

## WSKAŹNIKI REPRODUKCYJNE KRÓLIKÓW INSEMINOWANYCH NASIENIEM Z DODATKIEM ANALOGU GnRH [DES-GLY10, D-ALA6]-LH-RH ETHYLAMIDE\*

Piotr Gogol

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

*Celem badań była ocena wpływu dawki analogu GnRH [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide wprowadzonego do nasienia na wskaźniki reprodukcyjne inseminowanych samic. Samice linii syntetycznej Hyplus inseminowano w 14. dniu po wykocie i wywoływano owulację poprzez iniekcję domięśniową 1 µg busereliny (grupa kontrolna) lub podanie w dawce inseminacyjnej 10, 15 lub 25 µg [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide. Skuteczność zastosowanych procedur oceniano na podstawie odsetka samic wykończonych oraz średniej liczby królików urodzonych w miocie ogółem i żywych. Wyniki uzyskane po podaniu dopochwowym 10, 15 i 25 µg [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide nie różniły się istotnie od uzyskanych w grupie kontrolnej. Dawka analogu GnRH podanego w nasieniu miała natomiast istotny wpływ na średnią liczbę królików urodzonych w miocie ogółem i żywych. Uzyskana przy dawce 25 µg analogu na samicę średnia liczba młodych urodzonych w miocie ogółem (10,99) i żywych (10,59) była istotnie wyższa niż przy dawce 10 µg (9,84 urodzonych ogółem i 9,57 żywych). Przy dawce 15 µg analogu na samicę średnia liczba młodych urodzonych w miocie ogółem (10,66) i żywych (10,29) była niemal identyczna jak w grupie kontrolnej (odpowiednio 10,57 urodzonych ogółem i 10,11 żywych). Badany analog GnRH podany w dawce inseminacyjnej w ilości 15 µg i 25 µg na samicę pozwala na uzyskanie wskaźników reprodukcyjnych porównywalnych z uzyskiwanymi po użyciu standardowej metody wywoływania owulacji (iniekcja domięśniowa GnRH). Użycie wyższej dawki hormonu może mieć korzystny wpływ na liczbę młodych urodzonych w miocie, ale wymaga to potwierdzenia w badaniach na większej liczbie zwierząt.*

*Słowa kluczowe: króliki, inseminacja, wskaźniki reprodukcyjne, GnRH*

Inseminacja jest metodą rozrodu powszechnie stosowaną na fermach królików. Ponieważ króliki są zwierzętami, u których występuje owulacja prowokowana (krycie indukuje wyrzut LH z przysadki mózgowej prowadzący do owulacji), zastosowanie sztucznego unasienniania musi być połączone ze sztucznym wywołaniem owulacji.

---

\*Źródło finansowania: Fundusz Badań Własnych IZ PIB: nr zadania 07-2.01.7.

W praktyce najczęściej stosowaną metodą wywoływania owulacji u królików jest iniekcja domięśniowa lub podskórna hormonu GnRH lub jego syntetycznych analogów. Obecnie z powodzeniem stosowane są różne analogi GnRH, np. gonadorelina, buserelina, triptorelina, leuprolerina. Alternatywną metodą wywoływania owulacji u królików może być dopochwowe podanie GnRH lub jego analogów w dawce inseminacyjnej (Quintela i in., 2004; Viudes-de-Castro i in., 2007; Vicente i in., 2008; Zapletal i Pavlik, 2008). Takie postępowanie ma szereg zalet. Rezygnacja z iniekcji domięśniowej lub podskórnej powoduje zmniejszenie stresu i wyeliminowanie bólu, przyczyniając się do poprawy dobrostanu zwierząt. Ponadto dodanie hormonu do nasienia pozwala na uproszczenie procedury inseminacji i zmniejszenie czasu, jaki hodowca musi poświęcić na jej wykonanie.

