

# Reprodukce skotu

Reprod Dom Anim doi: 10.1111/rda.12178  
ISSN 0936-6768

## Účinek dávky a typu luteolytika Cloprostenol na luteolytickou odpověď mléčného skotu během studie synchronizace ovulace při různých fyziologických charakteristikách a charakteristikách estrálního cyklu

X Valldecabres-Torres<sup>1</sup>, P Larrosa-Morales<sup>2</sup> a J Cuervo-Arango<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad CEU Cardenal Herrera, Moncada, Španělsko; <sup>2</sup>El Barranquillo SL, Torre-Pacheco, Španělsko

### Obsah

Cílem studie bylo charakterizovat účinek dávky a typu luteolytika Cloprostenol na luteolytickou odpověď mléčného skotu během studie synchronizace ovulace při různých fyziologických charakteristikách a charakteristikách estrálního cyklu. Na dvanácti nelaktujících kravách a 111 laktujících kravách byly provedeny tři experimenty. V prvním experimentu byly krávy synchronizovány tak, aby měly jen 5,5 až 6 dní staré žluté tělísko (CL), když jim v rámci studie synchronizace ovulace byl podán prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ). V druhém experimentu byly krávy synchronizovány tak, aby měly v době léčby  $PGF_{2\alpha}$  alespoň 14 dní staré žluté tělísko a další CL v případě, že odpověděly na první GnRH v rámci synchronizace ovulace. Navíc v každém experimentu dostávaly krávy buď standardní nebo dvojitou dávku CLO jako luteolytickou terapii. Ve třetím experimentu byly krávy blokovány paritou a rozděleny na tři skupiny podle druhu luteolytické terapie během studie synchronizace ovulace: 500  $\mu$ g d,l-CLO, 150  $\mu$ g nebo 300  $\mu$ g d-CLO. V prvním experimentu měla dávka d-CLO vliv ( $p = 0,08$ ) na počet zvířat s plnou luteolýzou, v experimentu II však tento vliv pozorován nebyl ( $p > 0,1$ ). Při srovnání obou experimentů v druhém z nich dosáhlo plné luteolýzy víc zvířat než v prvním (87% vs 58%,;  $p = 0,007$ ). Ve třetím experimentu dosáhlo plné luteolýzy 87,1%, 84,4% a 86,2% laktujících dojníc plné luteolýzy a 37,8%, 36,8% a 36,1% krav bylo po léčbě gravidních. Údaje odpovídají dávkám CLO 500  $\mu$ g lg d,l-CLO, 150 a 300  $\mu$ g d-CLO v uvedeném pořadí ( $p > 0,05$ ).

### Úvod

Jedním z hlavních faktorů studií s cílem synchronizace ovulace u mléčného skotu je úspěšné vyvolání úplné luteolýzy. Toho se nejlépe dosáhne podáním exogenního nativního prostaglandinu  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) nebo jeho syntetických analogů (PGF) za přítomnosti jednoho nebo více responzivních žlutých tělísek (CL). Analogy PGF se od sebe liší potenciálem zprostředkovat luteolýzu a také svými počasy. Cloprostenol (CLO) je běžné luteolytikum PGF používané pro vyvolání luteolýzy u skotu a koní. Má (oxyAR)

funkci snižující metabolismus (Bourne et al. 1980); proto je odolnější proti endogennímu metabolismu a má mnohem delší poločas (asi 3 hodiny; Reeves 1978) než nativní  $PGF_{2\alpha}$  (7–8 min; Kindahl et al. 1976). Komerčně jsou dostupné dvě formy CLO: nejsilnější je d-CLO, pravotočivý isomer hroznového CLO (d,l-CLO), se známou trojnásobnou silou oproti čistě hroznové formě (Král 1988).

Výrobce doporučená luteolytická dávka d-CLO (2 ml Genestran<sup>®</sup>, aniMedica GmbH) a CLO (Estrumate<sup>®</sup>, MSD animal health) je 150 a 500  $\mu$ g, v uvedeném pořadí. Tato dávka je určena pro dojnice se „zralým“ neboli responzivním žlutým tělískem (corpus luteum, CL). Klasicky je za prahové stáří responzivního žlutého tělíška CL považováno 5 dní (Beal et al. 1980). Na základě této znalosti se  $PGF_{2\alpha}$  podle původního protokolu studie synchronizace ovulace Ovsynch podává 7 dní po první terapii GnRH (Pursley et al. 1995), aby předpokládané stáří žlutého tělíška CL v okamžiku léčby  $PGF$  bylo asi 5,5–6 dní. Bez ohledu na toto hodně dojnic plné luteolýzy během studie synchronizace ovulace nedosáhne. Ve velké studii v terénu (Martins et al. 2011) dosáhlo během studie synchronizace ovulace 20 % laktujících dojníc neúplné luteolýzy (progesteron  $>0,5$  ng/ml 72 hod. po podání doporučené dávky CLO). Dojnice s neúplnou luteolýzou mají menší naději na graviditu po načasovaném umělém oplodnění (AI) po naplnění protokolu synchronizace ovulace Ovsynch (Souza et al. 2007; Brusveen et al. 2009; Martins et al. 2011) bez ohledu na pozitivní ovulační odpověď na poslední podání GnRH (Bello et al. 2006).

