

## VPLYV INTRAVAGINÁLNEJ APLIKÁCIE GnRH A HEPARÍNU NA REPRODUKCIU KRÁLIKOV

### EFFECT OF INTRAVAGINAL APPLICATION OF GnRH AND HEPARIN ON RABBIT REPRODUCTION

Ondruška, L., Parkányi, V., Rafay, J.

*Institute of Small Farm Animals, Animal Production Research Centre Nitra, Lužianky, Slovak Republic*

#### ABSTRACT

The aim of the study was *in vivo* and *in vitro* evaluation intravaginal application of superanalogue GnRH-Lecirelin and heparin included in the rabbit insemination dose on selected reproduction parameters. This study was realized in two experiments – *in vivo* and *in vitro*. The experiments were carried on adult female rabbits. The animals were divided in three groups. Group K (control) with intramuscular application of GnRH (2.5 µg per doe) immediately after the artificial insemination. Group H with intravaginal application of heparin (0.06 µl per doe) and intramuscular application of GnRH (2.5 µg per doe) and the third group G with intravaginal application of GnRH – Lecirelin (7.5 µg per doe). In *in vivo* experiment we followed intravaginal application of GnRH and heparin on selected reproductive parameters (conception rate, number of total born kits, live born and stillborn kits). In the second experiment (*in vitro*) we analyzed the influence of intravaginal application GnRH and heparin on total number of oocytes and zygotes, number of zygotes with two pronuclei and number of unfertilized oocytes. Significance of differences among groups were determined by t-test and  $\chi^2$  test. The highest conception rate (89.29%) and number of total born kits (10.64±3.41) was obtained in group H. Intravaginal application of GnRH and heparin positively influenced the number of zygotes with two pronuclei and decreased the number of unfertilized oocytes. However these differences were not significance compared with group K.

**Key words:** GNRH, heparin, rabbit, reproduction

#### ÚVOD

Oplodnenie je komplexný jav, zahrňujúci oplodňujúcu spermium, *cumulus oophorus*, *zona pellucida* (ZP) a *oolemmu*. Akrozómová reakcia zohráva kľúčovú úlohu pri penetrácii spermie cez uvedené obaly vajíčka. Všetky cicavčie vajíčka sú obklopené membránou nazvanou *zona pellucida*, ktorá je miestom počiatočnej interakcie so spermiou. Králičie vajíčka sú pokryté ešte jednou,

mukopolysacharidovou vrstvou – mukózou, ktorá je na povrchu *zona pellucida*. Na neuroendokrinnej regulácii estrálneho cyklu sa zúčastňujú hormóny uvoľňujúce gonadotropíny (GnRH), inak nazývané spúšťače (GnRH), ktoré sa tvoria v hypotalame a iných tkanivách (vrátane leukocytov, vaječníkov, placenty atď.) a prenášajú sa hypotalamicko-hypofyzárnou portálnou cirkuláciou na miesto pôsobenia, do prednej hypofýzy. Stimulujú uvoľňovanie gonadotropínov z prednej hypofýzy a následné vylučovanie FSH, resp. LH. Definovanie presnej sekvencie aminokyselín dekapeptidu umožnilo produkciu syntetických, obdobne pôsobiacich látok, resp. analógov, z ktorých niektoré sú niekoľko násobne účinnejšie ako prírodné GnRH. Laboratórne pokusy ukázali, že GnRH uvoľňujú vo väčšom množstve LH ako FSH. LH zaisťuje cyklickosť, FSH začiatok estrálnej fázy cyklu.

Morales (1998) popísal väzbu spermia-*zona pellucida*, ako rozhodujúci krok v procese oplodnenia, ktorý sa uskutočňuje *in vivo* v hornej časti vajcovodu. V tejto práci sledoval účinok GnRH a príbuzných peptidov na väzbovú schopnosť spermia-vajíčko, akrozómovú reakciu a interakciu spermií so *zona pellucida*. Spermie ovplyvnené GnRH sa v porovnaní s kontrolnou skupinou viazali na *zona pellucida* vo vyššom počte ( $P < 0.005$ ). Za zvýšenou väzobnou schopnosťou spermií autori videli zmenu afinity zónových receptorov na plazmatickej membráne spermií. Morales a kol. (2000) uskutočnili výskum mechanizmu, ktorým GnRH zvyšuje väzbu spermie a *zona pellucida*. Testovali vplyv GnRH na interakciu spermie so *zona pellucida* v médiu bez  $Ca^{2+}$  a v prítomnosti  $Ca^{2+}$  kanálových antagonistov. GnRH vplývalo na zvýšenie väzby spermie so *zona pellucida* až o 300%, ale len v prítomnosti vápnika  $Ca^{2+}$  v kultivačnom médiu. V médiu bez  $Ca^{2+}$  túto interakciu neovplyvnilo.

