

Z. ROBIĆ, B. LIKER, V. RUPIC, D. HAVRANEK

**PRIOLOG POZNAVANJU KRETANJA PROGESTERONA U KRVI
OVACA IZVAN PRIPUSNE SEZONE**

IZVOD

Neposredno prije pripusne sezone u perifornoj krvi ispitivanih ovaca (pasmina pramenka) je uočena oscilacija koncentracije progesterona. Ova pojava ukazuje na mogućnost pripusta prije uobičajenog početka pripusne sezone.

**ADITION TO THE KNOWLEDGE OF PROGESTERON SHANGES
IN THE SHEEP BLOOD OUT OF THE BREEDING SEASON**

ABSTRACT

The research of progesteron concentration changes in the period immediately before the beginning of the breeding season has been done with the group of 5 "pramenka" sheep two years old. Progesteron concentration is determined by RIA method with progesteron labeled J 125.

The average progesteron concentration changed as follows:
O day 5.0 + 0.92, 7 th day 6.09 + 2.77; and 14 th day 6.54 + 1.97. The hormonal activity at examined sheep shows that they have already ovulated before and by this has been created the possibility of their fecundation out of the usual mating season.

U V O D

Pitanje sezonske oplodnje predstavlja jedan od značajnijih elemenata u ekonomici ovčarske proizvodnje u svijetu i u nas. Stoga je intenzifikacija ovčarske proizvodnje usko povezana s povećanjem plodnosti ovaca. Duža razdoblja anestrije prisutna u naših primitivnih pasmina se negativno odražavaju na ekonomiku ovčarske proizvodnje. Sezona parenja prema Robertsonu 1977. je ovisna o nizu faktora kao što su: geografski položaj, klimatski uvjeti, ishranjenost, način držanja i t. d.

Svi ovi faktori se nalaze u stanju međusobne interakcije iz koje rezultira odgovarajuća visina proizvodnje.

Promjene u odnosima ovih interagirajućih faktora se odražavaju i na kvalitativna svojstva ove interakcije.

Interakcija ovih faktora je jedan od najbitnijih elemenata funkcije procesa reprodukcije.

Tokom evolucije su se razvile jedinke unutar pasmine sa različitom reaktivnošću na vanjske podražaje što ima znatan odraz na sezonalnost parenja životinja.

Naša primitivna pasmina većinom podliježe sezonalnom parenju t.j. ispoljava anetriju u razdoblju od siječnja do kraja srpnja. Ovakovo stanje u jednoj intenzivnijoj proizvodnji se negativno odražava na ekonomičnost iste.

Unatoč naglašenog sezonskog parenja u naše pramenke postoji niz indikacija da tokom razdoblja anestrije postoji razvijena endokrina aktivnost u sklopu procesa reprodukcije.

Dr Zvonko Robić
Mr Branko Likar
Dr Vlatko Rupčić
Mr Davor Havranek

Fakultet poljoprivrednih znanosti Zagreb

U prilog ove postavke su i rezultati vlastitih istraživanja sprovedenih na našoj domaćoj pramenki kod koje su utvrđene promjene koncentracije estrogenih hormona u krvi tokom razdoblja anestrije (Robić Z., Varadin M. i suradnici 1974.)

Istraživanja Fukui-a i suradnika 1982. godine ukazuju na vanezonsku pojavu estrusa nakon devetodnevnog tretiranja sa medroxiprogesteronom i prostaglandinom (PGF₂).

Do sličnih rezultata su došli Fitzgerald i suradnici 1984. godine i drugi.

Povećanje ekonomičnosti ovčarske proizvodnje zahtijeva čim veći broj oplodnji izvan sezone parenja. Uspješnost ovog podhvata je zavisna od poznavanja stanja reprodukcije u razdoblju izvan pripusne sezone.

Kretanje koncentracije progesterona predstavlja vrlo pouzdan indikator stanja procesa reprodukcije (Edquist 1983., Dobson Hilary 1983., Karg 1983.).

