

Indukowanie owulacji u królików poprzez podanie analogu GnRH – desloreliny w dawce inseminacyjnej

Piotr Gogol

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Wstęp

Króliki są zwierzętami, u których występuje owulacja prowokowana, zwana również indukowaną. Przy tym typie owulacji krycie powoduje wystąpienie u samic odruchu neurohormonalnego, który indukuje wyrzut LH z przysadki mózgowej, prowadzący do owulacji. W sytuacji, gdy rozród królików jest prowadzony przy zastosowaniu unasienniania, brak jest bodźców charakterystycznych dla krycia i konieczne jest sztuczne wywołanie owulacji. W praktyce, najczęściej stosowaną metodą wywoływania owulacji u królic jest iniekcja domięśniowa hormonu GnRH lub jego syntetycznych analogów. Obecnie z powodzeniem są stosowane różne analogi GnRH, np. gonadorelina, buserelina, triptorelina, leuprolerina itp. Alternatywną metodą wywoływania owulacji u królic może być dopochwowe podanie GnRH lub jego analogów w dawce inseminacyjnej (Viudes-de-Castro i in., 2007; Quintela i in., 2009; Zapletal i Pavlik, 2008; Vicente i in., 2008). Takie postępowanie ma szereg zalet. Rezygnacja z iniekcji domięśniowej powoduje zmniejszenie stresu i wyeliminowanie bólu, przyczyniając się do poprawy dobrostanu zwierząt. Dodanie hormonu do rozcieńczalnika już w stacji unasienniania, przy przygotowywaniu dawek nasienia, pozwala na uproszczenie procedury inseminacji i zmniejszenie czasu, jaki hodowca musi poświęcić na inseminację samicy. Zaletą takiego postępowania jest również wyeliminowanie odpadów niebezpiecznych dla środowiska, takich jak igły, strzykawki czy opakowania po hormonach.

Badania prowadzone przez Quintela i in. (2004), Vicente i in. (2008), Viudes-de-Castro i in. (2007) pokazały, że dopochwowe podanie analogu GnRH – busereliny może wywołać podobny efekt, jak w przypadku iniekcji domięśniowej. Jednakże, aby uzyskać porównywalne wyniki płodności, dawka busereliny podana dopochwowo musi być około 15 razy większa w porównaniu do podanej w iniekcji domięśniowej (Quintela i in., 2004). Analogi GnRH są absorbowane przez błonę śluzową pochwy około 5 razy mniej efektywnie niż w przypadku podania domięśniowego (Okada i in., 1982), dlatego konieczne jest poszukiwanie i testowanie analogów o wysokiej aktywności. Jednym z nich jest deslorelina, której aktywność jest 14 razy wyższa w porównaniu do gonadoreliny (Conn i Crowley, 1991).

Celem przeprowadzonych badań była ocena zdolności desloreliny, podanej w dawce inseminacyjnej, do wywoływania owulacji u królików.

Materiał i metody

Materiał doświadczalny stanowiły dojrzałe płciowo króliki, samce i samice linii syntetycznej Hyplus. Badania przeprowadzono na 414 samicach w laktacji, wieloródkach odchowywanych po 10 młodych. W celu synchronizacji rui 8 dni przed planowaną inseminacją zmieniano program świetlny w hali produkcyjnej, wydłużając dzień świetlny z 10 do 16 godzin na dobę. Drugą metodą, stosowaną w celu wywołania rui,

było oddzielenie samic od młodych na okres 24 godzin przed inseminacją. Samice dzielono losowo na dwie grupy i unasieniano w czternastym dniu po wykocie, stosując dwie metody wywoływania owulacji. W grupie kontrolnej samicom podawano 1 µg busareliny (Receptal, Hoechst, Niemcy) w iniekcji domięśniowej bezpośrednio po unasienianiu. W grupie doświadczalnej owulację wywoływano poprzez dopochwowe podanie 15 µg desloreliny, wprowadzonej do dawki inseminacyjnej.

Nasienie użyte do inseminacji pochodziło od 20 samców. Po pobraniu ejakulaty rozcieńczano wstępnie (1:5) rozcieńczalnikiem komercyjnym Galap (IMV, Francja) i oceniano ruch postępowy plemników oraz ich koncentrację. Ruch plemników oceniano subiektywnie przy użyciu mikroskopu wyposażonego w stolik podgrzewczy. Koncentrację plemników określano metodą mikroskopową przy użyciu komory Bürkera. Ejakulaty, charakteryzujące się ruchem postępowym plemników na poziomie minimum 70% łączono, a następnie rozcieńczano rozcieńczalnikiem Galap do uzyskania koncentracji plemników na poziomie 50 mln/ml. Rozcieńczone nasienie dzielono na 2 części. Pierwsza część, bez dodatku GnRH, była użyta do inseminacji samic w grupie kontrolnej. Druga część, z dodatkiem desloreliny (30 µg/ml), była użyta do inseminacji samic w grupie doświadczalnej.