Přirozená rezistence žlutého tělíška na exogenně vyvolanou luteolýzu během prvních 5 dní cyklu u přežvýkavců byla podrobně studována (Tsai and Wiltbank 1997, 1998; Mamluk et al. 1999; Silva 1999; Skarzynski a Okuda 1999; Levy et al. 2000; Sayre et al. 2000), a přece její příčiny nejsou dosud plně objasněny. Možným vysvětlením je snížená dostupnost endotelinu-1 (Levy et al. 2000) a zvýšená dostupnost prostaglandinové dehydrogenázy (Silva 1999) v případě mladých žlutých tělísek CL ve srovnání se zralými tělísky. Endotelin-1 je proteinový vazokonstriktor a steroidogenní buněčný modulátor produkovaný buňkami endotelu v reakci na  $PGF$ , který působí na produkci progesteronu u skotu (Girsh et al. 1996), zatímco prostaglandinová dehydrogenáza (PGDH) metabolizuje  $PGF$  na jeho

neaktivní formu, 15-keto- PGF<sub>2α</sub> (Silva 1999). Je logické předpokládat, že podání vyšší dávky exogenního PGF<sub>2α</sub> nebo cloprostenolu by do jisté míry vyrušilo antiluteolytický účinek pramenící ze zvýšené dostupnosti PGDH a snížené koncentrace ET-1 ve fázi nezralého žlutého tělíska CL. Nedávno bylo prokázáno, že zvýšení dávky PGF může posílit luteolytickou odpověď nelaktujících dojníc s nezralým žlutým tělískem ve srovnání s dojnicemi, kterým byla podána standardní dávka (Valdecabres-Torres et al. 2012, 2013). Avšak tyto posledně zmíněné studie nezkoumaly účinek zvyšování dávky PGF během synchronizace ovulace. Navíc pečlivé studium výsledků těchto a dalších studií (Santos et al. 2010; Ribeiro et al. 2012) upozorní na potenciální vlivy dalších faktorů na modulaci luteolytické odpovědi dojníc na různé dávky PGF. Kromě stáří nejmladšího žlutého tělíska v okamžiku podání PGF a individuálních rozdílů mezi zvířaty mohou mít vliv tyto faktory: stav laktace, typ CLO a přítomnost dalších žlutých tělísek společně s primárním tělískem v okamžiku léčby PGF (den estrálního cyklu). Přímé srovnání bohužel kvůli různosti designu studií a metody progesteronového testu není možné.

Cílem této studie bylo charakterizovat účinek dávky a typu luteolytika CLO na luteolytickou odpověď mléčného skotu během studie synchronizace ovulace při různých fyziologických charakteristikách a charakteristikách estrálního cyklu.

## Materiály a metody

### Zvířata a hormonální léčba

Tato studie byla realizována v období od října 2011 do března 2012 na výzkumném statku veterinární fakulty Univerzity CEU Cardenal Herrera (experiment I a II) a od února 2012 do června 2012 na komerčním statku chovajícím mléčný skot (experiment III). Všechny procedury byly provedeny v souladu s Pokyny k péči o zvířata a jejich využívání ve výzkumných studiích španělského Ministerstva zemědělství a byly schváleny Výborem péče o zvířata Univerzity CEU Cardenal Herrera.

U experimentu I a II (na výzkumném univerzitním statku) bylo využito celkem 12 nelaktujících holštýnských krav. Jejich stáří se pohybovalo mezi 2,5 a 11 roky (průměrný věk zvířat byl  $5,3 \pm 2,1$  let). Pět těchto krav ještě nebylo teleno a sedm již bylo teleno několikrát. Na začátku studie krávy měly cyklus a nevykazovaly zjevné děložní nebo vaječnickové abnormality potvrzené ultrazvukem. Zvířata

byla krmena vojtěškovým senem a obilným koncentrátem v krmné dávce vypočtené jako udržovací pro nedojené krávy. Průměrné skóre tělesné kondice bylo  $3,5 \pm 0,6$  (rozsah od 2,5–4, stupnice od 1–5), a průměrná hmotnost  $630 \pm 49$  kg (rozsah 550–690 kg).

V experimentu III (který probíhal na komerčním statku chovajícím mléčný skot) bylo celkem použito 111 laktujících holštýnských krav. Z toho 43 dojníc prodělalo 1 telení, 36 dvě telení, 17 tři telení a 15 víc než 3 telení. Dojnice byly dojeny třikrát denně a ustájeny ve vystlaných kotcích. Statek měl v době pokusu celkem 600 dojníc s průměrnou denní produkcí mléka 33 kg na dojnici.

Všechny dávky PGF (d-CLO; Genestran® aniMedica GmbH, 48308 Senden, Německo nebo d,l-CLO, Estrumate®; MSD Animal Health, 28027 Madrid, Španělsko) a GnRH (0,01 mg buserelin: 2.5 ml Buserelin®; aniMedica GmbH, 48308 Senden, Německo) byly podávány injekčně jednodávkovou injekční stříkačkou do poloblanitého nebo pološlašitého svalu 3,5 cm dlouhými jehlami tloušťky 18 G. Vyšetření dělohy a vaječníků bylo provedeno rektálním ultrazvukovou sondou (Sonosite 180 Vet Plus; BCF Ultrasound Australasia, Nunawading, Vic., Austrálie) vybavenou 8MHz lineárním převodníkem (experiment I a II) a rektální palpací (experiment III).

### Design experimentů

V rámci experimentu I a II byl účinek dávky d-CLO určen u nelaktujících dojníc ve dvou fázích estrálního cyklu: V prvním experimentu byly krávy synchronizovány tak, aby měly jen 5,5 až 6 dní staré žluté tělísko (CL) v okamžiku podání PGF v rámci studie synchronizace ovulace. Stáří žlutého tělíska dojníc v experimentu I v době podání d-CLO bylo vypočteno ze skenů prováděných každých 12 hodin od podání GnRH do okamžiku ovulace. V druhém experimentu byly krávy synchronizovány tak, aby měly v době experimentu >12 dní staré primární žluté tělísko a další CL ve stáří 5,5–6 dní. Oba experimenty využily přesahového designu, kdy každá dojnice prodělala dva po sobě jdoucí cykly (obr. 1). V jednom z těchto cyklů byla synchronizace ovulace vyvolána PGF v dávce buď 150 µg d-CLO (standardní dávka: 2 ml Genestran®) nebo 300 µg d-CLO (dvojitá dávka: 4 ml Genestran®). Podání dvojitě či standardní dávky bylo určeno náhodným výběrem. V rámci každého experimentu byla ponechána doba 2 týdnů mezi po sobě následujícími cykly na vyloučení předchozí dávky z těla. Mezi experimentem I a II bylo ponechá-