U cilju doprinosa rasvijetljavanju ove problematike smo pristupili utvrđivanju koncentracije progesterona u krvnoj plazmi pramenki izvan pripusne sezone.

MATERIJAL I METODA RADA

Istraživanje koncentracije progesterona smo izvršili na pet ovaca pasmine pramenka starih dvije godine u toku mjeseca lipnja. Uzorke od po 5 ml krvi smo uzimali iz vene jugularis tri puta u razmaku od sedam dana između svakog uzimanja.

Ovce su bile smještene na stočarskom objektu Sljeme vlasništvo Fakulteta poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu.

Određivanje koncentracije progesterona u krvnoj plazmi ovaca je izvršeno primjenom radioimunološke procedure (RIA procedure sa progesteronom označenim sa J125) propisane po INEP-u Zemun. Procedura određivanja koncentracije progesterona je izvršena pomoću RIA – kompleta (kita) proizvedenog u Zavodu za endokrinologiju, imunologiju i ishranu INEP-a Zemun.

Nakon uzimanja uzorka krvi isti je podvrgnut centrifugiranju u trajanju od 10 minuta kod 1500 x g.

Nakon centrifugiranja odijeljena je plazma i stavljena u hladnjak za duboko smrzavanje na -20°C

Kada su sakupljeni svi uzorci (od sva tri uzimanja) smo pristupili postupku određivanja i mjerenja koncentracije progesterona po prethodno označenoj proceduri.

Uzorak plazme smo uzeli iz hladnjaka i otopili ga. Nakon što smo uzorak otopili iz istoga smo uzeli 0,05 ml sadržaja i dodali mu 0,1 ml progesteron antiseruma te promješali na mješalici Wortex. Promješanom sadržaju smo dodali 0,1 ml J 125 – progesterona te oprezno izmješali na Wortexu i stavili inkubirati u trajanju od 4 sata kod sobne temperature.

Nakon završene inkubacije inkubatu smo dodali 0,1 ml imunoadsorbenta B/E (ovčji antiserum prema kuničjem) i promješali ga na Wortexu.

Po miješanju sadržaju smo dodali 1 ml ohlađenog PEG-a (+4°C) i sve to skupa promješali Wortexom.

Izmješan sadržaj smo podvrgli 20-minutnom centrifugiranju kod 1500 x g. Po završenom centrifugiranju dekantirali smo supernatant pomoću vodene sisaljke. Ostatak smo podvrgli mjerenju radioaktivnosti. Mjerenje smo izvršili pomoću scintilacionog brojača na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Očitavanje rezultata smo vršili na bazi postotka vezivanja J125 – progesterona iz uzorka plazme u usporedbi sa procentom vezivanja J125 – progesterona i standarda (koji su sastavni dio INEP-ovog kompleta). Rezultat

mjerenja procenta vezivanja standarda je predstavljen standardnom krivuljom. Koncentracija progesterona je izračunavana na bazi usporedbe rezultata mjerenja uzoraka sa standardnom krivuljom. Izračunavanje procenta vezivanja je vršeno putem formule:

$$\% B = \frac{St}{Bo} \times 100$$

%B = procent vezivanja

St = standard

Bo = maksimalno vezivanje (radioaktivnost O standarda)

REZULTATI

Rezultati kretanja progesterona u krvi ovaca tokom vanpripusne sezone su prikazani u tablici 1.

Tablica 1

Kretanje koncentracije progesterona u krvi ovaca izvan pripusne sezone
Progesteron 's concentration in ewes out of breeding season

Dani uzimanja uzoraka The day of sample collection	ng/ml	S _X	V
0	5,0	± 0,92	41,16
7	6,09	± 2,77	
114	6,54	± 1,92	65,62

Kretanje koncentracije progesterona u krvi pojedinih ovaca je prikazano tablici broj 2 i grafikonu broj 1