Mnohé štúdie ukazujú, že heparín ako glykózaminoglykán (GAG) má rovnakú úlohu pri kapacitácii ako lyzofosfatidylcholín (Handrow et al., 1982, Parish et al., 1989). Pri inkubácii ejakulátu s GAG prebieha kapacitácia v kratšej časovej perióde než v prítomnosti lyzofosfatidylcholínu v podmienkach *in vivo* (Parish et al., 1988).

Cieľom predkladanej práce bolo *in vivo* a *in vitro* hodnotenie intravaginálnej aplikácie biologicky aktívnych látok GnRH (Supergestran) a heparínu (GAG – glykózaminoglykán) na reprodukciu králikov.

## MATERIÁL A METODIKA

### *In vivo* experimenty s intravaginálnou aplikáciou GnRH a heparínu

Experimenty sa uskutočnili na 83 nulliparných samiciach brojlerových králikov (tabuľka 1), vyšľachtených na báze kalifornských králikov. Samice králikov sme rozdelili do 3 skupín: kontrola (K), skupina s i.vag. aplikáciou syntetického GnRH s účinnou látkou lecirelín (G) a skupina s i.vag. aplikáciou heparínu (H). Všetky zvieratá boli chované v čiastočne klimatizovanej experimentálnej

hale ÚMHZ - CVŽV Nitra. 48 hodín pred insemináciou bolo každej samici intramuskulárne podaných 25 I.U. PMSG (Sergon).

Na insemináciu samíc sa použili heterospermické inseminačné dávky (I.D. = 0,5 ml) samcov tej istej chovnej línie. I.D. boli riedené komerčným riedidlom MiniTüb pre králičie spermie, pričom na riedenie riedidla sa použila apyrogénna MiniTüb voda. Koncentrácia spermií v inseminačnej dávke bola  $68 \times 10^6$ /I.D. Inseminácia samíc sa uskutočnila po 30 minútovej inkubácii I.D. pri laboratórnej teplote. Samice v kontrolnej skupine a skupine s intravaginálnou aplikáciou heparínu boli bezprostredne po inseminácii intramuskulárne ovplyvnené dávkou 2,5  $\mu$ g syntetického GnRH. V experimentálnych skupinách s intravaginálnou aplikáciou GnRH a heparínu bolo do I.D. aplikovaných 7,5  $\mu$ g (t.j. 300  $\mu$ l) GnRH, resp. 10  $\mu$ g (t.j. 0,06  $\mu$ l) heparínu (25 000 I.U./1 ml).

Počas experimentu sa sledoval a štatisticky vyhodnocoval počet inseminovaných samíc, počet okotených samíc, koncepný pomer, počet živonarodených a mŕtvonarodených mláďat. Koncepný pomer sme vypočítali z podielu okotených samíc k celkovému počtu pripustených samíc x 100.

#### *In vitro experimenty s intravaginálnou aplikáciou GnRH a heparínu*

Na *in vitro* hodnotenie sme zaradili celkovo 16 ks samíc králikov (tabuľka 2). Na 18 – 20 hodinu po inseminácii sme zvieratá humánne usmrtili elektrickým prúdom a následným vykvrvením, vypreparovali sme pohlavný trakt - ovária, ovidukty a uterus (*uterus bicornis* sme prerušili v prvej tretine) a umiestnili do Petriho misky (120 mm) s 2 ml vytemperovaného média Dulbecco+2,5 % FCS. Vyplavovanie zygot sme uskutočnili zabrúsenou – Luer Lock ihlou (0,7x35), cez infundibulum oviduktu do Petriho misiek (60 mm). Vyhodnotenie (prítomnosť kumulárnych buniek a spermií) sme uskutočnili pod binokulárnou lupou pri zväčšení 2,5 x a 4x a pod svetelným mikroskopom 4x12 a 10x12. Zygoty sme pomocou mikrokapiláry naniesli na mikroskopické sklíčko a hodnotili pod svetelným mikroskopom so zníženým kondenzorom. Preparáty sme fotili na svetelnom mikroskope Olympus CX41 so zabudovaným digitálnym fotoaparátom, s objektívom 20x bez imerzného oleja so zníženým kondenzorom.