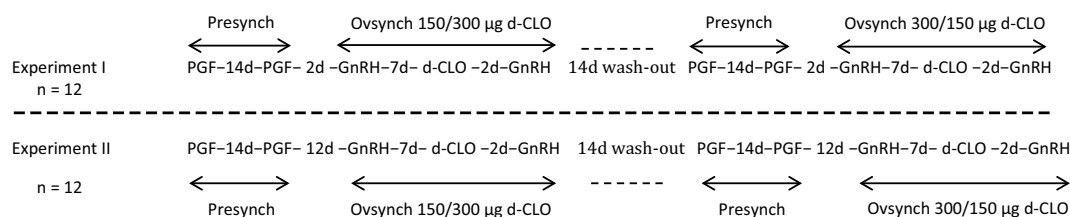


Fig. 1. Representative layout of treatments in cows of Experiments I and II. In each experiment, all cows were used during two consecutive cycles (1st and 2nd Ovsynch). In the first cycle, every cow received either 150 or 300 µg of d-cloprostenol as the PGF of Ovsynch. In the second cycle, every cow received the opposite dose. A resting period of 2 months was allowed between Experiment I and II

no klidové období 2 měsíců. Krávy nebyly inseminovány.

Počet ovulací, následný počet žlutých tělísek a průměr tří největších folikul v rámci každého vyšetření byly zaznamenány. Ultrazvukové vyšetření pro zjištění ovulace bylo prováděno dvakrát denně, aby bylo možno stáří žlutého tělíška určit s přesností 12 hodin. Ultrazvuková vyšetření byla zahájena v době podání GnRH (první a druhé) a pokračovala až do zjištění ovulace. Průměr tří největších folikul byl měřen jednou denně během ranního ultrazvukového vyšetření. Průměr byl vypočten ze dvou měření v pravém úhlu elektronickým posuvným měřítkem a se zmrazením obrazu folikulu v maximální velikosti. Průměr dominantního folikulu (DF) v době podání druhé dávky GnRH pro synchronizaci ovulace byl zpětně potvrzen jako budoucí ovulující folikul.

Každý den byly odebrány vzorky krve pro zjištění koncentrace progesteronu z ocasní žíly těsně před podáním d-CLO a 1, 2 a 3 dny po podání (PGF Ovsynch). Účinek standardní (150 µg) a dvojitě (300 µg lg) dávky d-CLO na stupeň luteolýzy (indikovaný změnou koncentrace progesteronu v periferním oběhu) byl určen těsně před podáním PGF a 1, 2 a 3 dny po něm.

Experiment III měl testovat účinek dávky a typu CLO na luteolytickou odpověď laktujících dojníc na komerčním statku chovajícím mléčný skot. Po normálním otelení (neasistované telení bez následných klinických komplikací v šestinedělí) byla každá dojnice blokována paritou a přesnou rotací zařazena do jedné ze tří léčebných skupin podle podání PGF v rámci synchronizace ovulace: skupina 1 dostala 500 µg d,l-CLO (2 ml Estrumate®), skupina 2 150 µg d-CLO (2 ml Genestran®) a skupina 3 300 µg d-CLO (4 ml Genestran®). První dávka GnRH v programu synchronizace ovulace (dvě podání GnRH 7 dní před a 2 dny po léčbě PGF) byla podána 47–54 dní po začátku laktace (DIM) u krav po více teleních a 87–95 DIM u krav po prvním telení. Všechny krávy byly 20 po druhé dávce GnRH pro

synchronizaci ovulace inseminovány. Vzorky krve byly odebrány těsně před léčbou PGF a v době AI (3 dny po PGF). Diagnóza gravidity byla provedena rektální palpací 40–47 dní po umělé inseminaci (AI).

Pro určení luteolytického účinku léčby PGF byly pro analýzu použity pouze krávy s aktivním žlutým tělískem (progesteron >1 ng/ml) v době ošetření.

### Určení hladiny progesteronu

V rámci všech experimentů byly odebrány vzorky krve z ocasní žíly do 5 ml heparinizovaných zkumavek. Zkumavky byly ihned vloženy do odstředivky a odstředovány po dobu 10 minut rychlostí 2000 × g. Jednotlivé dávky plazmy byly uskladněny při teplotě –20 °C pro pozdější určování. Koncentrace progesteronu v plazmě byly ve všech vzorcích měřeny jednou enzymatickou imuno-analytickou sadou (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel-Wellsee, Německo) o citlivosti 0,04 ng/ml a variačním koeficientem v rámci sady 5 %. Podle koncentrací progesteronu v krvi krav 3 dny po podání PGF byla úplná luteolýza rozdělena na dva stupně: krávy s hladinou progesteronu od 1 do 0,5 ng/ml a krávy s koncentrací progesteronu <0,5 ng/ml.

### Statistická analýza

Všechna data byla testována z hlediska normality. Data, která nebyla normálně rozdělena, byla hierarchizována. Sekvenční data (koncentrace progesteronu) byla analyzována obecným lineárním modelem variance s opakováním pro ošetření autokorelace mezi sekvenčním pozorováním stejných kusů v den 0, 1, 2 a 3 po podání PGF v rámci experimentu I a II (Systat 13®; Systat Software Inc., Chicago, IL, USA). Model zahrnoval dva fixní faktory: dávku d-CLO (dvě množství: 150 a 300 µg d-CLO) a číslo experimentu (dvě čísla: I a II). Pokud byl účinek dávky (standardní nebo dvojitě) nebo pořadí experimentu (I nebo II) významný

Table 1. Oestrus cycle characteristics of non-lactating dairy cows

	Dosed-CLO (ml) <sup>a</sup>	n	Pre-synchronization ovulation (%) <sup>b</sup>	1st GnRH ovulation (%) <sup>c</sup>	Primary CL's age at PGF <sup>d</sup>	Accessory CL's age at PGF <sup>e</sup>	N° of CL <sup>f</sup>	P4 at PGF <sup>g</sup> (ng/ml)	DF at final GnRH (mm) <sup>h</sup>	Final GnRH ovulation (%) <sup>i</sup>
Ex I	2	12	N/A	100.0	5.5 ± 0.1	N/A	1.1	7.3 ± 1.4	15.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	100.0
	4	12	N/A	100.0	5.5 ± 0.1	N/A	1.1	7.2 ± 1.1	14.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	100.0
	Pooled	24	N/A	100.0	5.5 ± 0.1	N/A	1.1	7.2 ± 0.8	14.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	100.0
Ex II	2	12	100.0	66.7	14.8 ± 0.3	5.5 ± 0.0	1.6	7.4 ± 1.1	12.9 ± 0.5 <sup>b</sup>	100.0
	4	12	100.0	75.0	14.5 ± 0.2	5.4 ± 0.1	1.8	7.0 ± 1.0	12.3 ± 0.5 <sup>b</sup>	100.0
	Pooled	24	100.0	70.8	14.7 ± 0.2	5.5 ± 0.0	1.7	7.2 ± 0.7	12.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	100.0

aDose of d-cloprostenol (150 µg: 2 ml Genestran; and 300 µg: 4 ml Genestran) administered as the PGF of Ovsynch.