Samice inseminowano przy użyciu jednorazowych, plastikowych pipet dawką nasienia o objętości 0,5 ml, zawierającą 25 mln plemników. Efektywność owulacji oceniano na podstawie odsetka samic wykończonych oraz średniej liczby królików urodzonych w miocie.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica ver. 12.0. Istotność różnic sprawdzano testem chi kwadrat w przypadku odsetka samic wykończonych oraz testem t w przypadku liczby młodych urodzonych w miocie.

Wyniki i ich omówienie

Wyniki inseminacji po wprowadzeniu 15 µg desloreliny do dawki inseminacyjnej przedstawiono w tabeli 1. Stwierdzono istotny wpływ sposobu wywoływania owulacji na odsetek samic wykończonych. W grupie doświadczalnej odsetek samic wykończonych był o 8,4% wyższy niż w grupie kontrolnej. Nie stwierdzono istotnego wpływu sposobu wywoływania owulacji na średnią liczbę młodych urodzonych w miocie. W grupie doświadczalnej średnia liczba młodych urodzonych w miocie ogółem (10,14) i żywych (9,28) była nieco niższa w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio 10,48 urodzonych ogółem i 9,75 żywych).

Table 1. Wpływ podania desloreliny w dawce inseminacyjnej na wskaźniki reprodukcyjne inseminowanych samic (średnia±SD)

Table 1. Effect of deslorelin addition to insemination dose on reproductive performance of rabbit does (mean±SD)

Grupa Group	Liczba samic inseminowanych No. of females inseminated	Odsetek samic wykończonych Kindling rate	Urodzone żywe Live born	Urodzone ogółem Total born
Kontrolna Control	190	74,2a	9,75±3,12	10,48±2,65
Doświadczalna Experimental	224	82,6b	9,28±3,09	10,14±2,73

a,b – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P < 0,05$).

a, b – values in columns with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

W ostatnim czasie przeprowadzono szereg badań, dotyczących wprowadzania analogów GnRH do dawki inseminacyjnej u królików (Quintela i in., 2009; Vicente i in., 2011; Rebollar i in., 2012; Gogol in., 2014). Uzyskane wyniki są zachęcające, ale przed wprowadzeniem tej metody wywoływania owulacji do praktyki fermowej konieczne są dalsze prace nad określeniem przydatności poszczególnych analogów GnRH, określeniem optymalnych dawek oraz czynnikami wpływającymi na efektywność absorpcji hormonów. Do tych czynników zalicza się: stan błony śluzowej pochwy (Okada i in., 1984), jej aktywność peptydazową (Acartürk i in., 2001), skład rozcieńczalnika (Okada i in., 1982) oraz rodzaj analogu (Padula, 2005).

Obserwacje Quinteli i in. (2004) wskazują, że absorpcja hormonu przez błonę śluzową pochwy przebiega szybciej niż to ma miejsce przy iniekcji domięśniowej. Jednakże przypuszcza się, że znaczna część hormonu, dostarczonego w dawce inseminacyjnej, nie ulega absorpcji i dlatego dawka ta powinna być znacznie wyższa niż w przypadku iniekcji domięśniowej.

Prezentowane wyniki potwierdzają obserwację Quinteli i in. (2009), że podanie analogu GnRH – desloreliny w dawce inseminacyjnej jest skuteczną metodą wywoływania owulacji u królików. Nie potwierdzają natomiast obserwacji, że do uzyskania normalnej płodności i plenności konieczna jest wysoka dawka hormonu, na poziomie 25 µg na samicę. Należy jednak zauważyć, że autorzy ci przetestowali dawki desloreliny tylko na poziomie 25 i 30 µg

na samicę, a ponadto przeprowadzili badania na niewielkiej liczbie zwierząt (29 i 30 samic w grupach doświadczalnych). Użycie różnych rozcieńczalników, MA-24 u Quinteli i in. (2009) i Galapu w prezentowanych badaniach, może być również istotną różnicą, biorąc pod uwagę fakt, że skład rozcieńczalnika jest uważany za czynnik wpływający na efektywność absorpcji hormonów. Okada i in. (1982) sugerują, że właściwości chelatujące i zakwaszające kwasów organicznych mogą zwiększać absorpcję niektórych analogów GnRH przez błonę śluzową pochwy. MA-24 i Galap są rozcieńczalnikami komercyjnymi, nie jest zatem możliwe porównanie poziomu występujących w ich składzie kwasów organicznych.