Získané variačno-štatistické ukazovatele sme vyhodnotili jednofaktorovou analýzou rozptylu. Výsledky boli spracované štatistickými metódami v programe MS Excel 2000, t-testom a  $\chi^2$  – testom.

## **VÝSLEDKY**

#### *In vivo experimenty s intravaginálnou aplikáciou GnRH a heparínom*

Najvyšší koncepný pomer (89,29%) a najvyšší priemerný počet narodených mláďat vo vrhu (10,64 ks) sme zaznamenali v skupine (H) s intravaginálnou aplikáciou heparínu. Naopak najnižší koncepný pomer samíc (66,66%) sme sledovali v experimentálnej skupine (G) s i.vag.

aplikáciou GnRH (tabuľka 1). Štatisticky významný rozdiel ( $\chi^2=4,15^+$ ) bol zaznamenaný iba medzi kontrolnou skupinou (K) so 72% koncepným pomerom a skupinou H.

**Tabuľka 1 Výsledky reprodukčných ukazovateľov experimentov s intravaginálnou aplikáciou GnRH – Lecirelín a heparínom**

Skupina	Inseminované samice n	Koncepný pomer (%)	Počet mláďat/vrh $x \pm sd$
GnRH-Lecirelín (G)	30	66,66	9,58±4,05
Heparín (H)	28	89,29	10,64±3,41
Kontrola (K)	25	72,00	8,55±3,22
Štatistická preukaznosť		$\chi^2$ K:G = 0,39 <sup>-</sup> $\chi^2$ K:H = 4,15 <sup>+</sup>	$t_{36}$ K:G = 0,85 <sup>-</sup> $t_{41}$ K:H = 2,02 <sup>+</sup>

Použitie GnRH v inseminačnej dávke v porovnaní so skupinou K pozitívne ovplyvnilo priemerné počty narodených mláďat vo vrhoch (+1 mláďa na 1 vrh), ale signifikantne neovplyvnilo koncepný pomer samic (-5,33;  $\chi^2=0,39^-$ ).

V počte živonarodených mláďat sme medzi K a H skupinou samic zaznamenali štatisticky významný rozdiel na úrovni  $t_{41} = 2,02^+$ .

**Tabuľka 2 Výsledky *in vitro* experimentov s intravaginálnou aplikáciou GnRH – Lecirelín a heparínu**

Ukazovatele	K	G	H	$\chi^2$
n	6	6	4	
Počet ovulácií	83	74	69	
Počet vyplavených oocytov a zygot	55 (100%)	27 (100%)	33 (100%)	K:G <sup>-</sup> K:H <sup>-</sup>
Počet zygot s 2 prvojadrami	41 (74,5%)	21 (77,8 %)	27 (81,8 %)	
Počet neoplodnených oocytov	14 ( 25,5 %)	6 ( 22,2%)	6 ( 18,2 %)	K:G <sup>-</sup> K:H <sup>-</sup>

V skupinách s intravaginálnou aplikáciou biologicky aktívnych látok sme zaznamenali relatívne zvýšenie počtu zygot s 2 prvojadrami u samic s GnRH (77,8 %) a najmä u samic s heparínom (81,8%), tieto diferencie však neboli voči kontrolnej skupine (74,5%) štatisticky signifikantné ( $\chi^2=0,15-0,72^-$ ). *In vitro* analýzy výsledkov fertilizácie oocytov relatívne zhodne kopírujú *in vivo* dosiahnuté výsledky v priemernom počte mláďat vo vrhoch.

**Obr 1** neoplodnený oocyt s kumulárnymi bunkami - 20 hodín po inseminácii**Obr 2** štádium 2 prvojadier + spermie na zona pellucida - 20. hodina po inseminácii

## DISKUSIA

Quintela et al. (2004) sledovali GnRH analóg s účinnou látkou buserelín, ktorý bol použitý na indukciu ovulácie králičíc intravaginálnou aplikáciou analógu v inseminačnej dávke. V dvoch pokusoch použili ako kontrolnú skupinu samice s intramuskulárnou aplikáciou buserelínu v množstve 0,8  $\mu\text{g}$  na 1 samicu. U experimentálnych skupín použili 8  $\mu\text{g}$ , 12  $\mu\text{g}$  a 16  $\mu\text{g}$  na 1 samicu buserelínu pridaného do inseminačnej dávky. Koncepčný pomer medzi skupinami samíc nebol signifikantne odlišný, avšak početnosť mláďat vo vrhu bola vyššia v skupine samíc po intravaginálnej aplikácii (i.vag.) 16  $\mu\text{g}$  dávky buserelínu v porovnaní s kontrolnou skupinou (11,7 vs. 9,4 ks).