bPercentage of cows ovulating after the second PGF administration of the pre-synchronization protocol (two PGF injections 14 days apart) in cows from Experiment II. The interval from last PGF treatment to ovulation varied from 3 to 7 days.

cPercentage of cows ovulating after the first GnRH administration of Ovsynch.

dInterval (in days) from ovulation after the last PGF of pre-synchronization in Experiment II and after the first GnRH of Ovsynch in Experiment I to administration of d-CLO of Ovsynch.

eInterval (in days) from ovulation after the first GnRH in cows from Experiment II to administration of d-CLO of Ovsynch.

fNumber of corpora lutea at the time of the d-CLO administration of Ovsynch.

gPlasma progesterone concentration at the time of d-CLO administration of Ovsynch.

hDiameter of the ovulatory dominant follicle at the time of the second GnRH of Ovsynch.

iPercentage of cows ovulating following the final (second) GnRH administration of Ovsynch.

Pooled: within each Experiment, d-CLO dose data were pooled so that a statistical analysis could be performed between Experiments I and II.

Within column, different letters (a, b) indicate significant difference in follicle diameter ( $p < 0.05$ ).

nebo se rozdíl významnosti blížil, byla data dále zkoumána Studentovým t-testem.

Údaje o početnosti (procento dojnic s plnou luteolýzou a počet gravidit po umělé inseminaci AI) byly analyzovány  $\times 2$  testem nebo Fisherovým exaktním testem. A konečně účinek dávky d-CLO a pořadí experimentu na průměr dominantního folikulu DF v okamžiku posledního GnRH v rámci synchronizace ovulace byl vypočten t-testem dvou vzorků.

Pravděpodobnost  $p < 0,05$  znamenala statistickou významnost rozdílu a pravděpodobnost v rozmezí  $p > 0,05$  a  $p < 0,1$  znamenala, že se rozdíl blížil statistické významnosti. Data jsou uváděna jako průměr SEM, pokud není uvedeno jinak.

## Výsledky

Charakteristiky estrálního cyklu dojnic z experimentu I a II ukazuje tabulka 1. Průměr dominantního folikulu DF v okamžiku druhého podání GnRH se pro jednotlivé dávky významně nelišil ( $15,3 \pm 0,5$  mm pro standardní dávku oproti  $14,6 \pm 0,5$  mm pro dvojitou dávku; Tabulka 1). Na druhé straně zvířata z experimentu I (bez ohledu na dávku CLO) vykazovala větší ( $p < 0,01$ ; tabulka 1) průměr DF ( $14,9 \pm 0,3$  mm) v době druhé dávky GnRH oproti zvířatům zařazeným do experimentu II ( $12,7 \pm 0,3$  mm).

V rámci experimentu I všechna zvířata ovulovala po prvním podání GnRH a proto měla v době ošetření d-CLO jediné žluté tělísko CL. V experimentu II byly všechny dojnice úspěšně synchronizovány, proto měly v době synchronizace ovulace podáním PGF žluté tělísko ve stáří  $14,8 \pm 0,3$  v případě standardní dávky a  $14,5 \pm 0,2$  dní v případě dvojitě dávky (tabulka 1). Celkově 70,8 % (17/24) zvířat z experimentu II odpovědělo ovulací na první GnRH synchronizaci ovulace (8/12 v případě standardní dávky

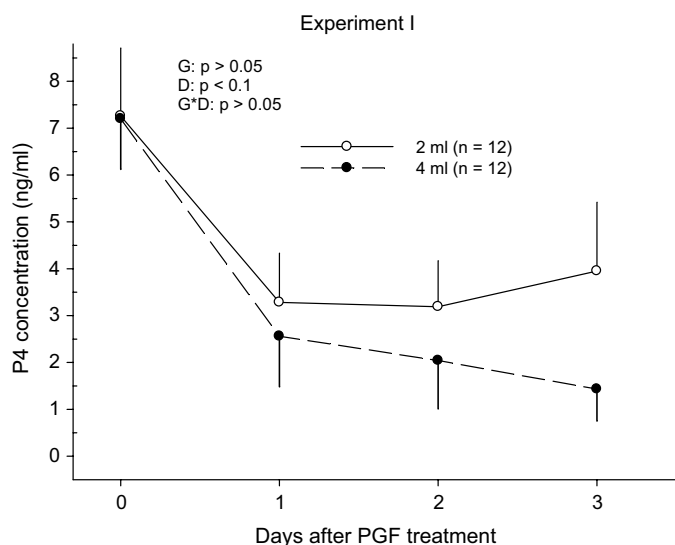


Fig. 2. Mean SEM plasma concentration of cows from Experiment I, 0 to 3 days after treatment with 150 lg (2 ml of Genestran) or 300 lg (4 ml of Genestran) of d-cloprostenol. The probabilities for the effect of dose (group, G), day (D) and day-by-dose interaction (G\*D) on the progesterone concentration are shown