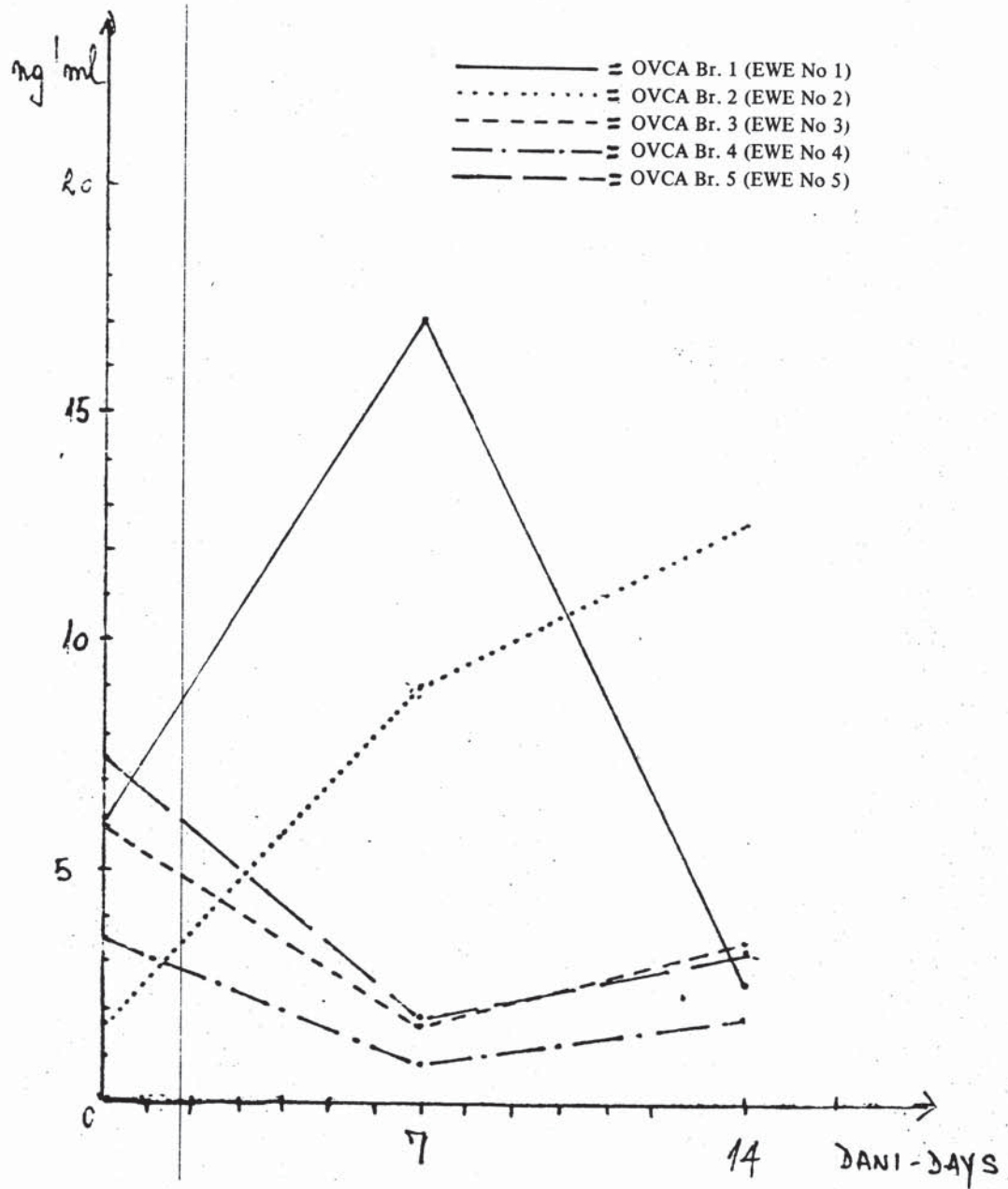
Tablica 2

Prikaz kretanja koncentracije progesterona u krvi pojedinih ovaca
Progesteron 's concentration in ewes blood