Miller et al. (1990) a Thérien et al. (1995) dokázali, že GAG moduluje kapacitáciu binding proteínov v membráne spermíí. Glykózaminoglykán, ktorý je prítomný v samičom genitálnom trakte (Lee a Ax, 1984), spája býčie spermie ako typický ligand receptor interakcie, podporujúci kapacitáciu (Ax a Lenz, 1987, Parrish et al 1988). Heparín vyvoláva kapacitáciu a zvyšuje intracelulárnu koncentráciu vápnika prostredníctvom aktivácie prúdu vápnika (Córdoba et al, 1997). Podľa Yanga (1991) na 18 – 20 hodinu po prirodzenom párení sa v oviduktoch králičích samíc nachádzajú zygoty v štádiu dvoch prvojadier (pronukleusov). Až na 24 – 26 hodinu po párení sa vyskytujú embryá v štádiu dvoch blastomér.

## ZÁVER

Intravaginálnou aplikáciou biologicky aktívnych látok dochádza na 18 – 20 hodinu po inseminácii k zvýšeniu počtu zygot s 2 prvojadrami. Použitie heparínu v inseminačnej dávke vplyva stimulačne na počty mláďat vo vrhoch (+2 mláďatá na 1 vrh) a pozitívne ovplyvňuje aj koncepčný pomer samíc (+17%). Intravaginálna aplikácia heparínu tak predstavuje benefit v reprodukcii a v celkovej produkcii mláďat králikov.

Intravaginálnou aplikáciou GnRH zároveň dochádza k zjednodušeniu a zefektívneniu technológie a rentability inseminácie ušetrením 1 pracovnej sily a vylúčením injekčnej aplikácie GnRH sa zároveň zníži riziko potenciálneho prenosu patogénov v chove.

## Pod'akovanie

Táto publikácia, bola vytvorená realizáciou projektu CEGEZ č. 26220120042, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## Literatúra

1. AX, R.L., LENZ, R.W. 1987. Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. In *Journal of Dairy Science*, vol. 70, 1987, p. 1470-1486.
2. CÓRDOBA, M., SANTA COLOMA, T.A., BEORLEGUI, N.B., BECONI, M.T. 1997. Intracellular calcium variation in heparin-capacitated bovine sperm. In *Biochemistry and Molecular Biology International*, vol. 41, 1997, no. 4, p. 725-733.
3. HANDROW, R., LENZ, R.W., AX, R.L. 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. In *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 107, 1982, p. 1326-1332.
4. LEE, C.N., AX, R.L. 1984. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. In *Journal of Dairy Science*, vol. 67, 2006.
5. MILLER, D.J., WINER, M.A., AX, R.L. 1990. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. In *Biology of Reproduction*, vol. 42, 1990, p. 899-915.
6. MORALES, P., PIZARRO, E., KONG, M., KERR, B., CERIC, F., VIGIL, P. 2000. Gonadotropin-releasing hormone-stimulated sperm binding to the human zona is mediated by a calcium influx. In *Biology of Reproduction*, vol. 63, 2000, p. 635-642.
7. MORALES, P. 1998. Gonadotropin-releasing hormone increases ability of the spermatozoa to bind to the human pellucida. In *Biology of Reproduction*, vol. 59, 1998, p. 426-430.
8. PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., HANDROW, R.R., SIMS, M.M., FIRST, N.L. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. In *Biology of Reproduction*, vol. 40, 1989, p. 1020-1025.
9. PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., WINER, M.A., FIRST, N.L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. In *Biology of Reproduction*, vol. 38, 1988, p. 1171-1180.
10. THÉRIEN, I., BLEAU, G., MANJUNATH, P. 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. In *Biology of Reproduction*, vol. 53, 1995, p. 1372-1379.
11. 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. In *Reproduction Nutrition and Development*, vol. 44, 2004, p. 79-88.

12. YANG, X. 1991. Embryo cloning by nuclear transfer in cattle and rabbits. In *Embryo Transfer News*, vol. 9, 1991, p. 10-22.

**Kontaktná adresa**

Ing. Ľubomír Ondruška, PhD., Ústav malých hospodárskych zvierat – CVŽV Nitra, Hlohovecká 2,  
951 41 Lužianky, E-mail: [ondruska@cvzv.sk](mailto:ondruska@cvzv.sk)