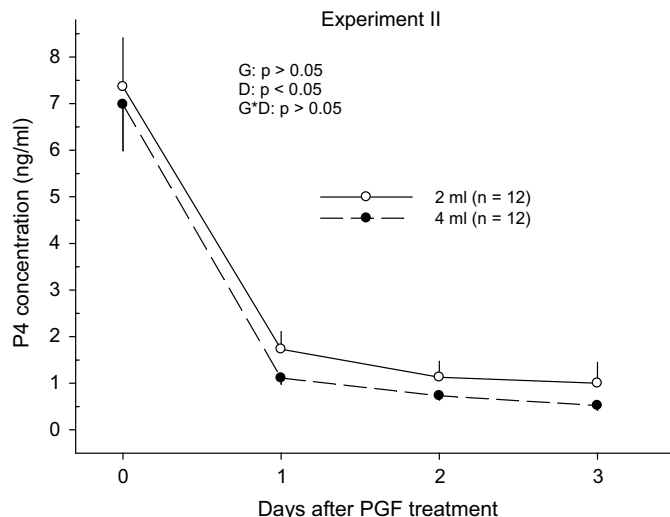


Fig. 3. Mean SEM plasma concentration of cows from Experiment II, 0–3 days after treatment with 150 lg (2 ml of Genestran) or 300 lg (4 ml of Genestran) of d-cloprostenol. The probabilities for the effect of dose (group, G), day (D) and day by dose interaction (G\*D) on the progesterone concentration are shown

Table 2. Effect of dose of d-CLO and experiment on luteolysis in non-lactating dairy cows

Experiment	Groups	Dose d-CLO	P4 < 1 ng/ml			P4 < 0.5 ng/ml		
			D1	D2	D3	D1	D2	D3
Ex I	2 ml		2/12	4/12	6/12	1/12	1/12	4/12
			17%	33%	50%	8%	8%	33%
			5/12	8/12	8/12	0/12	2/12	7/12
Ex II	2 ml		4/12	9/12	10/12	0/12	2/12	10/12
			33%	75%	83%	0%	17%	83%
			7/12	10/12	11/12	0/12	3/12	10/12
Ex I	Pooled		7/24	12/24	14/24	1/24	3/24	11/24
			29%	50%	58%	4%	12%	46%
			11/24	19/24	21/24	0/24	5/25	20/24
Ex II	Pooled		11/24	19/24	21/24	0/24	5/25	20/24
			46%	79%	87%	0%	21%	83%
			p-value	0.1	0.01	0.007	NS	NS

Dose of d-CLO: 150 lg (2 ml of Genestran) and 300 lg (4 ml of Genestran) of d-cloprostenol.

P4: Plasma progesterone concentration 1 day (D1), 2 days (D2) and 3 days (D3) after treatment with the standard (2 ml) or double (4 ml) dose of d-CLO. NS, not significant ( $p > 0,05$ ).

a 9/12 v případě dvojitě dávky; tabulka 1). Přítomnost dalšího žlutého tělíska (odpověď ovulací na první GnRH synchronizace ovulace) neměla vliv na luteolytickou odpověď na léčbu PGF (bez ohledu na dávku CLO): 15 ze 17 (88 %) dojnic s primárním a dalším žlutým tělískem dosáhlo úplné luteolýzy 3 dni po podání PGF (progesteron  $< 0,5$  ng/ml) ve srovnání s 6 ze 7 (86 %) krav pouze s primárním tělískem CL ( $p > 0,05$ ).

Koncentrace progesteronu 1–3 dny po podání PGF nebyly ovlivněny dávkou d-CLO ( $p > 0,05$ ; obr. 2 a 3). Avšak víc zvířat z experimentu I ( $p = 0,08$ ) dospělo k plné luteo-

## Effect of Cloprostenol Dose in Ovsynch

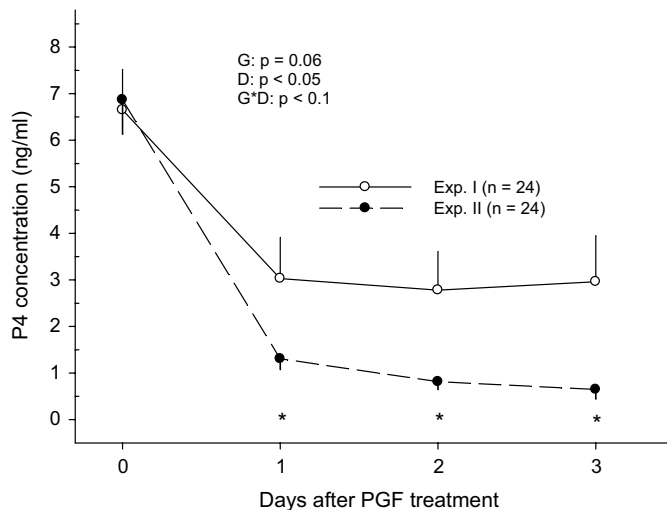


Fig. 4. Mean SEM plasma concentration of cows from Experiment I and II, 0–3 days after d-cloprostenol administration. Within each experiment, progesterone data from both d-cloprostenol dose groups (2 and 4 ml) were pooled. The probabilities for the effect of Experiment (group, G), day (D) and day-by-group (Experiment) interaction (G\*D) on the progesterone concentration are shown. An asterisk (\*) indicates that the mean difference in progesterone concentration between cows from Experiment I and II was significantly different on a given day

lyze po léčbě dvojitou dávkou d-CLO (67%) v porovnání se skupinou, které byla podána standardní dávka (33 %; Tabulka 2). V experimentu II nebyl rozdíl v procentu zvířat s koncentrací progesteronu pod 1 nebo 0,5 ng/ml mezi jednotlivými dávkami d-CLO žádný den po podání PGF ( $p > 0,1$ ; Tabulka 2). Naproti tomu byla koncentrace progesteronu ovlivněna ( $p = 0,06$ ) počtem experimentů (bez ohledu na dávku d-CLO): dojnícím z experimentu II byl naměřen vyšší úbytek ( $p < 0,05$ ; obr. 4) koncentrace progesteronu 1–3 dny po podání PGF než v případě krav z experimentu I.

Počet dní po podání neměl vliv na koncentrace progesteronu ve vztahu k interakci dávek ( $p > 0,05$ ; obr. 2 a 3), ale rozdíl mezi jednotlivými dny byl pozorován z hlediska léčených skupin (experiment I oproti II) ( $p < 0,1$ ; obr. 4). To se projevilo zvýšením koncentrace progesteronu u zvířat z experimentu I mezi 2. a 3. dnem po podání, v porovnání s postupným poklesem koncentrací progesteronu

mezi dny 0 a 3 (minimální koncentrace) po podání u zvířat zařazených do experimentu II.

