

STIMULACIJA OVULACIJE LUTALOM U ŽENKI KUNIĆA PRIJE UMJETNOG OSJEMENJIVANJA TEKUĆIM SJEMENOM RAZLIČITE STAROSTI

M. Cergolj, Z. Makek, M. Herak, A. Tomašković

Sažetak

Primjenom umjetnog osjemenjivanja u kunića, pojavio se problem izazivanja ovulacije. U ovom je radu ovulacija stimulirana neposredno prije osjemenjivanja i/m primjenom Lutala (sintetski releasing hormon za LH i FSH, proizvod tvrtke "HOECHST A. G."). Ejakulati tri kunića razrijeđeni su "Gottinger" razrjeđivačem i podijeljeni u doze od 1 ml. U svakoj je dozi bilo 60 milijuna spermija s progresivnom pokretljivošću od najmanje 70%. Osjemenjivano je ejakulatima različitih starosti: 0 sati (odmah po razrjeđivanju), te poslije pohrane u hladnjaku na +4°C 24 i 48 sati. Izvedeno je ukupno 37 osjemenjivanja. Ovulacija je uspješno isprovocirana i zabredalo je 91,89% ženki, s leglima od 2-11 (u prosjeku 7,67) mladih.

Uvod

Problem izazivanja ovulacije u ženka kunića pojavio se prilikom pokusa umjetnog osjemenjivanja. U njih je spolni ciklus slabo izražen i ne završava ovulacijom kao u većine sisavaca, čemu je uzrok stalna prisutnost male količine luteinizirajućeg hormona (LH) pa kod njih ne dolazi, kao u ostalih životinja, do predovulacijskog porasta LH, već se ovulacija mora isprovocirati nekim podražajem. Ovulacija najčešće uslijedi poslije koitusa uslijed mehaničkog podražaja penisa o stijenku vagine.

Najjednostavniji i najprirodniji način izazivanja ovulacije prilikom umjetnog osjemenjivanja je kopulacija s vazektomiranim mužjakom. Tu su metodu uspješno primjenivali Fox (1961), te Cergolj i sur. (1994). Podražaj najsličniji onom prilikom parenja je mehaničko nadraživanje stijenke vagine staklenim štapićem koje su opisali Adams i Dott (1966), ili štapićem na koji je namotana vata (Rohloff, 1977). Ovulacija uslijedi i poslije podražaja električnom strujom, pa Bonadona (1945) opisuje pokuse umjetnog osjemenjivanja koje je u razdoblju od 1930.-1938. godine izvodila skupina japanskih autora (Shibata i sur. cit. Bonadona, 1945). Oni su prvi počeli temeljito rješavati problem izazivanja ovulacije u ženka kunića. Ovulaciju su izazivali na tri načina. U prvaj skupini ovulaciju su stimulirali električnom

Dr. Marijan Cergolj, dr. Zdenko Makek, dr. Miroslav Herak, dr. Anton Tomašković, Zavod za reprodukciju i Klinika za porodiljstvo, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, P. O. Box 190, 41000 Zagreb, Hrvatska.

strujom napona 20 volta i snage 0,15 ampera. Jednu su elektrodu stavili kunički pod kožu lateralno u visini 5.-7. lumbalnog kralješka, a drugu u rektum. Druge dvije skupine tretirali su horionskim gonadotropinima: jednoj skupini aplicirali su urin gravidnih žena u dozi od 5 ml/kg tjelesne težine, dok su drugoj davali tvornički pripravak Prolan u dozi od 1-1,5 i. j. po životinji. Uspješnost stimulacije određivali su brojenjem žutih tijela. Upotrebom električne struje, poslije jedne stimulacije postigli su 25%, a poslije 3 do 6 stimulacija 80% ovulacija. Doziranje hormona prema težini ženki nije se pokazalo dobrim, jer je kod lakših ovuliralo 80%, a kod težih svega 40% folikula. Na stimulaciju Prolanom reagiralo je 40% životinja. Adams (1966) je u istu svrhu intravenozno aplicirao hipofizni luteinizirajući hormon u dozi od 0,5 mg/kg i humani horionski gonadotropin u dozi od 10 do 20 i. j./kg. Ovulacija je uslijedila 10 sati poslije primjene svakog od tih hormona. Preparat LH i HCG upotrebljavali su Michelmann i Paufler (1973) i dobivali prosječno 8,7 odnosno 8,8 ovulacija po ženki kunića. Horvath (1980) navodi, da samo intravenska primjena LH, uz uvjet da je prisutan dovoljan broj folikula na jajnicima, dovodi do ovulacija. Prilikom opeptovanih izazivanja ovulacija s bilo kojim od prirodnih LH u ženkama dolazi do stvaranja antitijela, što može dovesti do postupnog smanjenja legala.