Ovca broj Ewe No	Dani uzimanja uzoraka The days of samples collection		
	0	7	14
1	6,2 ng/ml	17,0	2,5 ng/ml
2	1,8 "	9,	
1	6,2 ng/ml	17,0 ng/ml	2,5 ng/ml
2	1,8 "	9,0 "	1 12,5 "
3	6,0 "	11,7 "	3,4 "
4	3,5 "	0,9 "	1,88 "
5	7,5 "	1,88 "	3,3 "

Grafikon 1

Grafički prikaz kretanja koncentracije progesterona u krvi ovaca izvan pripusne sezone
Curves of progesterona level out of breeding season



DISKUSIJA

Pregledom rezultata istraživanja koncentracije progesterona u predpripusnom razdoblju se uočava hormonalna aktivnost. Ova aktivnost je izražena promjenama hormonalne koncentracije u krvi svih ispitivanih ovaca tokom razdoblja od 14 dana (u kojem je vršeno uzimanje uzoraka).

Kod ispitivanih ovaca djelatnost endocriniuma je vrlo razvijena. U prilog ove postavke su i rezultati Buttler-a 1982. i Robertsoma 1982. koji smatraju da koncentracija progesterona u periodu anestrije ne prelazi 0,2 ng/ml. Isti autori tvrde da koncentracija progesterona u krvi ovaca može dostići 2–4 ng/ml već četvrti dan nakon ovulacije.

Robertsob 1977. i 1982. navodi da do znatnog povećanja progesterona u krvi ovaca dolazi u slučaju rada oba ovarija tj. da su se razvila dva žuta tijela (corpus luteum).

Buttler i Robertson 1982. smatraju da koncentracija progesterona iznad 0,8 ng/ml mjerena u razdoblju od 14–18 dana nakon osjemenjivanja može poslužiti kao preliminarni dokaz da je životinja koncipirala. Koncentracija progesterona ispod 0,5 ng/ml može ukazivati na postojanje ovulacije ili na postojanje anestrije. Ove dileme se mogu riješiti ako se takove životinje podvrgnu višekratnom uzimanju uzoraka krvi u kratkim vremenskim intervalima (cca 1 dan).

Kretanje koncentracije progesterona u krvi ovaca u rasponu od 2–4 ng/ml odgovara u većini slučajeva graviditetu od 60 dana. Maksimalna koncentracija progesterona u krvi ovaca u većini slučajeva se kreće od 12–20 ng/mj kod graviditeta od 110 dana. Hormonalna aktivnost u ispitivanih ovaca ukazuje da su iste već prije ovulirale čime je uvelike stvorena mogućnost njihove oplodnje izvan sezone parenja.

Pitanje uspješnosti oplodnje ovaca je ovisno o nizu faktora. Jedan od bitnih faktora u tom sklopu je sposobnost ovna da pronađe i oplodi ovcu. Poznato je mnogo slučajeva da ovan nije mogao pronaći ovcu koja se mrče (tjera). Jedan od najznačajnijih razloga za ovu pojavu je utjecaj sezone na spolnu sposobnost ovna. U prilog ove postavke su istraživanja Piche i sur. 1983. koja su obuhvatila određivanje koncentracije testosterona i LH u ovnova merino, texel i frizijske pasmine.

Najveću koncentraciju testosterona su imali ovnovi merino pasmine u lipnju i srpnju koja je iznosila 6,6 do 8,2 ng/ml, dok su u zimi imali znatno nižu koncentraciju.

Kod texel ovnova najveća koncentracija testosterona je iznosila 8,9–11 ng/ml u rujnu i listopadu, a u istim mjesecima koncentracija testosterona kod ovnova frizijske pasmine je iznosila 10,2–11,7 ng/ml.

Imajući u vidu pitanje "sezonske sposobnosti ovnova" za oplodnju i pronalaženje ovaca u estrusu smatramo da bi se rješenje problema oplodnje izvan pripusne sezone trebalo tražiti putem primjene kvalitetne duboko smrznute sperme uzete od ovnova tokom sezone parenja. Pobuđivanje spolnog ciklusa van pripusne sezone u ovaca se može vršiti putem sinhronizacije progesteronskim preparatima i aplikacijom prostaglandinskih supstanci (Fitzgerald 1985.). U novije vrijeme u SAD-u se upotrebljava melatonin s kojim su postignuti i izvjesni rezultati (Stellflug 1985.).