V experimentu III nebylo procento laktujících dojnic s plnou luteolýzou ovlivněno ani dávkou d-CLO ani typem CLO: 87,1 %, 84,8 % a 86,2 % krav s hladinou progesteronu  $< 1$  ng/ml a 61,3 %, 66,7 % a 79,3 % krav s hladinou progesteronu  $< 0,5$  ng/ml 3 dny po podání 500 lg d,l-CLO, 150 a 300 lg d-CLO, v uvedeném pořadí ( $p > 0,05$ ). A konečně jednotlivými luteolytickými terapiemi nebyl významně ovlivněn ani počet gravidit po první umělé inseminaci AI: 37,8 %, 36,8 % a 36,1 %, pro d, l-CLO, d-CLO standardní dávku a d-CLO dvojitou dávku.

Pravděpodobnost gravidity dojnic nebyla ovlivněna stupněm luteolýzy po podání PGF ( $p > 0,05$ ; Tabulka 3): 14,6 % krav s částečnou luteolýzou (koncentrace progesteronu  $> 1$  ng/ml) bylo úspěšně uměle inseminováno a u 14,3 % po umělé inseminaci gravidita nenastala.

## Diskuse

Výsledky této studie ukazují, že hlavním omezujícím faktorem provedení vyvolané luteolýzy je den estrálního cyklu (neboli délka doby pod vlivem progesteronu), v němž je dávka léčiva podána, a nikoliv stáří nejmladšího žlutého tělíska, jak se obecně myslelo. V experimentu II byla všechna zvířata přibližně ve 14. dni estrálního cyklu (s primárním žlutým tělískem 14 dní starým), když dostala PGF pro synchronizaci ovulace. U těchto dojnic byla zaznamenána relativně vysoká luteolytická odpověď na dávku PGF (celkem 87 % dojnic dosáhlo plné luteolýzy do 3 dnů od podání léčby, s koncentrací progesteronu  $< 1$  ng/ml). Tato pozitivní luteolytická odpověď nebyla ovlivněna přítomností dalšího žlutého tělíska stáří 5,5 dní v okamžiku podání přípravku. Naopak v případě dojnic v 5.–6. dni estrálního cyklu (experiment I) byla luteolytická odpověď na podání PGF horší (jen 58 % krav dosáhlo poklesu koncentrace progesteronu  $< 1$  ng/ml). V protikladu k obecně panující domněnce stáří nejmladšího žlutého tělíska v okamžiku podání PGF nemělo vliv na luteolytickou odpověď krav z experimentu I a II, kdy stáří nejmladšího žlutého tělíska bylo u zvířat z obou experimentů podobné.

Důvod, proč den cyklu ovlivnil luteolytický dopad podání PGF, zůstává nejasný. Dřívější výzkumy prokázaly, že nejdůležitějším limitujícím faktorem kompletní luteolýzy je stáří žlutého tělíska (Rowson et al. 1972; Inskeep 1973;

Table 3. Effect of degree of progesterone concentration and luteolysis on the likelihood of pregnancy in lactating dairy cows

Future pregnancy status	n	P4 concentration at PGF (ng/ml)	Cows with	Cows with	P4 concentration at AI (ng/ml)	Cows with	Cows with
			P4 $< 1$ ng/ml at PGF	P4 $< 0.5$ ng/ml at PGF		P4 $> 1$ ng/ml at AI	P4 $> 0.5$ ng/ml at AI
Negative	70	$4.6 \pm 0.5^a$	14/70 20% <sup>a</sup>	11/70 15.5% <sup>a</sup>	$0.92 \pm 0.2^a$	10/70 14.3% <sup>a</sup>	23/70 32.9% <sup>a</sup>
Positive	41	$6.5 \pm 0.9^a$	4/41 9.7% <sup>a</sup>	3/41 7.3% <sup>a</sup>	$0.76 \pm 0.2^a$	6/41 14.6% <sup>a</sup>	11/41 26.8% <sup>a</sup>

Within column, different letters (a, b) indicate significant difference.

Henricks et al. 1974; Beal et al. 1980; Valldecabres-Torres et al. 2012). Avšak u zvířat zařazených do experimentu II se ukázalo, že přítomnost staršího žlutého tělíska v době podání PGF překonala rezistenci mladšího dalšího tělíska proti luteolýze. V nedávném experimentu pouze 20 % dojnic dospělo k plné luteolýze po podání jedné standardní dávky d-CLO 4,5–5 dní po ovulaci (Valldecabres-Torres et al. 2012). Není proto překvapující, že v naší studii k plné luteolýze došlo u 50 % dojnic ošetřených standardní dávkou d-CLO 5,5 dní po ovulaci (experiment I). Proto se zdá, že stáří žlutého tělíska 5 až 6 dní je hraniční ve smyslu citlivosti na exogenní PGF (Shaham-Albalancy et al. 2000; Beltman et al. 2009). Naproti tomu vývoj nově vytvořeného žlutého tělíska za vysoké koncentrace progesteronu nějak umožňuje rychlejší vývoj citlivosti na exogenně vyvolanou luteolýzu, jak tomu bylo v případě dojnic z experimentu II. Avšak autorům tohoto článku není znám žádný vědecký důkaz potvrzující tuto hypotézu, proto toto tvrzení prozatím zůstává na úrovni spekulace. Na její potvrzení je potřeba další výzkum zahrnující podání exogenního progesteronu různým zvířatům. Na druhé straně je třeba tyto výsledky interpretovat s opatrností, protože velikost vzorků v prvním a druhém experimentu byla poměrně malá a jejich výsledky proto musí být potvrzeny na větším vzorku.

Laktující dojnice (experiment 3) vykazují podobnou luteolytickou odpověď (asi 85% dojnic s plnou luteolýzou) jako dojnice nelaktující, které byly zkoumány v experimentu II (87 %). Protože dojnice z experimentu III nebyly předem synchronizovány, byla jim synchronizační léčba ovulace podána v náhodných fázích estrálního cyklu. Proto se u nich v době synchronizace přípravkem PGF očekávalo další žluté tělísko kromě primárního (Pursley & Martins 2012).