Izrazite prednosti sintetičkih releasing hormona za LH pred prirodnim preparatima utvrdili su Paufler i sur. (1979). Oni su kod 72 ženke kunića novozelandske bijele pasmine izazivali ovulaciju i sinhrono ih osjemenjivali. Upotrebljavali su sintetski releasing hormon za LH tvrtke "HOECHST A. G." u preparatima "LUTAL" i njegov analog "HOE 766". Ženke su osjemenjivali najranije prvog, a najkasnije četvrtog dana post partum (p. p.). Postigli su prosječnu koncepciju od 71,5% sa 7 mladunčadi u leglu. Najbolju koncepciju od 77,8% i 8,1 plodova po leglu postigli su pri osjemenjivanju drugog dana p.p. Smatra se, da se najranija oplodnja može izvesti 30 sati poslije poroda. Paufler i sur. (1978) su postigli najbolje rezultate osjemenjujući dva dana poslije poroda. Prema istraživanjima Kuttner-a i sur. (1975), samo je mali broj ženki koncipirao od inseminacija izvedenih 16. dana p.p.

Materijali i metode

Ejakulate smo dobivali od 3 kunića: dva novozelandske bijele pasmine i jednog pasmine belgijski orijaš u dobi od 15 do 17 mjeseci. Ejakulate smo dobivali pomoću umjetne vagine (Cergolj, 1984). Razrjeđivali smo samo one ejakulate kod kojih je progresivna pokretljivost spermija iznosila najmanje 70%. Ejakulate smo razrijedili "Gottinger" razrjeđivačem (Busch i sur., 1982) tako, da je u dozi od 1 ml bilo najmanje 60 milijuna spermija. Razrijeđene ejakulate smo do upotrebe pohranili u hladnjak na temperaturu od +40°C. Osjemenjivali smo ejakulatima starim O (odmah po razrijeđivanju), 24 i 48 sati.

Za biološki pokus upotrijebili smo 17 ženki kunića novozelandske bijele pasmine, prosječne dobi 15 mjeseci i težine 3,8 kg. Životinje su držane pojedinačno u kavezima, sve u istoj prostoriji s umjetnim svjetlom, hranjene peletiranom hranom i napajane ad libitum.

Ejakulati su aplicirani pipetom, duboko intravaginalno (Cergolj, 1984). Ovulaciju smo stimulirali neposredno poslije osjemenjivanja s/c aplikacijom 0,2 ml "LUTAL"-a ("HOECHST A.G."). Preparat je vodena injekcijska otopina sintetskih

releasing hormona za luteinizirajući i folikulostimulirajući hormon (LH i FSH-RH). Aktivna tvar je GONADORELIN, poznat pod međunarodnom kraticom (I.N.N.). To je dekaeptid sa sekvencom aminokiselina koji odgovara djelovanju prirodnog Gn-RH dobivenog iz ekstrakta hipotalamusa. Poslije parenteralne primijene do najviše razine LH u krvi dolazi poslije 90 minuta. Spolni ciklus, nakon ovulacije izazvane Lutalom, odvija se normalno i ne treba očekivati kumulativno djelovanje (prema navodima proizvođača).

Gravidnost smo kontrolirali palpacijom abdomena 15 dana poslije inseminacije, a gravidnim smo ženka 20. dana gravidnosti u kavez stavljali gnijezdo.

Rezultati i rasprava

Razrijeđenim ejakulatima kunića, čuvanim od 0 do 48 sati, osjemenili smo 27 ženka kunića. Ženke su osjemenjene najranije 2. a najkasnije 18. dana poslije poroda. Koncipirale su 24 ženke i sve su iznijele do kraja gravidnosti i normalno se okotile.

Tab. 1. - REZULTATI OSJEMENJIVANJA I KONCEPCIJE EJAKULATIMA RAZLIČITE STAROSTI - RESULTS OF INSEMINATION AND CONCEPTION RATE OBTAINED WITH DIFFERENT LIFE SPAN EJACULATES

starost sperme (sati) life span of semen	broj osjemenjenih number of inseminated	% p.p.	gravidnih pregnant	veličina legla size of litter
0	16	77,3	15 (93%)	2-11(7,67)
24	10	68,3	9 (90%)	4-8 (6,11)
48	11	61,9	10 (90,9%)	2-6 (3,9)
	37		34(91,89%)	2-11 (7,67)

Najveći postotak progresivno pokretljivih spermija u ejakulatima bio je odmah poslije razrjeđivanja (0 sati), a najmanji u ejakulatima starim 48 sati. Smanjivanjem broja progresivno pokretljivih spermija u ejakulatu, smanjivao se i broj mladunčadi u leglima. Korelacijskom analizom potvrdili smo znatnu ovisnost brojnosti legla svih osjemenjenih ženki (37) o postotku progresivno pokretljivih spermija u ejakulatima ($r=0,584$; $r_{0,05}=0,413$).

