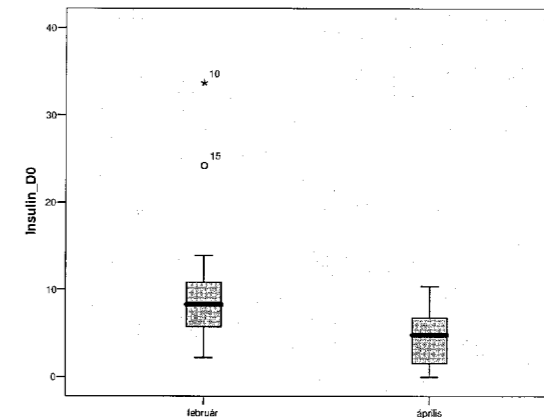


Figure 2: d0 results of insulin in February and in April (n=16)

4. táblázat

A recipiens inzulín és IGF-1 eredményei

	Inzulín D2 uIU/ml	Inzulín D 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 oocyta érésének és az embriófejlődésnek. Ezeket az összefüggéseket azonban, tudásunk 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 táplálékmegegyezéssel magyarázható. Az adatok alapján mindezek mellett megállapítottuk, hogy a táplálékmegegyezés előtt mért IGF-1 és inzulin szinteknek az ET időpontjában mértékhöz 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.