Účinek dávky d-CLO na luteolytickou odpověď nebyl u předem synchronizovaných nelaktujících (experiment II) a laktujících (experiment III) zvířat během původní synchronizace ovulace patrný (experiment III). Avšak u krav s pouze jedním žlutým tělískem o stáří 5,5 dní (experiment I) mělo podání 300 µg d-CLO (dvojitá dávka) tendenci zajistit vyšší procento zvířat s plnou luteolýzou. Lepší luteolytický účinek dvojitě dávky d-CLO byl rovněž pozorován u krav ošetřených v počátečních fázích estrálního cyklu (Valldecabres-Torres et al. 2012). Podobná studie potvrdila lepší účinky na luteolýzu u kobyly, kterým byla podána vyšší dávka PGF v raných fázích estrálního cyklu (Cuervo-Arango & Newcombe 2012). Avšak podávání vyšších dávek PGF podle protokolu synchronizace ovulace na komerčních statcích chovajících mléčný skot se nedoporučuje, protože pozitivní luteolytický účinek by nebyl zjištěitelný. Kromě toho výsledky inseminace laktujících dojnic v této studii nepodporují používání vyšších dávek v původním protokolu synchronizace ovulace.

S úspěšnou inseminací koreluje předovulační průměr dominantního folikulu DF v okamžiku podání druhé synchronizační dávky GnRH (Bello et al. 2006). V této studii předovulační průměr dominantního folikulu nebyl dáv-

kou PGF ovlivněn. Na druhé straně měl na průměr DF vliv den cyklu, v němž byla podána druhá synchronizační dávka GnRH. Zvířata v pozdější fázi cyklu (asi ve 14. dni v případě experimentu II) měla průměr DF asi o 2 mm menší než byl průměr dominantního folikulu u krav z experimentu I (6. den jejich estrálního cyklu). Tento nápadný rozdíl v předovulačním průměru dominantního folikulu u zvířat z experimentu I a II může být vysvětlen růzností intervalu mezi vznikem folikulové vlny a podáním druhé synchronizační dávky GnRH. Zda se v těle předsynchronizovaného zvířete vyvine další žluté tělísko či nikoliv se nezdá mít vliv na konečný předovulační průměr dominantního folikulu v době podání druhé synchronizační dávky GnRH (Bello et al. 2006). Navíc se ukázalo, že koncentrace progesteronu nemá vliv na předovulační dominantní folikul, jak se dříve tvrdilo (Pursley a Martins 2012).

Nedávno bylo prokázáno, že dojnice s koncentrací progesteronu >0,5 ng/ml v době umělé inseminace (AI) mají sníženou šanci na úspěšnou koncepci (Souza et al. 2007; Martins et al. 2011). Konkrétně pouze u 8 % krav byla zjištěna gravidita při koncentraci progesteronu v rozmezí 1 a 0,5 ng/ml naměřené 2 dny po podání PGF (Martins et al. 2011). V naší studii celých 26,8 % krav s diagnostikovanou graviditou mělo v době umělé inseminace hladinu progesteronu >0,5 ng/ml. Tento výsledek je mnohem vyšší, než bylo uváděno dosud (Martins et al. 2011) a neliší se významně od počtu zvířat s hladinou progesteronu >0,5 ng/ml v době umělé inseminace, u nichž gravidita diagnostikována nebyla (32,9 %). Možným vysvětlením tohoto znatelného rozdílu mezi studii může být použití odlišných analytických metod (ELISA vs RIA) určení koncentrace progesteronu (Colazo et al. 2008).

Závěrem lze uvést, že den estrálního cyklu, v němž byla podána dávka PGF pro synchronizaci ovulace měl vliv na luteolytickou odpověď nelaktujících dojnic. Naproti tomu se zdá, že stupeň luteolýzy není ovlivňován dávkou PGF ani fyziologickým stavem v době ošetření. Zvířata se stářím primárního žlutého tělíska 14 dní v době synchronizace dávkou PGF měla menší průměr dominantního folikulu v době druhého cyklu GnRH v porovnání s dojnicemi s pouze jedním 5,5 dne starým žlutým tělískem. A konečně typ ani dávka CLO neměly žádný vliv na luteolýzu či graviditu laktujících dojnic testovaných na komerčním chovném statku.

### Poděkování

Tuto studii financovala Univerzita CEU Cardenal Herrera (projekt číslo PRCEU-UCH 04/11). Tento článek se má stát součástí dizertační práce Xaviera Valldecabrese Torrese. Autoři děkují členům INIA (Katedra reprodukce, Madrid) za technickou pomoc při určování koncentrací progesteronu. Zvláštní poděkování patří Dr. Heinrichu Althausovi (aniMedica GmbH) za laskavé poskytnutí Genestranu a Buserelinu pro tuto studii. A konečně autoři děkují pánům Angel Garcia Munozovi a Empar Garcia Rosellovi za podporu při přípravě této studie.

## Konflikt zájmů

Žádný z autorů neví o žádném konfliktu zájmů, který by zde uvedl.

## Příspěvky jednotlivých autorů

X. Valldecabres provedl sběr a zpracování dat z experimentů I a II. P. Larrosa provedl sběr dat v rámci experimentu III. J. Cuervo-Arango sestavil protokol studie, provedl statistické analýzy, sepsal a redigoval rukopis článku.