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 i in., 2014; Gogol, 2016a). Uzyskane wyniki są zachęcające, ale przed wprowadzeniem tej metody wywoływania owulacji do praktyki fermowej konieczne są dalsze prace nad określeniem przydatności poszczególnych analogów GnRH i ustaleniem ich optymalnych dawek. Obserwacje Quinteli i in. (2004) wskazują, że absorpcja hormonu przez błonę śluzową pochwy przebiega szybciej niż to ma miejsce przy iniekcji domięśniowej, ale znaczna część hormonu dostarczonego w dawce inseminacyjnej nie ulega absorpcji i dlatego dawka ta powinna być znacznie wyższa niż w przypadku iniekcji domięśniowej.

Ponieważ analogi GnRH są absorbowane przez błonę śluzową pochwy mniej efektywnie niż w przypadku podania domięśniowego (Okada i in., 1982), konieczne jest poszukiwanie i testowanie analogów o wysokiej aktywności. Jednym z takich analogów jest [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH etylamide, którego aktywność jest 14 razy wyższa w porównaniu do gonadoreliny (Conn i Crowley, 1991). Wyniki badań Quinteli i in. (2009) i Gogola (2015) wskazują na możliwość skutecznego indukowania owulacji poprzez podanie [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH etylamide w dawce inseminacyjnej, jednak nie dały jednoznacznej odpowiedzi, jaka dawka tego analogu może być zalecana do stosowania w praktyce fermowej.

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu dawki analogu GnRH [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH etylamide wprowadzonego do nasienia na wskaźniki reprodukcyjne inseminowanych samic.

## Material i metody

Materiał doświadczalny stanowiły dojrzałe płciowo króliki, samce i samice linii syntetycznej Hyplus. Zwierzęta utrzymywano pojedynczo w klatkach w pomieszczeniu zamkniętym przy temperaturze 20–23°C i wilgotności względnej 60–75%. Króliki żywione były komercyjną pełnodawkową mieszanką granulowaną zawierającą 18,7% białka ogólnego, 4,8% tłuszczu i 14,7% włókna surowego. Samice miały nieograniczony dostęp do paszy, natomiast w przypadku samców dawka była ograniczona do 180 g na dzień. Dostęp do wody był nieograniczony. Badania przeprowadzono na 423 samicach w laktacji, wieloródkach odchowujących 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 wybierano losowo do czterech grup i unasieniano w czternastym dniu po wykocie, stosując następujące metody wywoływania owulacji:

a) Grupa doświadczalna 1: 10  $\mu\text{g}$  [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide w dawce inseminacyjnej,

b) Grupa doświadczalna 2: 15  $\mu\text{g}$  [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide w dawce inseminacyjnej,

c) Grupa doświadczalna 3: 25  $\mu\text{g}$  [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide w dawce inseminacyjnej,

d) Grupa kontrolna: 1  $\mu\text{g}$  busereliny (Receptal, Hoechst, Niemcy) w iniekcji domięśniowej bezpośrednio po unasienianiu.

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 przy temperaturze 37°C. Koncentrację plemników określano metodą mikroskopową przy użyciu komory Bürkera. Ejakulaty charakteryzujące się ruchem postępowym plemników na poziomie minimum 70% łączono, a następnie rozrzedzano rozcieńczalnikiem Galap do uzyskania koncentracji plemników na poziomie 50 mln/ml. Rozcieńczone nasienie dzielono na 4 części. Jedną część, bez dodatku GnRH, była użyta do inseminacji samic w grupie kontrolnej. Kolejne części, z dodatkiem [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide na poziomie 20, 30 i 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  były użyte do inseminacji samic w grupach doświadczalnych 1, 2 i 3. Samice inseminowano przy użyciu jednorazowych plastikowych pipet dawką nasienia o objętości 0,5 ml zawierającą 25 mln plemników. Skuteczność inseminacji oceniano na podstawie odsetka samic wykończonych oraz średniej liczby królików urodzonych w miocie ogółem i żywych.