Uz sve prethodno navedene elemente znatnu ulogu u tim zbivanjima ima ishrana ovaca. Dobra ishrana je osnovica uspješne reprodukcije. Rezultati naših istraživanja pokazuju postojanje hormonalne aktivnosti izvan pripusne sezone, stoga je samo pitanje kako iskoristiti utvrđenu djelatnost endocriniuma u cilju poboljšanja plodnosti ovaca u razdoblju izvan pripusne sezone.

ZAKLJUČAK

Utvrđeno je kretanje koncentracije progesterona u krvi ovaca izvan pripusne sezone

iznad 0,5 ng/ml što ukazuje na postojanje odvijanja normalnog spolnog ciklusa u ispitivanih životinja.

SUMMARY

The research of progesteron concentration changes in the period immediately before the beginning of the breeding season has been done with the group of 5 "pramenka" sheep two years old.

Progesteron concentration is determined by RIA method with progesteron labeled by J125.

The average progesteron concentration changed as follows:
0 day 5.0 ± 0.92 ; 7th day 6.09 ± 2.77 ; and 14th day 6.54 ± 1.97 .

The hormonal activity at examined sheep shows that they have already ovulated before and by this has been created the possibility of their fecundation out of the usual mating season.

LITERATURA

- 1. Buttler W.R. 1982.**
Osobni kontakti na Cornell University Ithaca, N.Y.
- 2. Dobson Hilary 1983.**
Applications of Hormone Measurements in Milk to Pregnancy Detection and Subfertility Diagnosis (Applications of Radioimmunoassay and Related Methods in Animal Science, Polska Akademia Nauk Zeszyt 261).
- 3. Edquist L.E. 1983.**
Use of Reproductive Hormone Analysis as a Diagnostic Aid in Veterinary medicine (Applications of Radioimmunoassay and Related Methods in Animal Science, Polska Akademia Nauk Zeszyt 261).
- 4. Fitzgerald J.A., Rugles A.J., Stellflug J.N. and Hansel W. 1985.**
A Seven-day Synchronization Method for Ewes using Medroxyprogesterone Acetate (MAP) and Prostaglandin E₂
(US Department of Agriculture and Cornell University, Ithaca, NY 14853).
- 5. Fukui Y., W.L. Soto, Y. Terakawi and H. ONO 1982.**
Studies on Introduction of Estrus and Ovulation and the Subsequent Fertility in Anestrus Ewes during non breeding Season.
(Res. Bull. Obihiro Univ. 12:139).
- 6. Karg H. 1983.**
Applications of Radioimmunoassays in Veterinary Medicine and Animal Science (Applications of Radioimmunoassay and Related Methodes in Animal Science – Polska akademia nauk Zeszyt 261).
- 7. Picha J., Pichova Drahomira, Vereš K. Mika J., Kučerova V. 1985.**
Biorhythm of LH and Testosterone Secretion in Rams different Breeds. 1983.
(Applications of Radioimmunoassay and Related Methodes in Animal Science – Polska akademia nauk Zeszyt 261).
- 8. Robertson H.**
Reproduction in the Ewe and Goat
(Reproduction in Domestic Animals Third Edition edited H.H. Cole and P.T. Cupps A. 1977.).

9. Robertson H. 1982.

Osobni kontakti na Cornell University, Ithaca, N.Y.

10. Robić Z., Varadin M., Balzer I. i Benić Nataša

Kretanje koncentracije estrogenih hormona u krvi ovaca tokom godine
Veterinaria 23, 1, Sarajevo 1974.

11. Stellflug J.N. and Hulet C.V. 1985.

Pregnancy Diagnosis in Sheep

Department of Agriculture, Science and Education Agricultural Research Service Dubois Idaho 83423