## Reference

- Beal WE, Milvae RA, Hansel W, 1980: Oestrous cycle length and plasma progesterone concentrations following administration of prostaglandin F-2 $\alpha$  early in the bovine oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 59, 393–396.
- Bello NM, Steibel JP, Pursley JR, 2006: Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 89, 3413–3424.
- Beltman ME, Roche JF, Lonergan P, Forde N, Crowe MA, 2009: Evaluation of models to induce low progesterone during the early luteal phase in cattle. *Theriogenology* 72, 986–992.
- Bourne GR, Moss SR, Phillips PJ, Shuker B, 1980: The metabolic fate of the synthetic prostaglandin cloprostenol ('Estrumate') in the cow: use of ion cluster techniques to facilitate metabolite identification. *Biomed Mass Spectrom* 7, 226–230.
- Brusveen DJ, Souza AH, Wiltbank MC, 2009: Effects of additional prostaglandin F2 $\alpha$  and estradiol-17 $\beta$  during Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 92, 1412–1422.
- Colazo MG, Ambrose DJ, Kastelic JP, Small JA, 2008: Comparison of 2 enzyme immunoassays and a radioimmunoassay for measurement of progesterone concentrations in bovine plasma, skim milk, and whole milk. *Can J Vet Res* 72, 32–36.
- Cuervo-Arango J, Newcombe JR, 2012: Relationship between dose of cloprostenol and age of corpus luteum on the luteolytic response of early dioestrous mares: a field study. *Reprod Domest Anim* 47, 660–665.
- Girsh E, Wang W, Mamluk R, Arditi F, Friedman A, Milvae RA, 1996: Regulation of the endothelin-1 expression in the bovine corpus luteum: elevation by prostaglandin F2 $\alpha$ . *Endocrinology* 137, 5191–5196. 6 X Valldecabres-Torres, P Larrosa-Morales And J Cuervo-Arango © 2013 Blackwell Verlag GmbH
- Henricks DM, Long JT, Hill JR, Dickey JF, 1974: The effect of prostaglandin F2 $\alpha$  during various stages of the oestrous cycle of beef heifers. *J Reprod Fertil* 4, 113–120.
- InskeepEK, 1973: Potential uses of prostaglandins in control of reproductive cycles of domestic animals. *J Anim Sci* 36, 1149–1157.
- Kindahl H, Edquist LE, Bane A, Granstrom E, 1976: Blood levels of progesterone and 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin F2 $\alpha$  during the normal oestrous cycle and early pregnancy in heifers. *Acta Endocrinol (Copenh)* 82, 134–149.
- Kral J, 1988: Effects of optically active isomers of Cloprostenol on secretory activity of corpus luteum. *Biol Chem Zivocisme* 24, 217–221.
- Levy N, Kobayashi S, Roth Z, Wolfenson D, Miyamoto A, 2000: Administration of prostaglandin F2 $\alpha$  during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and its Type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. *Biol Reprod* 63, 377–382.
- Mamluk R, Levy N, Rueda B, Davis JS, Meidan R, 1999: Characterization and regulation of type A endothelin receptor gene expression in bovine luteal cell types. *Endocrinology* 140, 2110–2116.
- Martins JP, Policelli RK, Neuder LM, Raphael W, Pursley JR, 2011: Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F2 $\alpha$  of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 94, 2815–2824.
- Pursley JR, Martins JP, 2012: Impact of circulating concentrations of progesterone and antral age of the ovulatory follicle on fertility of high-producing lactating dairy cows. *Reprod Fertil Dev* 24, 267–271.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC, 1995: Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology* 44, 915–923.
- Reeves PR, 1978: Distribution, elimination, and residue studies in the cow with the synthetic prostaglandin estrumate. *J Agric Food Chem* 26, 152–155.
- Ribeiro ES, Bisinotto RS, Favoretto MG, Martins LT, Cerri RLA, Silvestre FT, Greco LF, Thatcher WW, Santos JEP, 2012: Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F2 $\alpha$  as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 78, 273–284.
- Rowson LE, Tervit R, Brand A, 1972: The use of prostaglandins for synchronization of oestrus in cattle. *J Reprod Fertil* 29, 145.
- Santos JE, Narciso CD, Rivera F, Thatcher WW, Chebel RC, 2010: Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *J Dairy Sci* 93, 2976–2988.
- Sayre BL, Taft R, Inskeep EK, Killefer J, 2000: Increased expression of insulin-like growth factor binding protein-1 during induced regression of bovine corpora lutea. *Biol Reprod* 63, 21–29.
- Shaham-Albalancy A, Rosenberg M, Folman Y, Graber Y, Meidan R, Wolfenson D, 2000: Two methods of inducing low plasma progesterone concentrations have different effects on dominant follicles in cows. *J Dairy Sci* 83, 2771–2778.
- Silva PJ, 1999: Prostaglandin metabolism in the ovine corpus luteum. PhD dissertation. Colorado State University, Ft. Collins, CO.
- Skarzynski DJ, Okuda K, 1999: Sensitivity of bovine corpora lutea to prostaglandin F2 $\alpha$  is dependent on progesterone, oxytocin and prostaglandins. *Biol Reprod* 60, 1292–1298.
- Souza AH, Gumen A, Silva EP, Cunha AP, Guenther JN, Peto CM, Caraviello DZ, Wiltbank MC, 2007: Supplementation with estradiol-17 $\beta$  before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 90, 4623–4634.
- Tsai SJ, Wiltbank MC, 1997: Prostaglandin F2 $\alpha$  induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. *Biol Reprod* 57, 1016–1022.
- Tsai SJ, Wiltbank MC, 1998: Prostaglandin F2 $\alpha$  regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biol Reprod* 58, 346–352.
- Valldecabres-Torres X, Garcia-Rosello E, Garcia-Muñoz A, Cuervo-Arango J, 2012: Effects of d-cloprostenol dose and corpus luteum age on ovulation, luteal function, and morphology in nonlactating dairy cows with early corpora lutea. *J Dairy Sci* 95, 4389–4395.
- Valldecabres-Torres X, Garcia-Muñoz A, Garcia-Rosello E, Cuervo-Arango J, 2013: Use of a split or single PGF2 $\alpha$  treatment in a 6-day synchronization protocol for non-lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 96, 1647–1652.

**Submitted: 27 Nov 2012; Accepted: 8 Apr 2013**

Author's address (for correspondence): Dr. Juan Cuervo-Arango, Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad CEU Cardenal Herrera, 46113 Moncada, Valencia, Spain. E-mail: juan.cuervo@uch.ceu.es



**Dr. Bubeníček**

Dr. Bubeníček, spol. s r. o.  
Šimáčkova 104, 628 00 Brno  
tel/fax: +420 544 231 413  
mobil: +420 602 586 622;  
+420 737 118 749  
e-mail: info@bubenicek.cz

**www.bubenicek.cz**