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

Wyniki inseminacji po wprowadzeniu analogu GnRH do dawki inseminacyjnej przedstawiono w tabeli 1. Nie stwierdzono istotnego wpływu metody wywoływania owulacji i dawki analogu GnRH dodanego do nasienia na odsetek samic wykończonych. Odsetek ten był na podobnym poziomie we wszystkich grupach i wahał się od 85,4% w grupie doświadczalnej 1 do 87,7% w grupie doświadczalnej 3. Dawka analogu GnRH dodanego do nasienia miała istotny wpływ na średnią liczbę młodych urodzonych w miocie ogółem i żywych. Najwyższe wartości stwierdzono w grupie doświadczalnej 3, a najniższe w grupie doświadczalnej 1 ( $P \leq 0,05$ ). Uzyskana przy dawce 15  $\mu\text{g}$  analogu na samice średnia liczba młodych urodzonych w miocie ogółem (10,66)

i żywych (10,29) była niemal identyczna jak w grupie kontrolnej (odpowiednio 10,57 urodzonych ogółem i 10,11 żywych). Niższa dawka (10 µg) spowodowała obniżenie, natomiast wyższa (25 µg) podwyższenie średniej liczby młodych królików w miocie w stosunku do grupy kontrolnej, jednak obserwowane różnice nie były statystycznie istotne.

Tabela 1. Wskaźniki reprodukcyjne samic inseminowanych nasieniem z dodatkiem analogu GnRH [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide. (średnia ± odchylenie standardowe)  
Table 1. Reproductive parameters of rabbit does inseminated with semen supplemented with GnRH analogue [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide (mean ± standard deviation)

Grupa Group	Liczba samic inseminowanych Number of inseminated does	Liczba samic wykończonych (%) Kindling rate	Liczba młodych w miocie Number of young per litter	
			ogółem total	żywe live
10 µg GnRH/samicę 10 µg GnRH/does	130	111 (85,4)	9,84±3,07 a	9,57±3,02 a
15 µg GnRH/samicę 15 µg GnRH/does	80	70 (87,5)	10,66±2,29 ab	10,29±2,43 ab
25 µg GnRH/samicę 25 µg GnRH/does	130	114 (87,7)	10,99±2,80 b	10,59±2,96 b
Kontrolna Control	83	72 (86,7)	10,57±2,84 ab	10,11±2,95 ab

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

a, b – values in the same column with different letters are statistically different ( $P \leq 0,05$ ).

## Omówienie wyników

Prezentowane wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje Quinteli i in. (2009) i Gogola (2015), że podanie analogu GnRH- [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide w dawce inseminacyjnej jest skuteczną metodą wywoływania owulacji u królików. We wcześniejszych badaniach własnych przetestowano dawki [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide na poziomie 5, 10 i 15 µg na samicę (Gogol, 2016b). Wykazano istotny wpływ zastosowanej dawki analogu na odsetek samic wykończonych i brak wpływu na liczbę młodych urodzonych w miocie. Najniższa dawka hormonu (5 µg) nie była wystarczająca do wywołania owulacji u większości samic. Przy tej dawce uzyskano bardzo niski odsetek samic wykończonych na poziomie 29,5%. Wyniki uzyskane po podaniu 10 i 15 µg analogu w dawce inseminacyjnej były porównywalne do uzyskanych w grupie kontrolnej po iniekcji domięśniowej GnRH (72,2% samic wykończonych). Obserwacje te znajdują potwierdzenie w prezentowanych badaniach. Wskaźniki użytkowości reprodukcyjnej uzyskane po podaniu dopochwowym 10, 15 i 25 µg [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide nie różniły się istotnie od uzyskanych w grupie kontrolnej. Stwierdzono natomiast istotny wpływ dawki analogu na liczbę młodych urodzonych w miocie ogółem i żywych. Zaznaczyła się tendencja do wzrostu liczby królików urodzonych w miocie wraz ze wzrostem dawki analogu.

Zwiększenie dawki z 10 do 25  $\mu\text{g}$  spowodowało statystycznie istotny wzrost liczby królików urodzonych w miocie ogółem i żywych odpowiednio o 1,15 i 1,02 sztuki. Nie stwierdzono istotnego wpływu dawki analogu na odsetek samic wykończonych.