Podsumowanie

W podsumowaniu można stwierdzić, że zastosowany w prezentowanych badaniach analog GnRH, podany w dawce inseminacyjnej w ilości 15 µg na samicę, skutecznie indukuje owulację u samic karmiących. Niezbędne są jednak dalsze badania nad wpływem składu rozcieńczalnika na absorpcję analogów GnRH przez błonę śluzową pochwy.

Podziękowania:

Dziękuję Panu Dariuszowi Maciejewskiemu za udostępnienie zwierząt i pomoc techniczną przy realizacji badań.

Literatura

- Acartürk F., Parlatan Z., Saracogolu F. (2001). Comparison of vaginal aminopeptidase enzymatic activities in various animals and in humans. *J. Pharm. Pharmacol.*, 53: 1499–1504.
- Conn P.M., Crowley W.F. (1991). Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N. Engl. J. Med.*, 324: 93–103.
- Gogol P., Trzcńska M., Bryła M. (2014). Motility, mitochondrial membrane potential and ATP content of rabbit spermatozoa stored in extender supplemented with GnRH analogue [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide. *Pol. J. Vet. Sci.*, 1 (4): 571–575.
- Okada H., Yamazaki I., Ogawa Y., Hirai S., Yashiki M.T., Mima H. (1982). Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analog (leuprolide) in rats. I. Absorption by various routes and absorption enhancement. *J. Pharm. Sci.*, 71: 1367–1371.
- Okada H., Yashiki T., Mima H. (1984). Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone-releasing hormone analogue (leuprolide) in rats. III: Effect of estrous cycle on vaginal absorption of hydrophilic model compounds. *J. Pharm. Sci.*, 73: 298–302.
- Padula A.M. (2005). GnRH analogues – agonists and antagonists. *Anim. Reprod. Sci.*, 88: 115–126.

- Quintela L.A., Peña A.I., Vega M.D., Gullón J., Prieto M.C., Barrio M., Becerra J.J., Maseda F., Herradón P.G. (2004). Ovulation induction in rabbit does submitted to artificial insemination by adding buserelin to the seminal dose. *Reprod. Nutr. Dev.*, 44: 1–10.
- Quintela L.A., Peña A.I., Vega M.D., Gullón J., Prieto C., Barrio M., Becerra J.J., Herradón P.G. (2009). Reproductive performance of rabbit does artificially inseminated via intravaginal administration of [des-Gly 10, D-Ala6]-LHRH ethylamide as ovulation inductor. *Reprod. Dom. Anim.*, 44: 829–833.
- Rebollar P.G., Dal Bosco A., Millán P., Cardinali R., Brecchia G., Sylla L., Lorenzo P.L., Castellini C. (2012). Ovulation induction methods in rabbit does: The pituitary and ovarian responses. *Theriogenology*, 77 (2): 292–298.
- Vicente J.S., Lavara R., Lavara F., Marco-Jimenez F., Viudes-de-Castro M.P. (2008). Rabbit reproductive performance after insemination with buserelin acetate extender. *Livest. Sci.*, 115: 153–157.
- Vicente J.S., Lavara R., Marco-Jiménez R.F., Viudes-de-Castro M.P. (2011). Detrimental effect on availability of buserelin acetate administered in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76: 1120–1125.
- Viudes-de-Castro M.P., Lavara R., Marco-Jimenez F., Cortell C., Vicente J.S. (2007). Ovulation induced by mucosa vaginal absorption of buserelin and triptorelin in rabbit. *Theriogenology*, 68: 1031–1036.
- Zapletal D., Pavlik A. (2008). The effect of lecorelin (GnRH) dosage on the reproductive performance of nulliparous and lactating rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.*, 104: 306–315.

OVULATION INDUCTION IN RABBIT DOES BY ADDING GnRH ANALOGUE DESLORELIN TO THE INSEMINATION DOSE

Summary

The aim of the study was to evaluate the ability of GnRH synthetic analogue deslorelin to induce ovulation in rabbit does using intravaginal administration. A total of 414 multiparous lactating does were randomly divided into 2 groups which, at the time of insemination, received the following treatments for ovulation induction: 1 µg of buserelin administered intramuscularly (control group); 15 µg of deslorelin added to the insemination dose (experimental group). The kindling rate in experimental group was significantly higher than in control group (82.6% and 74.2%, respectively). The number of live born rabbits was not significantly affected by the ovulation induction treatment. The results of this study show the possibility of inducing ovulation in rabbits by adding 15 µg deslorelin directly to the insemination dose.



Fot. D. Kowalska