Analizirajući ovisnost brojnosti legla o postotku progresivne pokretljivosti ejakulata za svaku starosnu skupinu ejakulata zasebno, nismo utvrdili značajnu međuovisnost. Ona je iznosila za prvu skupinu (0 sati) $r=0,546$; $P > 0,05$, za drugu skupinu (ejakulati stari 24 sata) $r=-0,235$; $P > 0,05$ i za treću skupinu (48 sati) $r=-0,414$; $P > 0,05$.

Postignuti postotak koncepcije poslije umjetnog osjemenjivanja razrijeđenom spermom i izazivanja ovulacije LUTALOM je 91,89% što je za 12,2% više (77,8%) nego što su postigli Paufler i sur. (1978). U istom uzgoju, kod prirodnog parenja poslije prvog pripusta koncipira oko 90% parenih ženka, što odgovara rezultatima postignutim u našem pokusu.

Broj spermija u dozama koje smo mi upotrebljavali (60 milijuna) znatno je veći od 10 milijuna, koliko preporučuju Adams i Dott (1966). Većim brojem spermija u dozi željeli smo nadoknaditi eventualni gubitak kvalitete pohranom ejakulata. Doze zapremine 1 ml upotrebljavane u našem pokusu, dvostruko su veće od 0,5 ml, koliko su upotrebljavali isti autori. Smatramo da su naše doze optimalne, jer su pogodnije za rukovanje.

Zaključci

Sintetski releasing hormon "LUTAL" veoma je prikladan za izazivanje ovulacije prilikom umjetnog osjemenjivanja ženki kunića. Preparat je zbog male doze, a pogotovo zbog intramosukularne primjene praktičan i jednostavan za rutinsku upotrebu. Primjenom tog preparata ovulaciju smo izazvali u najmanje 90% ženki.

Ejakulati kunića razrijeđeni "Gottingen" razrijeđivačem, pohranjeni na +4°C sposobni su za oplodnju najmanje 48 sati. Pohranom ejakulata smanjuje se broj progresivno pokretljivih spermija kao i broj mladunčadi u leglima.

LITERATURA

1. Adams C.E., Dott H.M. (1966): Peltziere und Nagetiere. Tierzuchter 18, 709-710.
2. Bonadona T. (1945): Nozioni di Technica dalla Fecondatione Artificiale degli Animali. Institute editoriale Cisalpino. Milano-Varese.
3. Busch W., K. Löhle, W. Peter (1982): Künstliche Besamung bei Nutztieren. G. Fischer Verlag. Jena
4. Cergolj M. (1984): Noviji postupci pri umjetnom osjemenjivanju kunića. Magistarska radnja. Zagreb.
5. Cergolj M., M. Herak, Z. Makek, A. Tomašković (1994): Induction of ovulation Female Rabbits inseminated artificially with deep frozen sperm using vasectomized Bucks. Veterinarski Arhiv - u štampi.
6. Fox, R.R. (1961): Preservation of Rabbit Spermatozoa: Fertility Rezults from frozen Semen. Soc. Exp. Biol. Med., 108, 663- 665.
7. Horváth M. (1980): Die künstliche Besamung beim Kaninchen. Kolloquium der Wilhelm-Pieck-Universität Rostock, Sektion Tierproduction, "Das Kanincken als Modelltier und Zuchtungsobjekt". 163-173. (cit. prema Busch-u i sur. 1982).
8. Kuttner, M., K.Löhle, Renata Schramm (1975): Untersuchungen über die künstliche Besamung beim Kaninchen unter besonderer Berücksichtigung der Spermaverdünnung und Spermakonservierung. Archiv Tiercuht, Berlin 18,247-254.
9. Paufler, S., W. Scholaut, K. Lange (1979): Postpartale Insemination beim Kaninchen mit Ovulationsauslösung durch synthetische LH-Releserhormone. Zuchthygiene 14, 37-42.
10. Rohloff, D. (1967): Untersuchungen zur Konservierung von Ebersamen mit Dimethylsulfowid (DMSO). Zuchthygiene, 2, 112-117.

STIMULATION OF OVULATION WITH LUTAL IN DOE RABBITS BEFORE ARTIFICIAL INSEMINATION WITH LIQUID SEMEN OF DIFFERENT LIFE SPAN

Summary

The problem of ovulation provocation occurred with the application of artificial insemination in rabbits. In this work the ovulation was stimulated directly before the insemination by the i.m. application of Lutal (synthetic releasing hormone for LH and FSH, product of the "Hoechst" firm). The ejaculates of three buck rabbits were diluted using "Gottinger" diluter and divided into 1 ml doses. Each dose contained 60 milion sperm cells with progressive motility of at least 70%. Insemination was performed with the samples of different life span: 0 hour ie. immediately after dilution and after storage ay +4°C during 24 and 48 hours. A total of 37 inseminations were performed. The ovulation was successfully provoked in 91.89% of females that became pregnant and had litters of 2 to 11 (7.67 in average) puppies.

Primljeno: 3. 10. 1994.