Możliwość uzyskania wysokiej płodności i plenności po podaniu dopochwowym 25  $\mu\text{g}$  [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide na samicę potwierdzają obserwacje Quinteli i in. (2009). Autorzy ci przetestowali dawki [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide na poziomie 25 i 30  $\mu\text{g}$  na samicę i uzyskali wyniki porównywalne do uzyskanych po iniekcji domięśniowej GnRH. W kolejnym eksperymencie, przeprowadzonym na dużej liczbie zwierząt, autorzy ci stwierdzili istotnie wyższy odsetek samic wykończonych po podaniu dopochwowym 25  $\mu\text{g}$  [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide w stosunku do grupy kontrolnej (iniekcja domięśniowa hormonu). Metoda wywoływania owulacji nie miała istotnego wpływu na liczbę młodych urodzonych w miocie.

Podsumowując, zastosowany w prezentowanych badaniach analog GnRH podany w dawce inseminacyjnej w ilości 15  $\mu\text{g}$  i 25  $\mu\text{g}$  na samicę pozwala na uzyskanie wskaźników reprodukcyjnych porównywalnych z uzyskiwanymi po użyciu standardowej metody wywoływania owulacji (iniekcja domięśniowa GnRH). Użycie wyższej dawki hormonu może mieć korzystny wpływ na liczbę młodych urodzonych w miocie, ale wymaga to potwierdzenia w badaniach na większej liczbie zwierząt.

Dziękuję panu Dariuszowi Maciejewskiemu i panu Tomaszowi Boduchowi za udostępnienie zwierząt i pomoc techniczną przy realizacji badań.

#### Piśmiennictwo

- Conn P.M., Crowley W.F. (1991). Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N. Engl. J. Med.*, 324: 93–103.
- Gogol P. (2015). Indukowanie owulacji u królików poprzez podanie analogu GnRH – desloreliny w dawce inseminacyjnej. *Wiad. Zoot.*, 4: 25–28.
- Gogol P. (2016a). Effect of goserelin and leuprolide added to the semen on reproductive performance in rabbits. *Acta Vet. Hung.*, 64 (1): 116–119.
- Gogol P. (2016b). Reproductive performance of rabbit does artificially inseminated with semen supplemented with GnRH analogue [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide. *Pol. J. Vet. Sci.*, 19(3), DOI: 10.5601/jelem.2016.21.2.588.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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 lecirelin (GnRH) dosage on the reproductive performance of nulliparous and lactating rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.*, 104: 306–315.

Zatwierdzono do druku 7 XII 2016

PIOTR GOGOL

**Reproductive performance of rabbits inseminated with semen supplemented with GnRH analogue [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide**

SUMMARY

The objective of the study was to evaluate the effect of a dose of GnRH analogue [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide, added to semen, on reproductive parameters of inseminated rabbit does. Females of the synthetic line Hyplus were inseminated on day 14 after kindling and ovulation was induced through intramuscular injection of 1 µg buserelin (control group) or by adding 10, 15 or 25 µg [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide to the insemination dose. Reproductive performance was evaluated based on the percentage of does kindled and the average number of rabbits born per litter (total and alive). The parameters of reproductive performance obtained after intravaginal administration of 10, 15 and 25 µg [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide did not differ significantly from those obtained in the control group. The dose of GnRH analogue, added to the semen, had a significant effect on the average number of total and live born rabbits per litter. The average number of young rabbits born per litter obtained with the 25 µg analogue dose per doe (10.99 born in total, 10.59 born alive) was significantly higher than for the 10 µg dose (9.84 born in total, 9.57 born alive). The investigated GnRH analogue, added to the insemination dose at 15 µg per doe, produces reproductive parameters that are comparable with those obtained using the standard ovulation induction method (intramuscular injection of GnRH). The increased hormone dose could have a positive effect on the number of young rabbits born per litter, but this needs to be confirmed using a greater number of animals.

Key words: rabbit, insemination, ovulation induction, reproductive performance, GnRH